



HAL
open science

Cartographie génétique des composés phénoliques de la pomme

Cindy Verdu

► **To cite this version:**

Cindy Verdu. Cartographie génétique des composés phénoliques de la pomme. Chimie analytique. Université d'Angers, 2013. Français. NNT: . tel-00949195

HAL Id: tel-00949195

<https://theses.hal.science/tel-00949195>

Submitted on 19 Feb 2014

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

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

Thèse de Doctorat

Cindy VERDU

Mémoire présenté en vue de l'obtention
du grade de Docteur de l'Université d'Angers
Sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans

Discipline : Agronomie, Productions animales et végétales, Agroalimentaire
Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale
Laboratoires d'accueil : Laboratoire SONAS, Université d'Angers
IRHS, INRA Angers-Nantes

Soutenue le **11 juillet 2013**

Ecole Doctorale : VENAM
Thèse N° 1290

Cartographie Génétique des Composés Phénoliques de la Pomme

JURY

Rapporteurs : M. David CHAGNE, Docteur, The New Zealand Institute for Plant & Food Research Ltd
M. Félix TOMI, Professeur d'Université, Université de Corse
Examineurs : M. Sylvain GUYOT, Chargé de recherche, INRA de Rennes
M. Philippe SIMONEAU, Professeur d'Université, Université d'Angers
Directeur de Thèse : M. David GUILLET, Maître de conférences, Université d'Angers
Co-directeur de Thèse : M. François LAURENS, Ingénieur de recherche, INRA Angers-Nantes

Thèse de Doctorat

Cindy VERDU

Mémoire présenté en vue de l'obtention
du grade de Docteur de l'Université d'Angers
Sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans

Discipline : Agronomie, Productions animales et végétales, Agroalimentaire
Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale
Laboratoires d'accueil : Laboratoire SONAS, Université d'Angers
IRHS, INRA Angers-Nantes

Soutenue le **11 juillet 2013**

Ecole Doctorale : VENAM
Thèse N° 1290

Cartographie Génétique des Composés Phénoliques de la Pomme

JURY

Rapporteurs : M. David CHAGNE, Docteur, The New Zealand Institute for Plant & Food
Research Ltd
M. Félix TOMI, Professeur d'Université, Université de Corse

Examineurs : M. Sylvain GUYOT, Chargé de recherche, INRA de Rennes
M. Philippe SIMONEAU, Professeur d'Université, Université d'Angers

Directeur de Thèse : M. David GUILLET, Maître de conférences, Université d'Angers

Co-directeur de Thèse : M. François LAURENS, Ingénieur de recherche, INRA Angers-Nantes

“An apple a day keeps the doctor away, especially if you aim carefully.”

Winston Churchill

Remerciements

Je profite de ces quelques lignes pour remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Et je commencerai par adresser mes plus sincères remerciements à mes deux encadrants de thèse. Merci pour vos conseils, votre soutien et vos encouragements. Merci à David pour sa patience, son calme et sa bonne humeur. Merci à François pour sa confiance, la liberté qu'il m'a laissé tout au long de cette thèse et pour avoir été si prévenant dans les moments critiques.

Je remercie également Pascal Richomme, directeur du SONAS, Elisabeth Chevreau directrice de l'ancien GenHort et Jean-Pierre Renou directeur de l'IRHS pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Merci pour leur gentillesse et leurs conseils.

Un très grand merci à David Chagné et Félix Tomi pour avoir accepté la charge de rapporteurs et à Philippe Simoneau celle d'examineur. Merci à Sylvain Guyot pour tout l'intérêt qu'il a porté à mes travaux de thèse. Merci pour son expertise, ses conseils et sa disponibilité. Merci d'avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi thèse puis examinateur de cette thèse. Un très grand merci à Charles-Eric Durel et Christine Herrenknecht pour avoir également accepté d'être membres de mon comité de suivi de thèse. Merci pour leurs conseils, leur disponibilité et leur aide dans ces travaux.

Je souhaite également remercier la SFR QUASAV pour avoir financé ces travaux de recherche pendant 3 ans.

Un très grand merci à Pauline pour tout ce qu'elle m'a apporté. Merci pour sa patience, son soutien, sa disponibilité, sa bonne humeur, son dynamisme et surtout son amitié. Je souhaite lui faire part de toute ma reconnaissance pour m'avoir formée si patiemment depuis mon arrivée à l'INRA d'Angers et pour tout l'intérêt qu'elle a porté à ma thèse. Merci aussi pour tous les moments de détente passés ensemble ; je garde un excellent souvenir de notre soirée « tablettes de chocolat » entre « filles ».

Un très grand merci à Julia pour toute l'aide apportée au SONAS. Merci d'avoir géré la plupart des pannes et de l'entretien de cette bête curieuse nommée UHPLC... Sans elle, j'aurais passé cette machine par la fenêtre depuis longtemps... Merci aussi pour sa bonne humeur, sa gentillesse et son amitié.

Merci à Jean-Marc pour son aide, son soutien, ses relectures et ses conseils avisés dont il m'a fait part pendant ma thèse. Merci également pour avoir

instauré « la pause du vendredi » et pour avoir toujours répondu présent à mes pulsions de chocolat... Un jour, je serai un « Jean-Marc » et je sauverai la cheerleader...

J'adresserai un très chaleureux merci à Nicolas, Michel et Elise pour leur aide apportée à la réalisation de ces travaux. Merci d'avoir géré une partie des récoltes et de la préparation des échantillons. Merci également pour leurs conseils, leur bonne humeur, leur gentillesse et leur amitié. Les moments passés en verger ont été un vrai moment de plaisir grâce à vous !

Un très très grand merci au plateau ANAN et surtout à Muriel pour avoir repris les dernières manip' après mon départ.

Un très grand merci aux « Gars du terrain » : Bernard, Mehdi, Arnaud, François, Rémi et Philippe. Merci pour leurs conseils techniques, pour leur humour, leur bonne humeur, leur côté créatif très (très !!) exacerbé et pour toutes les pommes et poires qu'ils mettent en distribution et qui m'ont si souvent sauvée de l'hypoglycémie de 16h...

Rémi, Bernard, Magalie, Laurence, Fabrice, Fabrice, Gersende, Tatiana, Marie : les pauses déjeunées ont été un enchantement, en votre compagnie !

Un très très grand merci à l'incroyable équipe administrative de GenHort puis de l'IRHS. Merci à Chantal, Patricia, Patricia, Anne, Sylvie et Lylian pour m'avoir si souvent secourue dans la brume épaisse que sont pour moi les démarches administratives.

Un grand merci à Elisabeth Dineau et Marie-Hélène Cathala pour avoir toujours su dénicher les articles que je recherchais.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance à Didier, Catherine, Romain et Marie-Christine pour m'avoir permis de faire du monitorat pendant ma thèse. Un très grand merci pour votre encadrement, vos conseils, votre aide et votre bonne humeur. Je devrais aussi remercier mes étudiants pour m'avoir supportée ces heures durant...

Un très grand merci à Isabelle pour son amitié, sa bonne humeur et pour « la pause Granola » (oui, la nourriture à eu une place déterminante dans cette thèse...). Je n'oublie pas tous les membres du SONAS avec qui j'ai eu grand plaisir de discuter entre deux runs d'UHPLC. Merci à Sabine, Denis, Jean-Jacques, Séverine, Anne-Marie, Anne, Pascal, Patricia pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Je remercie également très chaleureusement tous les thésards et stagiaires que j'ai eu le plaisir de croiser : Amélie, Sylvie, Alexis,

Luc, Alexandre, Thäi, Séverine, Elodie, Katio, Maxime et tous les autres. Merci pour votre aide en labo mais surtout pour tous les bons moments passés ensemble.

Je remercie également tous mes co-bureaux de l'INRA avec qui le mot travail est devenu plus synonyme de plaisir que de labeur. Merci à Paula, Nicolas, Didiana, Gaëlle, Elise et Aline. Un très chaleureux merci à Sandrine pour nos pauses papotages. Courage pour la thèse et plein de bonheur avec tes deux amours. Un immense merci à ma douce et pétillante Diannounette qui a apporté tant de fraîcheur dans cette unité ! Merci pour sa bonne humeur communicative, son soutien et son aide précieuse, notamment en anglais... Garde le sourire Princesse ! A ma « que collègue » Marie je souhaiterai lui exprimer toute mon amitié. Merci pour son soutien de tous les instants, les soirées passées ensemble, les footings du samedi matin, les rires partagés, les vacances... C'est plus facile d'avancer quand on est deux à ramer ! « Le poulailler exprime ses plus sincères excuses à ses voisins de couloir pour la gêne occasionnée ».

Merci à Mehdi pour la relecture de ce manuscrit. Merci à Yves pour ses conseils. Merci à Sylvain pour son aide et ses conseils en bioinformatique. Merci à Fabrice pour son aide en statistiques. Merci à Laurence HSO pour le planning sportif des derniers mois de rédaction et plus généralement pour son dynamisme et sa bonne humeur de tous les jours. Je garde une pensée pour tous les autres membres du bâtiment B avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler, discuter, boire un café... Merci de leur gentillesse, de leur bonne humeur et de leur soutien.

Une pensée également pour les amis : Thibault, Dany, Romain, Zachary, Matthieu, Mickaël, Stéphanie : Bon courage pour la suite...

Tony, notre histoire a commencé avec un verre de montre, jusqu'où cela nous mènera-t-il ?... Félicitation pour ta thèse.

Alida, merci d'être avec moi depuis toujours !

Papa, Maman, Jenny, David, Aurélien : les études sont enfin terminées !! La p'tite est devenue grande. Merci à vous d'être toujours là pour moi, de veiller sur moi et de me soutenir quels que soient mes choix. Maëlys et Adonis : « é t'aime crop fort moi aussi !! »

Enfin à ma Marmotte... Les mots n'ont aucun sens pour te dire tout ce que je ressens. Merci d'être près de moi dans les meilleurs et les pires moments. Merci pour ton soutien, ton aide, ton réconfort. La vie est décidément la plus belle des expériences... Merci de me l'avoir appris.

Je peux enfin répondre aux membres du jury qui m'ont auditionnée lors du concours de l'école doctorale : travailler dans deux laboratoires différents sur deux thématiques différentes est une vraie chance et non une difficulté. Cela m'a permis d'en apprendre deux fois plus et de rencontrer et partager le quotidien d'encore davantage de personnes formidables.

A mes pitchounous, Maëlys et Adonis

Table des Matières

Liste des abréviations	v
Liste des figures et tableaux	vii
Introduction générale	1
Etude bibliographique	7
I. Le pommier	9
A. Un peu d'histoire	9
B. De l'arbre au génome : généralités	9
1. Botanique et anatomie	9
2. Développement du fruit	10
3. Cytogénétique	11
C. Données nutritionnelles et santé	12
1. Composition du fruit	12
2. Les bienfaits santé	12
D. La filière cidricole	14
1. Les pommes à cidre	14
2. Le cidre	15
3. Les procédés de fabrication	16
4. L'économie de la filière	16
5. Le projet INNOVACIDRE pour l'amélioration des variétés de pommes à cidre	17
II. Les composés phénoliques	18
A. Définition	18
B. Structure et classification (Macheix, Fleuriet et al. 2005)	19
1. Les acides hydroxycinnamiques	20
2. Les flavonoïdes	21
C. Voies de biosynthèse des composés phénoliques	24
1. La voie de biosynthèse	24
2. Localisation cellulaire des enzymes de biosynthèse	27
3. Régulation de la voie de biosynthèse	27
D. Les composés phénoliques de la pomme	29
1. Rôle pour la plante	29
2. Répartition des composés phénoliques	31
3. Importance des composés phénoliques pour la filière cidre	32
4. Modification de la teneur en composés phénoliques lors de la préparation des cidres	33
E. Les méthodes d'analyse	35
1. Séparation des composés par chromatographie liquide	35
2. Identification des composés par spectrométrie	36
3. Quantification des composés	39
4. La chromatographie liquide pour l'étude des composés phénoliques des pommes	40
III. Etude génétique des caractères quantitatifs	41
A. Le séquençage du génome du pommier	41
B. Construction des cartes génétiques	42
1. Les marqueurs moléculaires	43
2. Principe de cartographie génétique chez le pommier	48
C. Cartographie génétique des caractères quantitatifs	50
1. Principe de détection QTL en population simple	51
2. Autres méthodes de détection de QTL	52
D. Identification des gènes candidats	53
1. Recherche des gènes candidats	53
2. Validation des gènes candidats	54
E. Application de la cartographie de QTL chez le pommier	54
1. Détections de QTL pour la résistance et la qualité du fruit	54
2. Les composés phénoliques : des études beaucoup plus récentes	55
IV. Sélection assistée par marqueurs	58
V. Enjeux et objectifs de la thèse	59

Chapitre I : Développement, validation et comparaison de deux méthodes de chromatographie liquide (UHPLC-UV et UHPLC-MS/MS) pour la quantification des composés phénoliques du jus de pomme.	61
Contexte	63
Abstract	65
1. Introduction	66
2. Materials and Methods	67
2.1. Standards and chemicals	67
2.2. UHPLC-UV-MS instrumentation and conditions	68
2.3. Preparation of standard solutions	69
2.4. Sample preparation	69
2.5. Validation study	69
3. Results and Discussion	70
3.1. Sample preparation	70
3.2. UHPLC-UV & UHPLC-MS/MS conditions	70
3.3. Method validation	71
3.4. Comparison of the UHPLC-UV & UHPLC-MS/MS methods	72
Conclusion	73
Chapitre II : Analyse des données de phénotypage et comparaison des profils phénoliques obtenus dans les jus de pomme et les fruits préparés à partir d'une descendance de pommiers à cidre.	85
Contexte	87
1. Introduction	90
2. Material and methods	92
2.1. Phenolic standards and chemicals	92
2.2. Plant material	93
2.3. Sample preparation	93
2.3.1. Fruit sampling and sample preparation	93
2.3.2. Apple juice preparation	93
2.4. Quantification of phenolic compounds	94
2.4.1. Analysis method for fruit extracts	94
2.4.2. Analytic method for apple juices	95
2.5. Statistical analyses	96
3. Results and discussion	97
3.1. Phenolic compounds in fruits	97
3.2. Phenolic compounds in apple juices	99
3.3. Extractability of polyphenols from the fruit to the juice	102
3.4. Variability of polyphenol contents between two apple progenies	103
Conclusion	104
Chapitre III : Détection de QTL pour la teneur en composés phénoliques des jus et des fruits et mise en évidence <i>in silico</i> de gènes candidats.	121
Contexte	123
1. Introduction	126
2. Material and methods	128
2.1. Plant material	128
2.2. Sample preparation and phenolic quantification	128
2.3. DNA extraction and molecular marker genotyping	129
2.4. Genetic linkage map construction	129
2.5. QTL analysis	129
2.6. Broad sense heritability, allelic and epistatic effects calculation	130
2.7. Putative candidate genes identification with the BLAST2GO software	130
3. Results	131
3.1. Construction of genetic maps	131
3.2. QTL detection	131
3.2.1. Hydroxycinnamic acid	131
3.2.2. Flavanols	132
3.2.3. Dihydrochalcones	133

3.2.4. Flavonols -----	133
3.2.5. Anthocyanins -----	134
3.3. Putative candidate genes identification -----	134
4. Discussion -----	134
4.1. Comparisons between cider and dessert apple progenies -----	135
4.2. Putative candidate genes identification to understand the genetic architecture of the phenolic compounds regulation -----	136
4.3. Use in marker-assisted selection -----	137
Conclusion -----	138
Discussion générale -----	159
I. Les méthodes de chromatographie liquide pour le phénotypage à haut débit des composés phénoliques -----	161
II. Influence des méthodes de préparation sur la teneur en composés phénoliques des jus de pomme -----	163
III. Variabilité et héritabilité des composés phénoliques au sein de la descendance cidre	165
IV. Spécificité des pommes à cidre -----	166
V. Identification des gènes candidats -----	168
VI. Utilisation en sélection variétale -----	170
Conclusion générale -----	173
Annexes -----	177
Références bibliographiques -----	191
Articles de périodiques -----	191
Communications orales et posters de congrès -----	205
Sites Internet -----	205

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique / **DNA** : desoxyribonucleic acid

ARN : acide ribonucléique / **RNA** : ribonucleic acid

DP : degré de polymérisation / polymerization degree

GL : groupe de liaison / **LG** : linkage group

IM : interval mapping

KW : Kruskal-Wallis

LOD : logarithme des probabilités / logarithm of odds

MQM : multiple QTL mapping

PCR : réaction en chaîne de polymérisation / polymerase chain reaction

PPO : Polyphénoloxydase

QTL : locus de caractère quantitatif / quantitative trait locus

SAM : sélection assistée par marqueurs / **MAS** : marker-assisted selection

Marqueurs moléculaires

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

CAPS : Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

ISSR : Inter-Simple sequence repeat

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SCAR : Sequence Characterized Amplified Region

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SSR : Simple Sequence Repeat

STS : Sequence Tagged Site

Enzymes de biosynthèse des composés phénoliques

4CL : 4-coumarate:Coenzyme A ligase

6DCS : 6'-deoxychalcone synthase

ANR : anthocyanidin reductase

ANS : anthocyanidin synthase

C3'H : p-coumarate 3'-hydroxylase

C4H : cinnamate 4-hydroxylase

CHI : chalcone isomerase

CHS : chalcone synthase

D2'GT : dihydrochalcone 2-O-glucosyltransferase

DFR : dihydroflavanol 4-reductase

DH : dehydrogenase

F3'H : flavonoid 3'-hydroxylase/flavonoid 3'-monooxygenase

FHT : flavanone 3- β -hydroxylase

FLS : flavonol synthase

FNS : flavone synthase

HCT : shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase

HQT : quinate O-hydroxycinnamoyltransferase

IFS : isoflavanone synthase

LAR : leucoanthocyanidin reductase

PAL : phenylalanine ammonia lyase

TAL : tyrosin ammonia lyase

UFGT : UDP-glucose:anthocyanidin/flavonoid 3-glucosyltransferase

Liste des figures et tableaux

Etude bibliographique et discussion générale.

- Figure 1.** Schéma d'une coupe longitudinale (A) et transversale (B) d'une pomme (UPMC, 2011).
- Figure 2.** Reconstruction des régions synténiques du pommier en tenant compte de l'ancienneté des événements de recombinaison (Velasco, Zharkikh et al. 2010).
- Figure 3.** Modèle expliquant l'évolution des neuf chromosomes ancestraux aux 17 chromosomes des Maloideae (Velasco, Zharkikh et al. 2010).
- Figure 4.** Squelette carboné de base des flavonoïdes.
- Figure 5.** Exemple de structure d'une procyanidine C1 liée en C₍₄₎→C₍₈₎ (A) et de la procyanidine B5 liée en C₍₄₎→C₍₆₎ (B).
- Figure 6.** Voie de biosynthèse des composés phénoliques.
- Figure 7.** Spectre UV des principaux composés phénoliques de la pomme (Tsao, Yang et al. 2003).
- Figure 8.** Représentation d'une source d'ionisation électrospray (Lamondlab, 2011).
- Figure 9.** Crossing-over entre deux chromosomes appariés au moment de la méiose.
- Figure 10.** Principe de cartographie QTL (Collard, Jahufer et al. 2005).
- Figure 11.** Représentation d'une courbe de LOD. La courbe en pointillés représente le LOD seuil déterminé par le test de permutation. Les différents marqueurs du groupe de liaison sont positionnés sur l'axe des abscisses.
- Figure 12.** Détection de QTL réalisée sur les cartes génétiques de 'Royal Gala' et 'Braeburn' pour la teneur en composés phénoliques de la peau et de la chair des fruits et positionnement des gènes candidats (Chagne, Krieger et al. 2012).
- Figure 13.** Résultats de la détection QTL réalisée sur les cartes génétiques de 'Prima' et Fiesta pour la teneur en composés phénoliques de la peau (A) et la chair (B) du fruit (Khan, Chibon et al. 2012).
- Figure 14.** Voie de biosynthèse des principaux composés phénoliques dosés dans la pomme et le jus de pomme.
-
- Tableau 1.** Composition moyenne pour 100g de pomme (Food-allergens, 2012).
- Tableau 2.** Classification des pommes à cidre en fonction de leur acidité et leur teneur en tanins (Tavernier and Jacquin 1959).
- Tableau 3.** Structure chimique des acides hydroxycinnamiques.
- Tableau 4.** Structure chimique des esters d'acides hydroxycinnamiques de la pomme.
- Tableau 5.** Structure chimique des monomères de flavanols de la pomme.
- Tableau 6.** Structure chimique des procyanidines majoritaires de la pomme.
- Tableau 7.** Structure chimique des flavonols de la pomme.
- Tableau 8.** Structure chimique des dihydrochalcones de la pomme.
- Tableau 9.** Structure chimique des anthocyanes de la pomme.
- Tableau 10.** Principe, avantages et inconvénients des principaux marqueurs moléculaires utilisés en cartographie génétique.
- Tableau 11.** Différents cas de figure de polymorphisme des marqueurs moléculaires dans une descendance issue de parents hétérozygotes.

Chapitre I : Développement, validation et comparaison de deux méthodes de chromatographie liquide (UHPLC-UV et UHPLC-MS/MS) pour la quantification des composés phénoliques du jus de pomme.

Figure 1. UHPLC-ESI Total Ion Current (TIC, A) and UHPLC-UV (λ 280 nm, B) chromatograms of standard working solutions.

Figure 2. UHPLC-UV TIC (λ 280 nm, A) and UHPLC-MS/MS in Single Reaction Monitoring (SRM) optimized for procyanidin B: 577 m/z parent ions and 289 m/z fragment ions were selected with collision energy at 16 V (B); and for rutin: 609 m/z parent ions and 300 m/z fragment ions were selected with collision energy at 40 V (C).

Figure 3. Comparison of the quantifications of 120 apple juices (n=3, P value < 0.0001) with the UV-PDA detector (X-axis) and the ESI-triple quadrupole mass analyzer (Y-axis).

Table 1. Retention time (Rt), MS/MS fragment ions, collision energy (CE) and Tube Lens Offset (TLO) for the 15 major phenolic compounds of apple juices.

Table 2. Calibration curve parameters for the 15 major phenolic compounds according to UV or MS detection and results of the validation study for P12R3A28 apple juice.

Table 3. Range of concentrations of different phenolic compounds quantified with the UV-PDA detector and the ESI-triple quadrupole mass analyzer in 120 apple juices prepared from the progeny, X5210 x X8402.

Chapitre II : Analyse des données de phénotypage et comparaison des profils phénoliques obtenus dans les jus de pomme et les fruits préparés à partir d'une descendance de pommiers à cidre.

Figure 1. Turkey boxplot for the mean polyphenol concentration (mg/100g of fresh weight) in the whole fruit (2008 and 2009 harvest years).

Figure 2. PCA of phenolic compounds quantified in fruits harvested in 2008 (a) and 2009 (b).

Figure 3. Turkey boxplot for the mean polyphenol concentration (mg/L) in juices prepared in 2010.

Figure 4. PCA of phenolic compounds quantified in juices prepared in 2009 (a) and 2010 (b).

Figure 5. Mean extractability level (in %) of individual phenolic compounds as well as total hydroxycinnamic acids (HA), flavanol monomers, and flavonols determined within the 124 common individuals analyzed both for fruits and juices in 2009.

Table 1. Mean concentration (mg kg⁻¹ of fresh weight) of phenolic compounds present in the whole fruit (2008 and 2009 harvest year)^a

Table 2. Range of total polyphenol content, total procyanidins determined with acidolysis reaction, polymerization degree of flavanols and some other phenolic compounds in fruit (expressed in mg kg⁻¹ of fresh weight) and juice (expressed in mg L⁻¹) of different apple varieties^a

Table 3. Concentration (mg L⁻¹) of phenolic compounds present in the juice (2010 harvest year)^a

Table S1. Analyses of variance for phenolic compounds quantified in 14 fruits harvested in 2008 and 2009.

Table S2. Analyses of variance for phenolic compounds quantified in 57 juices prepared in 2009 and 2010.

Chapitre III : Détection de QTL pour la teneur en composés phénoliques des jus et des fruits et mise en évidence in silico de gènes candidats.

Figure 1. Pedigree of the studied progeny with 'Kermerrien' the cider ancestor, and X5100, X4972 and X3189, three dessert apple hybrids.

Figure 2. Quantitative Trait Loci (QTL) detected on the integrated map for phenolic compounds in apple fruits harvested in 2008 (blue) and 2009 (pink) and juices prepared in 2009 (red) and 2010 (green) from the X5210 x X8402 progeny.

Figure 3. Quantitative Trait Loci (QTL) detected on the female X5210 (A) and male X8402 (B) maps. Legend: see Fig. 2.

Figure 4. Summary of the quantitative trait loci (QTL) for phenolic compounds in fruit and juice determined in the X5210 x X8402 progeny.

Figure 5. Phenolic compounds biosynthesis.

Table 1. Broad sense genetic heritability of phenolic compounds quantified in fruit and juice for two harvest years

Table 2. Parameters associated with the quantitative trait loci (QTL) detected in the apple X5210 x X8402 progeny by multiple QTL mapping (MQM) for phenolic compounds in fruits harvested in 2008 (F08) and 2009 (F09) and in juices prepared in 2009 (J09) and 2010 (J10).

Table 3. Candidate genes identified in the interval of 12 clusters of quantitative trait loci (QTL) or meta-QTL using the BLAST2GO software.

Introduction générale

Le cidre est une boisson alcoolisée traditionnellement consommée dans certains pays d'Europe et au Canada. Il est produit à partir de jus de pomme fermenté et les premiers écrits relatant la culture de pommiers en France spécifiquement cultivés pour la production des cidres remonte au XI^{ème} siècle (Bore and Fleckinger 1997). Comme les caractéristiques recherchées pour une pomme à cidre sont bien différentes de celles d'une pomme à couteau, ces deux types de pommiers ont finalement divergés avec le temps jusqu'à l'obtention aujourd'hui de variétés très différentes. Les pommes à cidre ont généralement un aspect plus rustique, sont plus amères et astringentes et les fruits chutent naturellement à maturité. Les études menées jusqu'à présent montrent l'importance des tanins condensés et de leur degré de polymérisation dans les caractères d'amertume et d'astringence des pommes à cidre (Lea and Arnold 1978). Une classification basée sur la teneur en tannins et en acide des moûts obtenus après pressurage a d'ailleurs été établie pour différencier les variétés par catégories de saveur : douce, douce-amère, amère, acide et aigre (Tavernier and Jacquin 1959). Elle est encore couramment utilisée par l'ensemble de la filière. Les composés phénoliques interviennent également dans la couleur et dans le potentiel aromatique des cidres (Herrero, Cuesta et al. 1999; Song, Yao et al. 2007).

De nombreuses études épidémiologiques menées ces dernières années tendent à montrer que la consommation de pomme ou de cidre est inversement corrélée aux risques de développer de l'asthme, du diabète, certains cancers ou certaines maladies cardiovasculaires (Boyer and Liu 2004; Crozier, Jaganath et al. 2009). Les fibres et les composés phénoliques présents en grande quantité dans ce fruit seraient responsables de ces effets protecteurs (McDougall, Morrison et al. 1996; Thebaudin, Lefebvre et al. 1997; Vauzour, Rodriguez-Mateos et al. 2010). Il reste encore cependant un certain nombre de questions concernant la métabolisation et la biodisponibilité des polyphénols après ingestion.

La plupart des variétés de pommiers à cidre ont une alternance de production très marquée et peuvent présenter une forte sensibilité à certaines maladies. L'obtention de nouvelles variétés plus régulières dans leur production et plus résistantes aux maladies mais qui conservent néanmoins leurs qualités organoleptiques et technologiques pour la production des cidres est donc recherchée. Toutefois, les programmes de sélection pour le pommier sont longs et coûteux. L'utilisation des marqueurs moléculaires permettrait de réduire le temps de sélection et surtout de l'optimiser en éliminant précocement les individus de faible intérêt. Pour mettre en place cette sélection assistée par marqueurs (SAM), des études génétiques préliminaires sont nécessaires et notamment la détection de QTL, largement développée chez le pommier depuis plusieurs années qui a déjà permis de mettre en évidence des marqueurs associés à différents caractères d'intérêt agronomiques,

notamment la résistance à certains agents pathogènes. Jusqu'à présent la SAM n'est utilisée en routine que dans quelques programmes d'amélioration du pommier, sur des effectifs relativement faibles. Elle est ciblée sur un petit nombre de gènes majeurs principalement liés à la résistance aux principaux parasites de l'espèce.

Depuis le début de l'année 2012, deux études ont été publiées sur la détection de QTL des composés phénoliques des pommes (Chagne, Krieger et al. 2012; Khan, Chibon et al. 2012). Ces études ont toutes deux été réalisées sur des descendances de pommes de table et il n'existe, à l'heure actuelle, aucune étude de ce type sur les pommes à cidre. La recherche de QTL pour la teneur en composés phénoliques sur une descendance de pommes à cidre se justifie donc par la grande importance de ces composés dans la qualité cidrière et par sa complémentarité avec les études antérieures menées sur les pommes de table.

Ce travail de thèse propose donc d'étudier les composés phénoliques contenus dans les fruits et les jus d'une descendance de pommes à cidre dans le but de réaliser une détection de QTL. La première partie de ce manuscrit est une étude bibliographique qui dresse un bilan des connaissances actuelles sur la pomme, les composés phénoliques et la cartographie génétique. La seconde partie présente les résultats de mon travail de thèse au travers de trois chapitres. Le premier est consacré à la méthode de chromatographie liquide développée en UHPLC pour le dosage des composés phénoliques contenus dans les jus de pomme. Une étude comparative a également été menée pour évaluer les différences de quantification liées au type de détecteur utilisé (masse ou UV). Le second chapitre est consacré à l'étude des données de phénotypage obtenues sur fruits et sur jus. Elle expose la variabilité existante au sein de cette descendance et le rendement d'extraction de ces composés lors de la préparation des jus. Le troisième chapitre regroupe les données de cartographie génétique et les détections de QTL qui ont été réalisées. L'analyse de la séquence génomique *in silico* pour l'identification des gènes candidats sous-jacents aux QTL y est également présentée. Enfin, une discussion générale fait un bilan des résultats obtenus et des principales perspectives envisagées.

Ces travaux ont été réalisés en codirection entre le laboratoire de Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux (SONAS) de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Ingénierie de la Santé de l'Université d'Angers et l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) de l'INRA Angers-Nantes. L'ensemble des expérimentations de chromatographie a été réalisée au laboratoire SONAS, tandis que les récoltes, la préparation

des jus de pomme et les analyses statistiques et génétiques ont été réalisées à l'IRHS. Une collaboration avec l'Unité de Recherches Cidricoles de l'INRA du Rheu a été menée pour la quantification des composés phénoliques du fruit entier par HPLC-UV et l'analyse des données de phénotypage.

Ces travaux ont été réalisés grâce aux soutiens financiers de la SFR 4207 QUASAV (bourse de thèse) et du projet interrégional INNOVACIDRE (participation aux travaux expérimentaux). Les pommiers étudiés au cours de cette thèse ont été suivis et entretenus par l'Unité Expérimentale Horticole de l'INRA Angers-Nantes.

Etude bibliographique

I. Le pommier

A. Un peu d'histoire

Il est aujourd'hui admis que le pommier cultivé est issu de forêts sauvages originaires du Kazakhstan. Dès le néolithique, ils auraient colonisé la Chine, le Moyen-Orient et l'Europe en partie grâce aux échanges sur ce qui sera nommé plus tard la Route de la Soie (Harris, Robinson et al. 2002). Plusieurs espèces de pommiers sauvages seraient à l'origine des variétés domestiques comme *Malus sylvestris* Mill., espèce répandue en Europe, *Malus Baccata* Borkh., espèce très résistante au froid et *Malus sieversii* Ledeb. M. Roem., endémique des montagnes d'Asie centrale (Velasco, Zharkikh et al. 2010; Cornille, Gladieux et al. 2012). Par la suite, différents croisements interspécifiques avec d'autres espèces du genre *Malus* comme *Malus floribunda* Sieb. ont permis d'améliorer les variétés cultivées en introgressant des gènes de résistance (Lauri and Laurens 2005).

Ce sont surtout les Romains qui développèrent les premiers vergers de pommiers commerciaux grâce aux techniques de greffage héritées des Perses puis des Grecs (Harris, Robinson et al. 2002). Ils dénombrèrent alors une trentaine de variétés de pomme. Au XVI^{ème} siècle, alors que la pomologie est élevée au rang de science, on dénombreait plus d'une centaine de variétés en France (Lapomme, 2011). Aujourd'hui, ce sont des milliers de variétés qui sont recensées à travers le monde. Cependant, malgré la très grande diversité qui existe pour cette espèce, seulement une douzaine de variétés est cultivée à grande échelle comme 'Golden Delicious' (environ un quart de la production européenne), 'Gala', 'Fuji' ou 'Granny Smith' (WAPA, 2011).

B. De l'arbre au génome : généralités

1. Botanique et anatomie

Le pommier domestique, *Malus domestica*, est un arbre fruitier de la famille des Rosaceae, sous-famille des Maloideae, genre *Malus* (Harris, Robinson et al. 2002). Les arbres sont hermaphrodites et peuvent mesurer jusqu'à douze mètres de haut. Les feuilles sont alternes, stipulées et caduques. Les fleurs sont régulières, pentamériques à symétrie rayonnée de couleur blanc-rosée. Elles sont généralement disposées en corymbe terminal de cinq fleurs et la floraison dure de 10 à 15 jours. La pomme est un faux-fruit et plus particulièrement un fruit composite puisqu'il est issu de l'ovaire, de la base des pièces florales et du réceptacle. C'est un fruit climactérique dont la maturation est dépendante de l'éthylène. On distingue

trois structures dans le fruit (Figure 1) : l'épiderme (la peau), le mésocarpe (la chair) et l'endocarpe qui contient les pépins (le trognon).

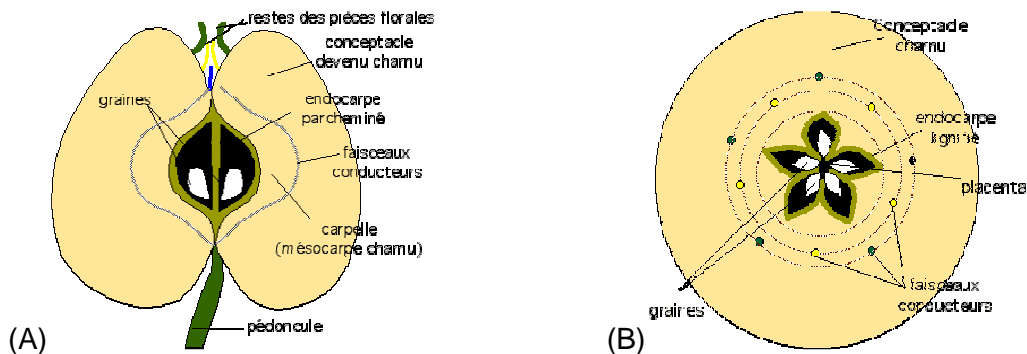


Figure 15. Schéma d'une coupe longitudinale (A) et transversale (B) d'une pomme (UPMC, 2011).

2. Développement du fruit

On distingue trois phases de développement du fruit:

- La phase de croissance
- La maturation
- La sénescence

La phase de croissance débute après la floraison et constitue l'étape de grossissement du fruit par division et grandissement cellulaires. Quatre à sept semaines après la floraison, les cellules cessent de se diviser mais continuent de grandir jusqu'à la maturité du fruit. La chute naturelle des fruits latéraux des corymbes (éclaircissage naturel) est observée à l'arrêt de la division cellulaire (Bain and Robertson 1950; Travers 2004).

La maturation se traduit par i) la dégradation des pigments chlorophylliens et d'une partie des parois cellulaires, ii) la remobilisation des réserves d'amidon en sucres solubles, iii) l'augmentation de la production d'éthylène et de la respiration cellulaire qui atteignent un maximum au moment de la crise climactérique (Travers 2004). Pour la commercialisation des pommes de table ou la préparation des cidres, une phase de maturation post-récolte est nécessaire au développement de tous les arômes (Dixon and Hewett 2000). Comme les pommes à cidre ne sont pas cueillies mais ramassées au sol, la date de récolte est principalement déterminée par la quantité de fruits au sol et l'indice de régression d'amidon (Travers 2004; IFPC 2009).

La phase de sénescence se traduit par une désorganisation cellulaire aboutissant à la libération des pépins (Travers 2004).

3. Cytogénétique

Alors que les autres sous-familles de Rosaceae ont $x=7$, 8 ou 9 chromosomes, les *Maloideae* se caractérisent par la présence de $x=17$ chromosomes. D'importantes régions synténiques entre chromosomes ont été mises en évidence grâce au séquençage du génome de pommier (Figure 2), laissant supposer plusieurs événements de duplication, recombinaison, translocation et délétion à partir de $x=9$ chromosomes ancestraux (Figure 3) (Velasco, Zharkikh et al. 2010). D'autres hypothèses ont été proposées auparavant pour comprendre l'origine des 17 chromosomes des *Maloideae*. L'étude d'Evans et Campbell (2002) sur les séquences géniques de la Granule Bound Starch Synthase, proposait déjà un événement de polyploïdisation à partir d'un ancêtre à 9 chromosomes. Ces nouvelles hypothèses remettent en cause les précédentes basées sur la formation de multivalents ou d'univalents lors de la méiose proposant, à l'origine, soit un ancêtre à $x=7$ chromosomes qui aurait subi différentes duplications, soit des événements d'allopolyploïdisation entre des progéniteurs à $x=7$ et $x=8$ chromosomes (Evans and Campbell 2002). Toutefois, le développement des méthodologies et des techniques dans le domaine des biologies moléculaires pourrait une nouvelle fois remettre en cause l'hypothèse de l'ancêtre à $x=9$ chromosomes.

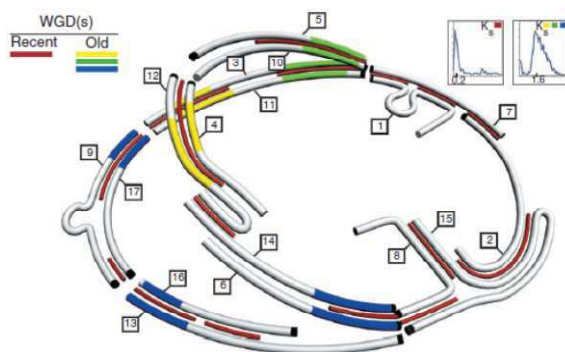


Figure 16. Reconstruction des régions synténiques du pommier en tenant compte de l'ancienneté des événements de recombinaison (Velasco, Zharkikh et al. 2010).

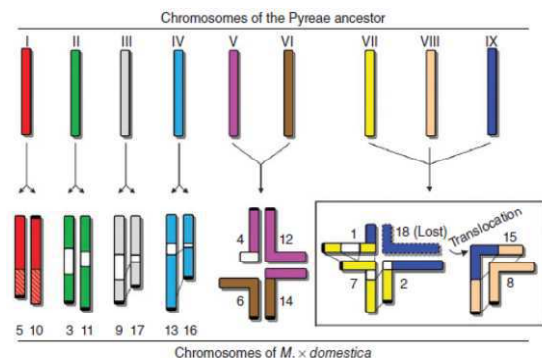


Figure 17. Modèle expliquant l'évolution des neuf chromosomes ancestraux aux 17 chromosomes des *Maloideae* (Velasco, Zharkikh et al. 2010).

Le pommier est généralement diploïde ($2n=34$ chromosomes) mais certaines variétés comme 'Jonagold' ou 'Mutsu' peuvent être triploïdes (Janick, Cummins et al. 1996).

C. Données nutritionnelles et santé

1. Composition du fruit

La pomme, avec sa composition variée et son faible apport calorique (54 Kcal au 100 g), est souvent considérée comme un « fruit santé » (Tableau 1). Elle est d'une part très riche en eau (plus de 85% de sa masse totale) et l'essentiel de ses calories est fourni par les sucres, principalement du fructose (51%) du saccharose (21%) et du glucose (19%). Elle contient également une grande quantité de minéraux et d'oligo-éléments (environ 300 mg pour 100 g de pomme) jouant un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire. La pomme possède une large gamme de vitamines du groupe B (de 0,007 à 0,3 mg en moyenne pour 100 g de pomme selon les vitamines) ainsi que la vitamine E (0,49 mg), la provitamine A (0,045 mg) et surtout la vitamine C (12 mg) principalement présente dans la peau du fruit (Food-allergens, 2012). Il convient de préciser ici que ces données renvoient à des teneurs moyennes mesurées, la composition du fruit variant significativement selon plusieurs éléments : variétés, origines géographiques,...

Tableau 12. Composition moyenne pour 100g de pomme (Food-allergens, 2012).

Composants	(g)	Minéraux	(mg)	Vitamines	(mg)	Energie	
Eau	85,3	Potassium	145	Vitamine C	12,0	KCalories	54,0
Glucides	11,8	Phosphore	12,0	Vitamine E	0,49	KJoules	226,0
Fibres alimentaires	2,3	Calcium	7,0	Vitamine B3 ou PP	0,3		
Lipides	0,4	Magnésium	6,0	Vitamine B5	0,1		
Protides	0,3	Sodium	3,0	Vitamine B6	0,045		
		Chlorure	2	Provitamine A	0,045		
		Fer	0,48	Vitamine B1	0,035		
		Zinc	0,12	Vitamine B2	0,03		
		Cuivre	0,1	Vitamine B9	0,007		
		Manganèse	0,065				

2. Les bienfaits santé

De nombreuses études épidémiologiques menées ces dernières années tendent à montrer que la consommation de pomme ou de cidre est inversement corrélée aux risques de développer de l'asthme, du diabète, certains cancers ou certaines maladies cardiovasculaires (Boyer and Liu 2004; Crozier, Jaganath et al. 2009).

Liée à la forte teneur en fibres des pommes (2,1 g pour 100 g de fruit, Food-allergens, 2012) et à la bonne proportion entre fibres solubles et insolubles (Gorinstein, Zachwieja et al. 2001), la consommation de pommes est en particulier associée à une diminution des risques de cancer du colon (Thebaudin, Lefebvre et al. 1997). Les fibres ont un effet sur le transit intestinal avec une augmentation de la masse fécale et une diminution du temps de transit (McDougall, Morrison et al. 1996). Cette diminution du temps de transit permet de diminuer le temps d'exposition des agents cancérigènes contenus dans le bol alimentaire permettant ainsi de réduire les risques de cancer.

Les fibres auraient aussi un effet sur l'assimilation du glucose et des lipides de l'alimentation en réduisant la diffusion des nutriments au travers des muqueuses (McDougall, Morrison et al. 1996). Cette propriété permettrait ainsi de diminuer le taux de cholestérols sérique et les risques d'obésité.

La pomme est également l'un des fruits les plus riches en composés phénoliques derrière la canneberge, la fraise, le litchi, le raisin et l'abricot (Sun, Chu et al. 2002; Brat, Georgé et al. 2006). Puisque c'est le fruit le plus consommé en France, la pomme est la première source fruitière en composés phénoliques de l'alimentation (Brat, Georgé et al. 2006).

In vitro, les composés phénoliques ont montré des propriétés anticancéreuses (Lin and Weng 2006) en agissant à différents niveaux : sur la cancérogénèse, l'inflammation ou la réduction des stress oxydatifs responsables de certains cancers (Le Marchand 2002). Ils auraient également des propriétés antiprolifératives (Sun, Chu et al. 2002) liées à leur action sur le cycle cellulaire (Sun and Hai Liu 2008), l'altération de la signalisation intracellulaire et de la biosynthèse de polyamine (Gosse, Guyot et al. 2005) ou encore l'induction de l'apoptose (Gosse, Guyot et al. 2005; Maldonado-Cellis, Bousserouel et al. 2009). Des études ont également montré des effets sur les maladies cardiovasculaires en modifiant, par exemple, le rapport des lipoprotéines haute et faible densités (Lam, Zhang et al. 2008).

En revanche, il reste encore un certain nombre de questions concernant la métabolisation des composés phénoliques et de leur biodisponibilité après ingestion. Les études de Kahle *et al.* (2007) ont montré que leur métabolisation était fortement liée à la nature du composé tandis que Hagl *et al.* (2011) ont montré l'importance de la matrice alimentaire pour leur absorption par le système digestif. Plusieurs études ont montré que la consommation d'aliments riches en flavonoïdes ne permettait pas d'augmenter significativement leur concentration dans le sang (Lotito and Frei 2006). L'augmentation du potentiel antioxydant observé dans le plasma après consommation de pommes serait même davantage liée à l'effet du fructose sur le métabolisme de l'acide urique qu'à la teneur en flavonoïdes (Lotito

and Frei 2004). Il est difficile d'attribuer des effets anticancéreux *in vivo* sachant que les concentrations en composés phénoliques dosés dans le sérum humain sont généralement très inférieures aux doses utilisées *in vitro* pour les tests pharmacologiques (Peer and Murphy 2006).

La pomme, fruit consommé depuis plusieurs milliers d'années, est aujourd'hui une espèce fruitière de première importance mondiale, tant au niveau culturel, économique, que scientifique. Sa consommation est bénéfique pour la santé même s'il reste encore un certain nombre de questions sur les rôles respectifs de chacun de ses constituants.

D. La filière cidricole

Les milliers de variétés de pommes recensées à travers le monde peuvent être classées en fonction de leur utilisation : pommes de table, à cidre, à cuire, à jus, à compote, 4^{ème} gamme... En France, on distingue deux grandes catégories : les pommes de table, ou pommes à couteau et les pommes à cidre. Quelques variétés sont également dédiées à la production des jus. Pour les autres usages, ce sont les variétés de table qui sont utilisées.

Le cidre est une boisson alcoolisée issue de la fermentation des jus de pommes. Les variétés de pommes utilisées pour la préparation des cidres ont des caractéristiques bien particulières et sont très différentes des variétés de pommes de table. En France, le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt recensait plus de 1,7 millions de tonnes de pomme de table récoltées en 2010 contre seulement 0,2 millions de tonnes pour les pommes à cidre (Agreste, 2011).

1. Les pommes à cidre

Les pommes à cidre se différencient des pommes à couteau principalement par une plus grande amertume liée à leur forte teneur en composés phénoliques (Guyot and Drilleau 1998). On peut également noter quelques tendances générales concernant les caractéristiques agronomiques des pommiers à cidre tel que le port buissonnant de l'arbre, une vigueur importante, une alternance de production marquée ainsi qu'une résistance accrue aux différentes maladies, à l'exception du feu bactérien (Bore and Fleckinger 1997) (IFPC, 2011).

En France, les différentes variétés de pomme à cidre sont classées en fonction de leur saveur : Douce ('Clos Renaud' ou 'Douce Coët Ligné'), Douce-amère ('Bisquet' ou 'Douce Moën'), Amère ('Marie Ménard' ou 'Fréquin Rouge'), Acidulée ('Locard Vert') et Aigre ('Petit Jaune' ou 'Judor'). Cette classification porte sur l'acidité et la teneur en composés phénoliques totaux des moûts (Tableau 2).

Tableau 13. Classification des pommes à cidre en fonction de leur acidité et leur teneur en tanins (Tavernier and Jacquin 1959).

Catégories	Acidité (meq/L)	Tanins (g/L)
Douce	A<60	T<2
Douce-amère	A<60	2<T<3
Amère	A<60	T>3
Acidulée	60<A<90	T<2
Aigre	A>90	T<2

L'acidité est estimée en équivalent d'acide malique à l'aide d'un titrimètre. Les principaux acides présents dans le jus de pomme sont les acides malique (847,7 mg/100 mL), quinique (41,8 mg/100 mL), citrique (11,9 mg/100 mL), isocitrique (3,8 mg/100 mL), shikimique (1,4mg/100 mL) et fumarique (0,14 mg/100 mL). Les teneurs indiquées entre parenthèses sont celles dosées en moyenne par Eisele et Drake (2005) dans 175 variétés de pommes.

Les composés phénoliques totaux sont, quant à eux, dosés avec le test de Folin-Ciocalteu dont le protocole est décrit dans le paragraphe II.E.

2. Le cidre

Le cidre était déjà connu du temps des Romains, avec des procédés de fabrication semblables à ceux employés aujourd'hui. En France, les premiers écrits mentionnant la consommation de cidre datent du haut Moyen-âge (VI^{ème} siècle après J.-C.) (Feret 1855) bien que sa consommation courante n'est relatée qu'à partir du XVI^{ème} siècle en Normandie (CRL, 2011). Le Royaume-Uni, l'Allemagne et la Finlande ont également une longue tradition dans la production des cidres et des vins de fruit. La Suède, quant à elle, n'a débuté que récemment le développement de son industrie cidricole. En Belgique et en Espagne, le cidre est couramment consommé comme boisson alternative aux vins pétillants, plus riches en alcool (AICV, 2011). On retrouve également cette boisson au Canada, côtoyant sa variante plus sucrée : le cidre de glace.

Le terme de cidre recouvre des produits différents car chaque pays a ses propres procédés de fabrication et ses variétés de pomme, ce qui fait de chaque cidre un produit unique et spécifique du pays de production (AICV, 2011).

En France, les cidres commercialisés sont traditionnellement issus d'un mélange de plusieurs variétés. La base est généralement formée de variétés douces et douces-amères qui apportent la teneur en sucre et assurent un bon degré d'alcool et une bonne conservation. Des variétés amères peuvent être rajoutées pour donner du « corps » au cidre tandis que les variétés acidulées apportent de la fraîcheur et limitent l'altération du produit en abaissant le pH (Bore and Fleckinger 1997).

3. Les procédés de fabrication

Les pommes à cidre se récoltent à pleine maturité de mi-septembre à fin décembre en fonction des variétés (Bore and Fleckinger 1997). Après stockage, il est nécessaire de les laver pour éliminer les impuretés qui pourraient altérer la qualité des cidres. Les pommes sont ensuite broyées ou râpées puis disposées dans des toiles, empilées les unes sur les autres pour être pressées. On laisse ensuite reposer le jus obtenu pendant deux à cinq jours, jusqu'à formation du « chapeau brun ». Cette couche, qui se forme à la surface du jus, contient, en plus de débris variés, des quantités importantes de pectines (Will, Schulz et al. 2002). Ces polymères de polysaccharides acides, très concentrés dans les pépins de pomme, sont responsables de la gélification des matrices et doivent donc être retirés du jus. Le jus clarifié peut alors être soutiré et envoyé dans de grandes cuves où a lieu la fermentation permettant la transformation du sucre en alcool et en gaz carbonique. Une fois le bon degré d'alcool atteint (6-8°), les cidres sont mis en bouteille. La fermentation peut alors se poursuivre légèrement puis se stabiliser grâce à l'augmentation de la pression du gaz dans la bouteille.

4. L'économie de la filière

L'Europe produit le quart de la production mondiale des boissons alcoolisées et plus de la moitié de la production de vin. Leur commerce permet un bénéfice annuel de neuf milliards d'euro à l'Union Européenne. Comparé aux autres boissons alcoolisées, le cidre arrive loin derrière le vin, la bière et les spiritueux (Commission Européenne, 2011).

Au XX^{ème} siècle, la production cidricole représentait une part importante de l'activité de l'ouest de la France. Depuis les années 1920, la surface plantée en pommiers à cidre au niveau national est en perpétuelle diminution. Elle est ainsi passée de 51,7 millions d'arbres en

1929 à 19,3 millions au début des années 80 et à 9,2 millions d'arbres en 2006 (Viniflor, 2011).

En 2010, 574 000 hectolitres de cidre ont été vendus par la grande distribution, soit un chiffre d'affaire de 111,8 M€. La consommation de cidre est en constante diminution ces dernières années, avec un recul en volume de -2,4% en 2008, -2,3% en 2009 et -5,1% en 2010 qui s'accompagne d'un recul en valeur bien que le prix au litre soit augmenté : +6,3% en 2008, +5,2% en 2009 et +2,9% en 2010 (Viniflor, 2011).

La production et la consommation française de cidre restent très régionalisées, principalement dans l'ouest de la France. Les régions Bretagne et Normandie représentent 31,4% des ventes en volumes en 2010. Elle est également soumise à une saisonnalité forte avec des pics de vente à la Chandeleur, l'Epiphanie et en été (Viniflor, 2011).

Les variétés les plus plantées en 1997 étaient, par ordre d'importance, 'Douce Moën' (12%), 'Douce Coët Ligné', 'Judor', 'Petit Jaune', 'Judeline', 'Juliana', 'Binet Rouge', 'Judaine', 'Kermerrien', 'Avrolles' et 'Clos Renaux' (4%). Ces 11 variétés constituent à elles seules 75% des plantations. Parmi elles, les variétés 'Judor', 'Judeline', 'Juliana' et 'Judaine' sont issues d'un programme de création variétale entrepris par l'INRA en 1953 à la demande de l'interprofession cidricole (Bore and Fleckinger 1997). Les autres sont plus anciennes.

Afin de relancer l'intérêt des consommateurs pour cette boisson, les industriels recherchent de plus en plus à diversifier leur produits. La dernière innovation en matière de cidre est l'utilisation des pommes à chair rouge pour la confection des cidres rosés. La régularité de production des arbres et leur résistance aux bioagresseurs restent des enjeux majeurs d'amélioration pour les sélectionneurs et les producteurs. Les composés phénoliques ont également un intérêt pour les sélectionneurs puisqu'ils sont directement impliqués dans la qualité organoleptique des produits en affectant l'amertume, l'astringence, la couleur et les arômes des cidres (Lea and Arnold 1978; Herrero, Cuesta et al. 1999; Song, Yao et al. 2007).

5. Le projet INNOVACIDRE pour l'amélioration des variétés de pommes à cidre

L'étude du matériel végétal menée par l'Institut Français des Productions Cidricoles (IFPC) a pour objectif d'améliorer le comportement agronomique des variétés actuelles (principalement régularité de production et résistance aux maladies), tout en conservant leur qualité technologique. Elle a également pour objectif l'élargissement des saveurs et des périodes de récolte (Dupont 2010).

En 2007, un nouveau projet de sélection variétale a été initié en collaboration entre l'INRA, l'IFPC et plusieurs coopératives et pépiniéristes privées (Dupont, Laurens et al. 2011). Les objectifs de ce programme de cinq ans étaient, d'une part, de déterminer l'impact du choix des variétés dans la qualité organoleptique des cidres et, d'autre part, d'initier un nouveau cycle de sélection basé sur l'étude de trois descendances. Les principales caractéristiques ciblées pour la création variétale sont : la régularité de production, la résistance durable aux principales maladies du pommier (tavelure, oïdium, feu bactérien, pucerons) et le maintien des qualités cidrières.

En lien avec leur teneur en composés phénoliques, les pommes à cidres ont des caractéristiques de qualité bien différentes des pommes de table. La production et la consommation des cidres français sont très régionalisées et en déclin depuis les années 1920. Pour relancer cette filière, il est important de proposer de nouvelles variétés qui sauront à la fois donner des produits de qualité, attractifs pour le consommateur mais également plus respectueuses de l'environnement (résistance aux maladies) et économiquement viables pour le producteur (alternance de production).

II. Les composés phénoliques

A. Définition

En tant que composés d'origine végétale, les composés phénoliques appartiennent au groupe des métabolites secondaires, groupe qui doit son nom à trois caractéristiques principales (Macheix, Fleuriot et al. 2005) :

- Difficultés pour attribuer aux composés une fonction précise dans la physiologie de la plante
- Nature et concentration des composés très différentes selon les espèces
- Faible remobilisation des composés après leur accumulation

Le terme de composés phénoliques regroupe plusieurs milliers de molécules qui répondent difficilement à une définition simple. D'un point de vue chimique, ils se définissent par leur cycle benzénique porteur d'au moins un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester...). La seule classification sur la structure chimique est insuffisante et il est important de prendre en compte l'origine biosynthétique des molécules.

Le terme de « composés phénoliques » se rapporte ainsi uniquement aux molécules issues de la voie du shikimate ou des poly- β -cétoesters (polyacétates).

Ces définitions sont toujours sujettes à controverse lorsqu'il est question, par exemple, de la lignine. En effet, ce composé est classé parmi les composés phénoliques puisqu'il possède au moins un cycle aromatique et qu'il est issu de la voie du shikimate. Par contre, il est présent chez tous les végétaux, a un rôle central dans la survie de l'individu, et ne répond pas à l'ensemble des remarques strictement associées aux métabolites secondaires.

B. Structure et classification (Macheix, Fleuriet et al. 2005)

Les structures des composés phénoliques se distinguent par leur squelette carboné (nombre de carbone), puis leur degré de modification (oxydation, hydratation, méthylation...) et enfin les liaisons pouvant exister avec d'autres molécules comme des sucres ou d'autres composés phénoliques.

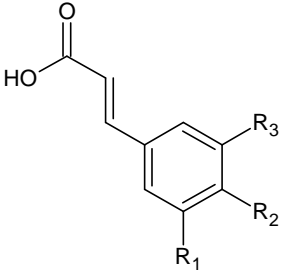
Les composés phénoliques sont communément classés en fonction des voies de biosynthèse impliquées dans leur élaboration. On distingue ainsi une dizaine de grandes classes de composés regroupant des formes simples (phénols simples, acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques, coumarines, naphtoquinones, stilbènes, flavonoïdes, lignanes...) et des phénols condensés issus de la polymérisation des lignanes (lignines) ou de certains flavonoïdes (tanins). Chez le pommier, les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes sont les principaux composés phénoliques présents dans le fruit.

Seules les structures chimiques des composés majoritairement présents dans la pomme et identifiés au cours de ces travaux de thèse seront détaillés dans les paragraphes suivants. Ils ne tiennent pas compte des autres composés également décrits dans le fruit ou le jus comme l'acide protocatéchique, l'acide gallique, l'acide néochlorogénique, les acides caféique, *p*-coumarique et férulique, la cyanidine-3-glucoside, la cyanidine-3-arabinoside, la quercétine-3-arabinopyranoside, le 3-hydroxyphloretin-2'-xyloglucoside et le 3-hydroxyphloretin-2'-glucoside (Kermasha, Goetghebeur et al. 1995; Tsao, Yang et al. 2003; Napolitano, Cascone et al. 2004; Kahle, Krauss et al. 2005; Khanizadeh, Tsao et al. 2008; Wojdylo, Oszmianski et al. 2008; Chagne, Krieger et al. 2012). Les acides caféique, *p*-coumarique et férulique seront cités dans le paragraphe suivant pour expliciter la structure des acides caféoylquinique et coumaroylquinique mais n'ont pas été dosés dans nos échantillons.

1. Les acides hydroxycinnamiques

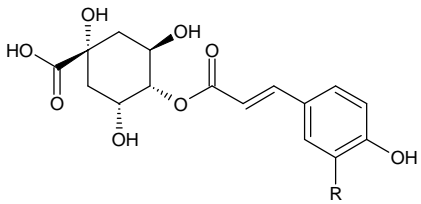
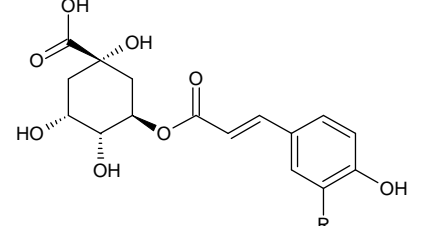
Les acides hydroxycinnamiques sont une structure de base en C₆-C₃ dérivée de l'acide cinnamique (Tableau 3).

Tableau 14. Structure chimique des acides hydroxycinnamiques.

Structure chimique	R ₁	R ₂	R ₃	Nom du composé
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

Ils sont généralement estérifiés, le plus souvent avec l'acide quinique (Tableau 4). Les liaisons à l'acide quinique peuvent se faire sur les trois positions porteuses d'un hydroxyle, en 3', 4' et 5'. L'acide 5'-caféoylquinique, aussi nommé acide chlorogénique, est l'acide majoritaire des pommes. L'acide 4'-p-coumaroylquinique est également présent en grande quantité.

Tableau 15. Structure chimique des esters d'acides hydroxycinnamiques de la pomme.

Structure chimique	R	Nom du composé
	H	Acide 4'-p-coumaroylquinique
	OH	Acide 4'-caféoylquinique
	H	Acide 5'-p-coumaroylquinique
	OH	Acide 5'-caféoylquinique (acide chlorogénique)

2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont un squelette de base en C₆-C₃-C₆, formé de deux cycles aromatiques (A et B) et d'un hétérocycle dihydropyrane (C) comme représenté sur la Figure 4.

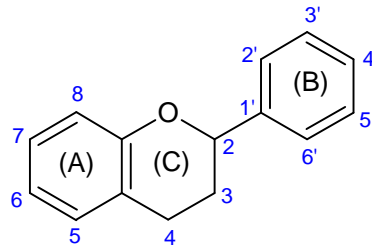


Figure 18. Squelette carboné de base des flavonoïdes.

En fonction du degré d'oxydation du cycle (C), on peut distinguer différentes sous-familles de flavonoïdes. Chez la pomme, on trouve quatre sous-familles majoritaires : les flavanols, les flavonols, les dihydrochalcones et les anthocyanes.

Les flavanols

Les flavanols ont le cycle (C) le plus réduit des flavonoïdes. Les principaux monomères chez la pomme sont la (+)-catéchine et l'un des stéréo-isomères, la (-)-épicatéchine (Tableau 5).

Tableau 16. Structure chimique des monomères de flavanols de la pomme.

Structure chimique	R1	R2	Nom du composé
	OH	H	(+)-Catéchine
	H	OH	(-)-Epicatéchine

Ces monomères ont la propriété de se polymériser pour donner les procyanidines, aussi appelées tanins condensés. La structure des procyanidines les moins condensées est aujourd'hui bien décrite avec des liaisons en C₍₄₎→C₍₈₎ ou C₍₄₎→C₍₆₎ (Tableau 6 ; Figure 5) et peut être déterminée par des méthodes couplées d'analyse (LC-UV, LC-MSⁿ) ou par comparaison avec les standards commerciaux disponibles (He, Pan et al. 2008).

Pour les procyanidines plus condensées, la variabilité structurale est plus importante et les données de la littérature ne permettent pas une identification exacte sans travaux de purification préalable et analyse RMN exhaustive. Par ailleurs, les standards commerciaux au-delà du degré de polymérisation 3 ne sont pas disponibles. Pour la suite de ce rapport, les polymères seront donc nommés en fonction de leur degré de polymérisation (DP) : procyanidine C (trimère), D (tétramère)... et de leur temps de rétention en chromatographie liquide phase inverse : Ca (premier trimère élué), Cb (deuxième élué)...

Tableau 17. Structure chimique des procyanidines majoritaires de la pomme

Structure chimique	Nom du composé
épicatéchine-(4 β →8)-catéchine	Procyanidine B1
épicatéchine-(4 β →8)-épicatéchine	Procyanidine B2
épicatéchine-(4 β →6)-catéchine	Procyanidine B5
[épicatéchine-(4 β →8)] ₂ -épicatéchine	Procyanidine C1

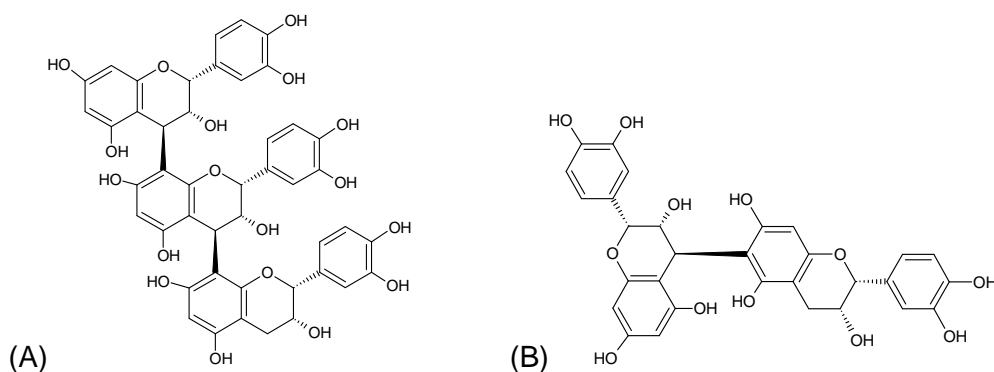
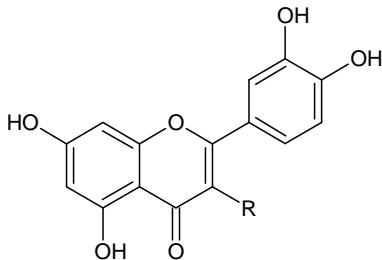


Figure 19. Exemple de structure d'une procyanidine C1 liée en C₍₄₎→C₍₈₎ (A) et de la procyanidine B5 liée en C₍₄₎→C₍₆₎ (B).

Les flavonols

Les flavonols ont une fonction carbonyle, une insaturation en position 2,3 et un groupement hydroxyle additionnel sur le cycle (C). Les différents composés de cette sous-famille se distinguent par le degré d'hydroxylation du cycle B (monohydroxylé en 4' pour le kaempférol, dihydroxylé en 3' et 4' pour la quercétine et trihydroxylé en 3', 4' et 5' pour la myricétine) et par la nature des sucres liés à la génine. Dans la pomme, on trouve principalement les dérivés de quercétine glycosylés en position 3 (Tableau 7).

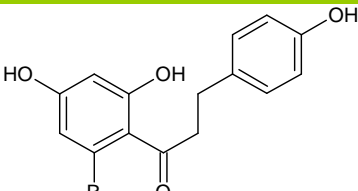
Tableau 18. Structure chimique des flavonols de la pomme.

Structure chimique	R	Nom du composé
	OH	Quercétine
	O-Galactose	Hypérine
	O-Rhamnose	Quercitrine
	O-Glucose	Isoquercitrine
	O-Xylose	Reynoutrine
	O-Arabinose	Avicularine
	O-Rutinosé	Rutine

Les dihydrochalcones

Contrairement aux autres flavonoïdes, les dihydrochalcones n'ont pas subi la cyclisation intramoléculaire conduisant à l'élaboration du cycle pyrane (C). On retrouve deux principaux composés glycosylés dans la pomme dérivés de la phlorétine : la phloridzine et le xyloglucoside de phlorétine (Tableau 8).

Tableau 19. Structure chimique des dihydrochalcones de la pomme.

Structure chimique	R	Nom du composé
	OH	Phlorétine
	O-Glucose	Phloridzine
	O-Glucose-Xylose	2'-O-xyloglucoside de phlorétine

Les anthocyanes

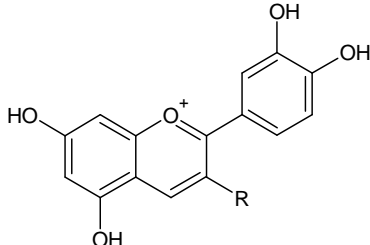
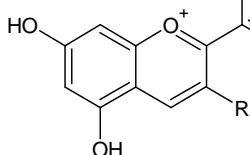
Les anthocyanes ont le niveau d'oxydation du cycle (C) le plus élevé et sont présents sous forme cationique en milieu très acide (pH=1). On distingue là encore les différents anthocyanes en fonction du degré d'hydroxylation de leur cycle (B) et de la nature des sucres associés (Tableau 9).

Les anthocyanes sont responsables de la coloration rouge des pommes. Plusieurs facteurs peuvent intervenir simultanément pour modifier la couleur des anthocyanes comme la nature même des molécules, leur concentration, le pH ou les interactions avec d'autres molécules

du milieu (co-pigments). La couleur d'une solution d'anthocyanes peut ainsi varier du rouge au bleu en passant par toutes les teintes de violet (Macheix, Fleuriet et al. 2005).

Dans la pomme, on ne retrouve principalement qu'un dérivé glycosylé de la cyanidine, l'idéaïne (Duncan and Dustman 1936). Ce composé, responsable de la couleur rouge de la peau des pommes, ne se retrouve qu'en très faible quantité dans les jus de pomme (Mullen, Marks et al. 2007).

Tableau 20. Structure chimique des anthocyanes de la pomme.

Structure chimique	R	Nom du composé
	OH	Cyanidine
	O-galactose	Idéaïne

C. Voies de biosynthèse des composés phénoliques

1. La voie de biosynthèse

La biosynthèse des composés phénoliques du pommier, largement décrite dans la littérature, dérive de la voie du shikimate et de la voie des poly- β -cétoesters (trois unités malonyl CoA) pour l'élaboration de l'unité phloroglucinol (Hoffmann, Besseau et al. 2004; Macheix, Fleuriet et al. 2005; Winkel 2006; Li, Flachowsky et al. 2007; He, Pan et al. 2008; Fowler and Koffas 2009; Gosch, Halbwirth et al. 2009) (KEGG, 2012 ; Figure 6).

La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et la tyrosine ammonia-lyase (TAL) catalysent la désamination non-oxydative de la phénylalanine et de la tyrosine pour donner respectivement l'acide cinnamique et l'acide *p*-coumarique. L'addition d'un groupement hydroxyle en position 4 du noyau aromatique de l'acide cinnamique par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) permet également de former l'acide *p*-coumarique. Sous l'action de la 4-coumarate CoA ligase (4CL), l'acide *p*-coumarique peut former le *p*-coumaroyl-CoA, précurseur des voies de biosynthèse des flavonoïdes, isoflavonoïdes, acides hydroxycinnamiques, dihydrochalcones, lignines et tanins.

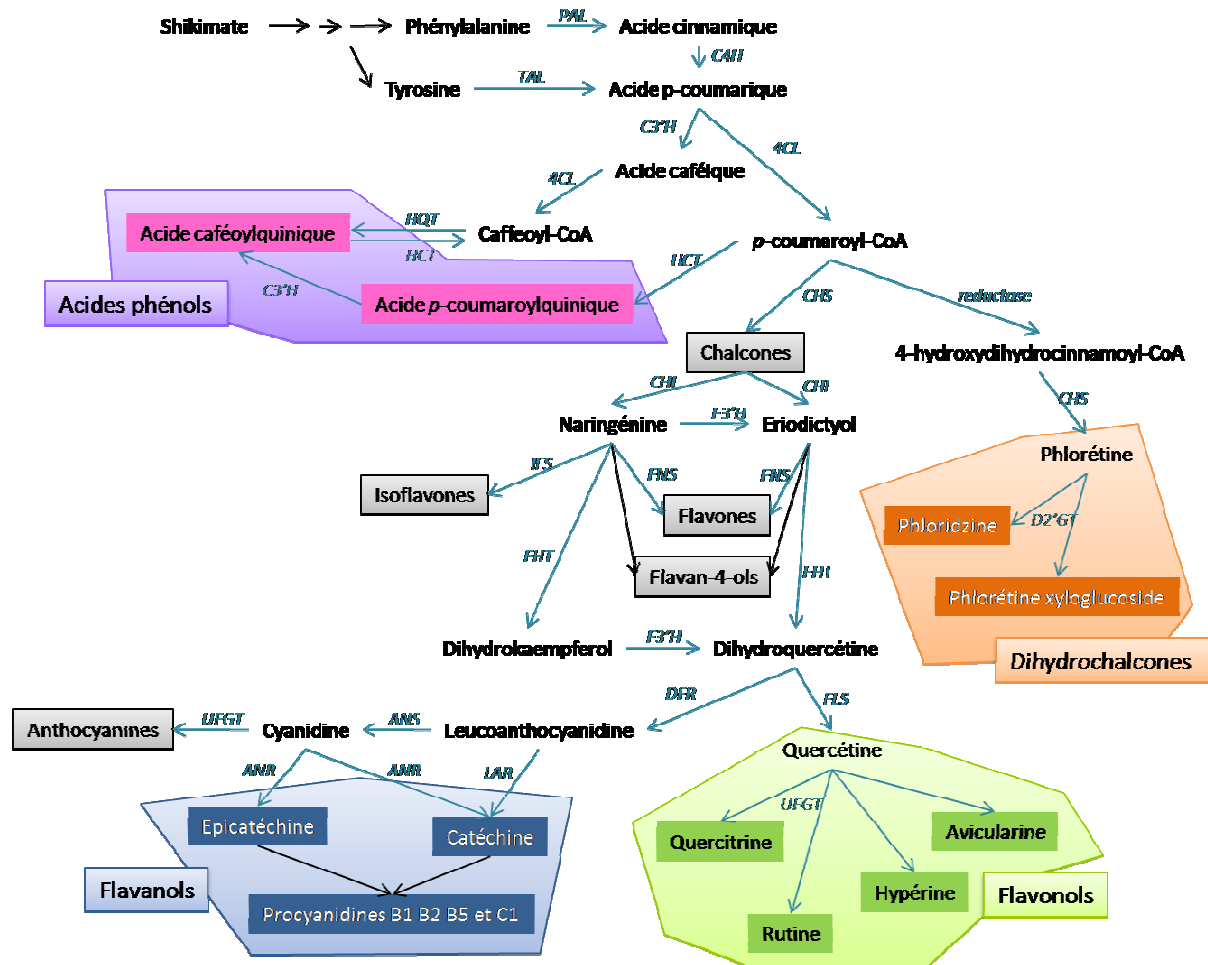


Figure 20. Voie de biosynthèse des composés phénoliques (Hoffmann, Besseau et al. 2004; Macheix, Fleuriet et al. 2005; Winkel 2006; Li, Flachowsky et al. 2007; He, Pan et al. 2008; Fowler and Koffas 2009; Gargouri, Manigand et al. 2009; Gosch, Halbwirth et al. 2009) (KEGG, 2012). 4CL (4-coumarate : CoA ligase), ANR (anthocyanidin reductase), ANS (anthocyanidin synthase), C3'H (p-coumarate 3'-hydroxylase), C4H (cinnamate 4-hydroxylase), CHI (chalcone isomerase), CHS (chalcone synthase), D2'GT (dihydrochalcone 2-O-glucosyltransferase), DFR (dihydroflavanol 4-reductase), F3'H (flavonoid 3'-hydroxylase/flavonoid 3'-monooxygenase), FHT (flavanone 3- β -hydroxylase), FLS (flavonol synthase), FNS (flavone synthase), HCT (shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase), HQT (quinic O-hydroxycinnamoyltransferase), IFS (isoflavanone synthase), LAR (leucoanthocyanidin reductase), PAL (phenylalanine ammonia lyase), TAL (tyrosin ammonia lyase), UFGT (UDP-glucose:anthocyanidin/flavonoid 3-glucosyltransferase).

Les acides hydroxycinnamiques

Sous l'action de la shikimate O-hydroxycinnamoyltransférase (HCT), le *p*-coumaroyl-CoA peut donner soit le *p*-coumaroylshikimate soit le *p*-coumaroylquinique par addition d'une unité shikimate ou quinate respectivement. Ces deux acides peuvent ensuite être oxydés en caféoylshikimate ou en caféoylquinique par action de la *p*-coumarate 3-hydroxylase (C3'H). Les groupements shikimate et quinate peuvent ensuite être retirés par l'HCT pour donner l'entité caféoyl-CoA. Les acides caféoylquiniques peuvent également être directement synthétisés à partir du caféoyl-CoA sous l'action de la quinate O-hydroxycinnamoyltransferase (HQT) (Hoffmann, Besseau et al. 2004).

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés mixtes impliquant non seulement la voie du shikimate mais également celle des poly- β -cétoesters. Ils sont synthétisés à partir du coumaroyl-CoA suivant une chaîne de réactions générant de nombreuses sous-classes chimiques apparentées de composés phénoliques telles que chalcones, flavonols, anthocyanes ou encore tanins. En premier lieu, les chalcones synthétases (CHS) permettent la formation des chalcones en condensant 3 molécules de malonyl-CoA avec le 4-coumaroyl-CoA. Les chalcones servent ensuite de substrat aux chalcones isomérases (CHI) pour former les flavanones. Ces dernières, principalement représentées par la naringénine et l'ériodictyol, peuvent servir de substrat aux flavones synthétases (FNS) pour la synthèse des flavones et aux flavanones 3-hydroxylases (FHT) pour la synthèse des dihydroflavonols. Les dihydroflavonols peuvent ensuite être oxydés en flavonols par les flavonols synthétases (FLS). Les flavonols présents dans la pomme sont les dérivés glycosylés de la quercétine formés sous l'action des UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) (Ju, Liu et al. 1995; Jones, Messner et al. 2003). La dihydroquercétine peut également être réduite par les dihydroflavanols 4-réductases (DFR) pour former les leucoanthocyanidines, précurseurs des flavanols et anthocyanes. Différentes études ont déjà montré la compétition des différentes enzymes pour le même substrat mettant ainsi en évidence un lien de régulation fort entre ces deux groupes de composés (Joung, Kasthuri et al. 2003; Han, Vimolmangkang et al. 2012). En effet, les leucoanthocyanidines peuvent être réduites en catéchine sous l'action des leucoanthocyanidines réductases (LAR) ou être synthétisées en anthocyanes sous l'action des anthocyanes synthétases (ANS). Les anthocyanes sont présents dans la pomme sous forme glycosylée. On trouve principalement l'idéaïne, issue de l'ajout d'un galactose par les UFGT (Ju, Liu et al. 1995). Les anthocyanes peuvent également être réduits par les anthocyanidines réductases (ANR) pour former l'épicatéchine et son épimère la catéchine (Gargouri, Manigand et al. 2009). La catéchine et l'épicatéchine peuvent ensuite se polymériser pour former les procyanidines (He, Pan et al. 2008). *In vitro*, la polymérisation de ces composés peut se faire spontanément (He, Pan et al. 2008) mais l'étude de mutants chez l'orge (Jende-Strid 1993) et les récents travaux de cartographie QTL pour le degré de polymérisation moyen des procyanidines réalisés chez la vigne laisse supposer l'existence de régulateurs génétiques (Huang, Doligez et al. 2012).

Si les chalcones sont les précurseurs de l'ensemble des composés précédemment décrits, leurs parents hydrogénés, les dihydrochalcones, sont un peu en périphérie du schéma principal puisque pour leur synthèse, le 4-coumaroyl-CoA est tout d'abord réduit en 4-hydroxydihydrocinnamoyl-CoA par une réductase avant de servir de substrat aux CHS pour former la phlorétine. Dans la pomme, ce sont les formes glycosylées de la phlorétine qui sont

retrouvées en grande quantité dans le fruit ou les feuilles suite à l'addition de sucres par les dihydrochalcones 2'-O-glucosyltransferase (D2'GT) (Gosch, Halbwirth et al. 2009). Grâce à la séquence du pommier, la réductase en amont de la synthèse des dihydrochalcones est en cours d'identification et de validation (Dare, communication orale ICP2012 et Martens, poster RGC6).

2. Localisation cellulaire des enzymes de biosynthèse

La voie de l'acide shikimique conduisant à la synthèse de la tyrosine et de la phénylalanine n'est présente que chez les végétaux et les micro-organismes et serait localisée dans les chloroplastes. Les acides aminés produits seraient ensuite transportés dans le cytosol pour la synthèse des composés phénoliques (Weaver and Herrmann 1997).

Des études d'immunolocalisation ont permis de mettre en évidence la localisation d'une majorité des enzymes de biosynthèse des phénylpropanoïdes au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Macheix, Fleuriet et al. 2005). En effet, des complexes d'enzymes formés des C4H, F3'H et F3'5'H liées entre elles par des interactions protéines-protéines ont été mis en évidence à la surface de cet organite. Certaines enzymes de la biosynthèse ont également été mises en évidence au niveau de la vacuole et du noyau (Zhao and Dixon 2009). Plus particulièrement, les procyanidines seraient polymérisées dans la vacuole, après transport des catéchines glycosylées dans ce compartiment, avant d'être transportés dans la paroi (Zhao and Dixon 2009).

Les composés phénoliques sont acheminés et stockés principalement dans la vacuole et la paroi cellulaire. Cependant, ils peuvent également être présents dans le cytosol, le réticulum endoplasmique, les chloroplastes, le noyau, les vésicules golgiennes ou l'espace intercellulaire, ce qui laisse supposer un système de transport extrêmement élaboré et capable de s'adapter aux conditions de l'environnement. Celui-ci serait en partie assuré par les vésicules produites par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi ainsi que par les transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) et MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) assurant l'entrée et la sortie de ces composés dans les différents organites (Zhao and Dixon 2009).

3. Régulation de la voie de biosynthèse

Les métabolites secondaires sont associés au potentiel adaptatif des plantes à leur environnement. Différents facteurs biologiques, physiques et chimiques peuvent réguler leur synthèse et leur accumulation dans la plante.

La biosynthèse des composés phénoliques est très fortement régulée au cours du développement du fruit. Une très forte teneur en composés phénoliques est observée un mois après la floraison. Cela est dû à la forte activité des enzymes de biosynthèse dans le fruit au cours de la phase de division cellulaire. Au cours de la maturation, cette activité est fortement diminuée et la teneur globale en composés phénoliques diminue, aussi bien dans la peau que dans la chair. Plus précisément, les teneurs en dihydrochalcones et acides hydroxycinnamiques diminuent fortement, tandis que celles en flavanols restent relativement stables (Treutter 2001). La teneur en anthocyanes et flavonols, quant à elle, augmente au cours de la maturation, en lien avec une augmentation de l'activité de la CHI (Lancaster and Dougall 1992; Ju, Liu et al. 1995). L'étude de Burda et al. (1990) a également mis en évidence une diminution de la teneur en composés phénoliques au cours du développement du fruit. Par contre, ils constatent une stabilité de ces teneurs au cours de la maturation du fruit et de la conservation au froid (Burda, Oleszek et al. 1990). Ces données sont en accord avec l'étude de Ju et al. (1995) qui montrent une forte augmentation de l'activité PAL après la floraison puis une diminution rapide et enfin la stabilité de cette activité enzymatique au cours du développement du fruit (Ju, Yuan et al. 1995).

La lumière (Jakopic, Stampar et al. 2009), la teneur en nutriment du sol, les blessures ou attaques de pathogènes (Treutter 2001; Lillo, Lea et al. 2008), la température (Ubi, Honda et al. 2006) ou encore les signaux hormonaux et métaboliques endogènes (Moalem-Beno, Tamari et al. 1997) peuvent intervenir dans la synthèse des composés phénoliques en agissant sur les facteurs de transcription de type Myc, Myb, WD40-like protein, WRKY, MADS homeodomain genes, TFIIIA-like proteins « WIP » et bZIP (Weisshaar and Jenkins 1998; Ban, Honda et al. 2007; Li, Flachowsky et al. 2007; He, Pan et al. 2008; Mellway, Tran et al. 2009; Lin-Wang, Micheletti et al. 2011; Xie, Li et al. 2012). Chez le pommier, les facteurs de transcription MYB ont particulièrement été étudiés pour la synthèse des anthocyanes. Les gènes MdMYB1, MdMYBA et MdMYB10 seraient en fait différents allèles d'un même gène localisé sur le bras du groupe de liaison (GL) 9 (Chagne, Carlisle et al. 2007; Lin-Wang, Bolitho et al. 2010). MdMYB1 et MdMYBA sont impliqués dans la synthèse des anthocyanes dans la peau des fruits, tandis que MdMYB10 est responsable de l'accumulation des anthocyanes dans la peau et la chair du fruit, ainsi que dans les feuilles (Tacos, Jaffe et al. 2006; Ban, Honda et al. 2007; Espley, Hellens et al. 2007). De plus, ces facteurs de transcription seraient capables de s'associer pour former des complexes régulateurs des enzymes de biosynthèse, notamment les facteurs de transcription MYB, bHLH et WD40 (Ramsay and Glover 2005; Espley, Hellens et al. 2007; An, Tian et al. 2012).

Chez le pommier, le type de sol peut aussi avoir une incidence sur la teneur en composés phénoliques en particulier sur les concentrations en catéchines, dihydrochalcones et acide chlorogénique. Il semble également y avoir un impact de la charge de l'arbre sur la teneur en composés phénoliques des fruits avec une augmentation de la teneur des acides hydroxycinnamiques et des monomères de flavanols pour les arbres les moins chargés (Travers 2004).

Les différentes études menées pour estimer l'effet de l'année sur la teneur en composés phénoliques des pommes montrent des résultats contradictoires. Ainsi, l'année peut n'avoir aucun effet sur les dosages, avec des résultats très reproductibles d'une année sur l'autre, ou bien être l'un des principaux facteurs de variation (Van der Sluis, Dekker et al. 2001; Lata 2007). La part génétique dans la teneur en composés phénoliques reste toutefois très importante par rapport aux effets mesurés de l'année ou de l'interaction génotype x année. Les flavonols semblent en revanche plus sensibles à ces changements environnementaux que les autres classes de composés, probablement dû à leur plus grande sensibilité à la lumière et à la température (Volz and McGhie 2011).

D. Les composés phénoliques de la pomme

1. Rôle pour la plante

Les composés phénoliques sont connus pour avoir diverses fonctions chez les végétaux au niveau de la physiologie de la plante et des relations avec son environnement (Macheix, Fleuriet et al. 2005). L'interaction des groupements hydroxyles et des électrons du cycle aromatique entraîne la formation de radicaux libres pouvant interagir avec les espèces réactives de l'oxygène, très dommageable pour les cellules vivantes. On parle alors de capacité antioxydante, principal rôle physiologique attribué aux polyphénols (Colin-Henrion 2008).

Autre rôle physiologique majeur associé aux polyphénols : le rôle de soutien des lignines présentes dans toutes les plantes vasculaires actuelles ou fossiles. La présence de ce polymère complexe dans les tissus vasculaires assure également la conduction de l'eau dans toute la plante. On attribue ainsi l'une des étapes clef de l'évolution des végétaux à l'intégration des lignines dans les parois cellulaires qui a permis, il y a 480 millions d'années environ, le passage des plantes aquatiques vers les plantes vasculaires aériennes (Macheix, Fleuriet et al. 2005).

Par ailleurs, en tant que composés phénoliques, ils absorbent tous dans le domaine spectral de l'ultraviolet (UV) (Solovchenko and Merzlyak 2003). Leur présence dans les tissus les plus externes des plantes (épiderme des feuilles, des fruits...) permettrait ainsi de limiter la pénétration de ces rayonnements et de protéger les structures végétales sensibles comme l'ADN, les pigments photosynthétiques, les lipides membranaires... (Macheix, Fleuriet et al. 2005).

Différents travaux ont mis en évidence le rôle régulateur des flavonoïdes au niveau de la transcription de certains gènes, de l'activité de certaines enzymes, des voies de signalisation, des trafics vésiculaires (notamment celui impliqué dans le transport de l'auxine) ou encore au niveau de la fluidité membranaire (Peer and Murphy 2006).

Des mutants d'*Arabidopsis* affectés au niveau de la biosynthèse des composés phénoliques ont également permis de mettre en évidence l'implication de ces composés au niveau de la dormance, de la germination et de la longévité des graines ainsi que de la morphologie des semences (poids et taille) (Debeaujon, Leon-Kloosterziel et al. 2000).

Les polyphénols et certains de leurs dérivés ont aussi de très nombreuses fonctions au niveau des relations de la plante avec son environnement. On peut noter l'appartenance de certains composés à la classe des phytoalexines (e.g. scopolétine, resvératrol) ou comme agents d'allélopathie toxiques pour certaines espèces (e.g. juglone). A l'inverse, ils peuvent aussi avoir un rôle positif comme attracteur des pollinisateurs (e.g. anthocyanes) et régulateurs de certaines symbioses bactériennes (e.g. lutéoline, génistéine) ou mycorhiziennes (e.g. formononétine) (Macheix, Fleuriet et al. 2005; Peer and Murphy 2006).

Plus particulièrement pour le pommier, l'infection par *Erwinia amylovora* (bactérie responsable de la maladie du feu bactérien), *Venturia inaequalis* (champignon responsable de la tavelure) ou différents champignons responsables de maladies de conservation entraînent une modification du contenu et/ou du profil phénolique des fruits ou des feuilles (Sumbali and Mehrotra 1981; Leser and Treutter 2005; Tomankova, Luhova et al. 2006; Pontais, Treutter et al. 2008). L'étude de Mayr et al. (1997) a montré que l'accumulation de flavanols dans les feuilles était corrélée à une plus grande résistance des plantes à la tavelure (Mayr, Michalek et al. 1997). De plus, le traitement avec l'inhibiteur de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) : le L-2-aminoxy-3-phenylpropionic acid (AOPP) sur des plantes sensibles et résistantes à la tavelure, augmente la sensibilité des plantes sensibles sans affecter la résistance des autres. Ces résultats confirment l'importance de la voie des composés phénoliques dans la résistance des plantes et l'existence de mécanismes de défense majeurs, non liés avec la voie des composés phénoliques. C'est le

cas notamment du gène de résistance *Vf* dont la protéine est impliquée dans les interactions gène-pour-gène avec un éliciteur du champignon (Gessler and Pertot 2012). D'autre part, les pommiers transgéniques sur-exprimant le gène *Lc* du maïs (*Leaf colour*, facteur de transcription de la famille des bHLH) ont davantage de flavanols et d'anthocyanes que les plantes non transformées et sont également plus résistant à la tavelure et au feu bactérien (Flachowsky, Szankowski et al. 2010). Mais les tests de toxicité de la sève des plantes transformées sur les bactéries *E. amylovora* montrent que ces composés ne sont pas directement responsables de la résistance des plantes. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Pontais et al. (2008) qui proposent comme hypothèse pour la résistance au feu bactérien, la synthèse de produits d'oxydation ayant un effet bactéricide à partir des dihydrochalcones (Pontais, Treutter et al. 2008).

2. Répartition des composés phénoliques

Les composés phénoliques, comme l'ensemble des métabolites secondaires se répartissent très inégalement entre les espèces végétales, les variétés, les stades d'évolution physiologique et les organes ou tissus considérés (Macheix, Fleuriet et al. 2005).

Comme notre étude porte exclusivement sur la teneur en composés phénoliques des pommes et jus de pomme, seule la répartition de ces composés au sein du fruit sera présentée dans cette partie.

De nombreuses études se sont portées sur la teneur des différents composés phénoliques des pommes. D'importantes différences sont à noter selon les variétés considérées. Les 28 variétés de pomme de table analysées par Wojdilo et al. (2008) montrent des teneurs totales en composés phénoliques allant de 523 mg/Kg pour la variété 'Topaz' à 2 724 mg/Kg pour 'Fialka'. Pour chaque composé dosé, on note également de grands écarts entre les variétés pouvant aller jusqu'à 200 fois la teneur en acide chlorogénique et 1 000 fois la teneur en anthocyanes.

D'une manière générale, les variétés à cidre sont plus riches en polyphénols totaux que les variétés de table. L'étude de Tsao et al. (2003) montre des concentrations comprises entre 0,94 et 2,45 g/Kg de matière fraîche pour 8 variétés de pommes de table tandis que l'étude de Sanoner et al. (1999) montre des concentrations comprises entre 1,04 et 6,99 g/Kg de matière fraîche pour 12 variétés de pommes à cidre. De même pour les jus, l'équipe de Kahle (2005) montre des teneurs comprises entre 154,4 et 178 mg/L pour des variétés de pommes à couteau et entre 261 et 970 mg/L pour des variétés de pommes à cidre. C'est

d'ailleurs cette forte teneur en composés phénoliques qui confère aux pommes à cidre leurs fortes amertume et astringence caractéristiques.

Les flavanols sont généralement la classe majoritaire des composés présents dans l'ensemble du fruit avec la présence d'un grand nombre de procyanidines plus ou moins condensées, suivies des acides hydroxycinnamiques, surtout présents dans la chair. Suivant la variété considérée, l'acide chlorogénique, l'épicatéchine ou la procyanidine B2 sont généralement les composés majoritaires (Podsdek, Wilska-Jeszka et al. 2000; Alonso-Salces, Korta et al. 2001; Tsao, Yang et al. 2003). Les dihydrochalcones sont surtout présentes dans le trognon, et constituent la classe majoritaire de ce tissu. Les flavonols et les anthocyanes sont presque exclusivement présents dans la peau. Quelques variétés comme 'Red Delicious' ou 'Golden Delicious' ont de la quercitrine en faible quantité dans la chair (Guyot, Marnet et al. 1998; Tsao, Yang et al. 2003).

On peut également noter une répartition très inégale de certains composés entre les différents tissus du fruit. La chair est le compartiment qui contient la plus grande partie des composés phénoliques du fruit (65% des polyphénols dosés pour la variété à cidre 'Kermerrien'). Viennent ensuite la peau (24%), le trognon (10%) et enfin les pépins (1%) (Guyot, Marnet et al. 1998). Ce classement ne tient cependant pas compte de la taille relative des différents compartiments. Rapportés en milligrammes par grammes de matière sèche, la peau est le compartiment le plus riche en composés phénoliques, suivi des pépins, du trognon et enfin de la chair (données pour les variétés 'Jonagold' et 'Elstar') (Awad, De Jager et al. 2000).

3. Importance des composés phénoliques pour la filière cidre

Les composés phénoliques interviennent dans les principales qualités organoleptiques des cidres à savoir l'amertume, l'astringence, la couleur et la formation d'une partie des arômes (Guyot and Drilleau 1998).

Les composés phénoliques sont responsables de l'amertume et de l'astringence des cidres. L'étude de Lea et Arnold (1978) a montré que les procyanidines avec un faible degré de polymérisation (DP) ($2 < DP < 5$) étaient plutôt responsables de l'amertume tandis que ceux avec un plus fort DP ($6 < DP < 10$) étaient plutôt responsables de l'astringence. Ces propriétés sont liées à la capacité des procyanidines à se lier aux protéines. La sensation d'astringence est causée par l'interaction des procyanidines avec les protéines salivaires (principalement des glycoprotéines) tandis que celle de l'amertume est due à l'interaction des procyanidines

avec les récepteurs protéiques de l'amertume (Travers 2004). Les procyanidines ne sont toutefois pas les seules molécules impliquées dans l'astringence ou l'amertume. Les produits formés par l'oxydation des composés phénoliques natifs peuvent également avoir un rôle (Guyot and Drilleau 1998).

Les composés phénoliques interviennent également dans le potentiel aromatique des cidres. En effet, après hydrolyse des esters, les acides hydroxycinnamiques peuvent servir de précurseurs aux phénols volatils formés au cours de la fermentation (Herrero, Cuesta et al. 1999).

La structure chimique des composés phénoliques leur confère une grande capacité d'oxydation qui peut être spontanée, au simple contact de l'air ou catalysée par la polyphénoloxydase (PPO) (cf. § II.D.4.). Les études menées par Song et al. (2007) pour comprendre le phénomène de brunissement des jus de pomme ont montré que les teneurs en procyanidines, catéchine et phloridzine était davantage corrélées avec le degré de brunissement des jus mesuré par absorbance à 420 nm (corrélation >0,8) que celle de l'acide chlorogénique (0,6).

4. Modification de la teneur en composés phénoliques lors de la préparation des cidres

Le pressurage est l'étape qui affecte le plus la teneur en composés phénoliques. Les monomères (catéchine et épicatechine) et plus encore les polymères (procyanidines) de flavanols sont les plus touchés par cette étape avec un taux de transfert du fruit au jus inférieur à 50% (Guyot, Marnet et al. 2003). L'affinité des tannins pour les constituants des parois cellulaires explique en grande partie leur rétention dans le moût (Renard, Baron et al. 2001). Les flavanols sont également moins concentrés dans le jus que dans le fruit entier. Leur localisation dans la peau du fruit peut expliquer leur faible extractabilité, les jus étant principalement extraits de la chair du fruit (Perez-Ilzarbe, Hernandez et al. 1997).

Même si la période de maturation ne modifie pas la teneur en composés phénoliques dans le fruit, il semblerait qu'elle joue sur la structure de la paroi qui réagit différemment au pressurage, permettant une libération des composés phénoliques (en particulier les flavanols) plus efficace lors de la préparation des cidres.

La variété de pomme considérée a également une importance sur le taux de transfert des composés lors du pressurage. Il est compris entre 56,9% pour la variété 'Avrolles' et 77.2% pour la variété 'Kermerrien' pour des fruits récoltés à pleine maturité (régression d'amidon 100%) (Guyot, Marnet et al. 2003).

L'oxygénation du jus a un impact fort sur la teneur en composés natifs, là encore dépendant de la variété considérée. La désorganisation des cellules liées au broyage entraîne la mise en contact de l'enzyme PPO, stockée dans les chloroplastes, et des composés phénoliques. En présence d'oxygène, l'enzyme peut catalyser la formation des O-quinones, majoritairement à partir des acides hydroxycinnamiques (Oszmianski and Lee 1990). Les O-quinones, composés hautement réactifs, peuvent par la suite oxyder les autres composés phénoliques pour donner des pigments bruns (Vaughn, Lax et al. 1988; Kim, Seo et al. 2001).

La centrifugation des jus pour l'obtention des jus clarifiés a relativement peu d'effet sur la teneur en composés phénoliques. Les flavanols sont les plus affectés avec une diminution de leur concentration et de leur degré de polymérisation moyen s'expliquant par l'élimination des procyanidines liées à des fragments de paroi cellulaire en suspension dans le jus brut (Guyot, Marnet et al. 2003).

Contrairement à ce qui a pu être décrit pour le vin (Sacchi, Bisson et al. 2005), l'étape de fermentation semble avoir peu d'effet sur la teneur en composés phénoliques (Nogueira, Guyot et al. 2008). Les principaux composés affectés sont les acides hydroxycinnamiques pouvant servir de précurseurs à la synthèse de composés aromatiques.

La nature et la teneur en composés phénoliques des pommes ont largement été étudiées et décrites dans la littérature. Dans le fruit, les groupes de polyphénols majoritaires sont les flavanols (monomères et polymères), les acides hydroxycinnamiques, les flavonols, les dihydrochalcones et les anthocyanes. Les teneurs de chacun des composés varient considérablement d'une variété à l'autre, tout particulièrement entre les variétés de pommes à cidre et de pommes de table.

La voie de biosynthèse de ces composés est également bien connue avec la mise en évidence des enzymes impliquées dans la synthèse des différents composés et de certains facteurs de transcription régulateurs.

Dans la plante, les composés phénoliques ont différents rôles dans la physiologie et dans l'interaction de la plante avec son environnement. Dans le fruit, ces composés peuvent également avoir un impact fort sur la qualité organoleptique des cidres en jouant sur l'astringence, l'amertume, la coloration et le potentiel aromatique des produits.

E. Les méthodes d'analyse

Il existe différentes méthodes pour doser les composés phénoliques. La méthode de Folin-Ciocalteu permet, par exemple, d'estimer la teneur totale en composés phénoliques présents en solution. Le réactif de Folin utilisé entraîne la formation de complexes colorés en bleu suite à l'oxydation des composés présents dans l'extrait. L'intensité de la couleur de la solution est proportionnelle à la concentration en composés réducteurs et peut être quantifiée par colorimétrie à 720 nm. Ce test reste une estimation de la teneur en composés phénoliques totaux car il dose tous les composés réducteurs présents en solution. Les résultats obtenus sont donc généralement surestimés (Sanoner 2001).

Les méthodes de chromatographie liquide sont plus adaptées à des analyses plus spécifiques des composés phénoliques puisqu'elles permettent de les doser individuellement.

1. Séparation des composés par chromatographie liquide

La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) est probablement la méthode la plus utilisée actuellement pour analyser les composés phénoliques d'un extrait. Elle a l'avantage d'utiliser peu de matériel végétal, de travailler sur les composés phénoliques individuellement, de pouvoir associer dans un même temps des données qualitatives et quantitatives pour chacun d'eux et de présenter une très bonne répétabilité.

Pour l'analyse des composés phénoliques, on utilise généralement des colonnes en phase inverse (apolaires) de type C18. Les solvants organiques (méthanol ou acétonitrile) sont alors couramment employés pour l'élution des molécules. Les composés sont séparés au cours du temps en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. Dans les mêmes conditions d'analyse, le temps de rétention (R_t) du composé sur la colonne est caractéristique de la molécule analysée.

Dans le cas d'extraits végétaux complexes comme le jus de pomme, les temps d'analyse nécessaires à la séparation des composés peuvent être très longs. Il est alors intéressant d'utiliser une Chromatographie Ultra Haute Performance (UHPLC) plutôt qu'une HPLC. La différence entre ces deux méthodes repose sur la granulométrie des particules de la phase stationnaire utilisée dans la colonne chromatographique. Celles-ci ont un diamètre inférieur à 2 μm en UHPLC alors qu'elles sont de l'ordre de 3 à 5 μm en HPLC. La diminution de la granulométrie des colonnes permet d'augmenter sensiblement la surface spécifique de la phase stationnaire et ainsi d'améliorer les paramètres chromatographiques, en particulier en

réduisant les temps d'analyse par rapport à l'HPLC. Cette réduction de taille engendre un accroissement de la perte de charge subie par l'éluant liquide lors de la traversée de la phase stationnaire ce qui nécessite des pressions de travail bien supérieures en UHPLC (entre 600 et 1000 bars) en comparaison de l'HPLC (généralement entre 150 et 350 bars).

2. Identification des composés par spectrométrie

A ce jour, selon certains auteurs, plus de 8000 structures différentes de composés phénoliques ont été identifiées dans le règne végétal (Quideau, Deffieux et al. 2011). La diversité de la voie de biosynthèse de ces composés (glycosylation, alkylation, acétylation...) engendre une grande variabilité structurale qui peut compliquer l'identification exacte de ces composés. De nombreuses méthodes peuvent être envisagées pour recenser les composés phénoliques présents dans un échantillon selon les besoins analytiques (qualitatifs ou quantitatifs) et la nature des molécules présentes (standard commercial disponible ou constituant à structure originale).

Pour l'identification complète et sans ambiguïté d'un composé original, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) mono et bidimensionnelle demeure la méthode la plus utilisée (Stobiecki and Kachlicki 2006). Il faut néanmoins considérer l'important travail de préparation de l'échantillon nécessaire pour l'analyse des composés purifiés (obtenus par HPLC-préparative ou flash chromatographie par exemple).

D'autres méthodes d'analyses sont également disponibles, et couplées entre elles, peuvent aboutir à l'identification partielle d'un composé. Il s'agit principalement de la spectrophotométrie UV et de la spectrométrie de masse qui peuvent être couplées en sortie de chromatographie liquide. Associées à l'utilisation de standards commerciaux pendant les analyses et en s'appuyant sur leur temps de rétention, leur masse, leur profil de fragmentation et leur spectre d'absorption en UV, il est possible d'identifier sans ambiguïté un composé connu.

La spectrophotométrie UV

Grâce à leur noyau aromatique, tous les composés phénoliques absorbent dans le domaine UV. Les profils des spectres d'absorption rencontrés se distinguent quelque peu selon les classes chimiques des composés phénoliques (nombre de fonction phénolique, insaturation en position 2,3, présence d'un groupe carbonyle en position 4...). Les anthocyanes ont en plus la particularité d'absorber également dans le visible (Figure 7).

Les esters d'acides hydroxycinnamiques ont un maximum d'absorbance autour de 330 nm précédé d'un épaulement vers 300 nm. Les flavanols et les dihydrochalcones ont un pic d'absorbance autour de 280 nm et les flavonols ont un maximum d'absorbance autour de 375 nm avec un deuxième pic vers 265 nm. Les spectres d'absorptions peuvent toutefois subir de légères modifications liées par exemple aux modifications chimiques des molécules (Tsao and Yang 2003). Les spectres UV fournissent ainsi une première information concernant la classe chimique d'appartenance de ces composés phénoliques. Les maxima d'absorbances ou toutes autres longueurs présentant un facteur de réponse satisfaisant peuvent ensuite être utilisés pour doser les composés.

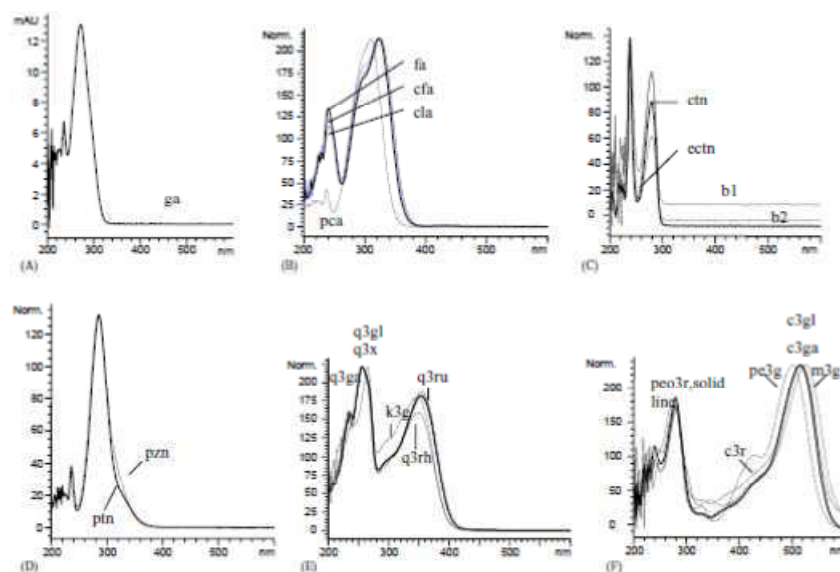


Figure 21. Spectre UV des principaux composés phénoliques de la pomme (Tsao, Yang et al. 2003) : (A) : acide gallique ; (B) : acides hydroxycinnamiques ; (C) : monomères et dimères de flavanols ; (D) : dihydrochalcones ; (E) : flavonols ; (F) : anthocyanes. ga : acide gallique ; cla : acide chlorogénique ; cfa : acide caféique ; fa : acide férulique ; ectn : épicatechine ; ctn : catéchine ; b1 : procyanidine B1 ; b2 : procyanidine B2 ; pzn : phloridzine ; ptn : phlorétine ; q3gl : isoquercitrine ; q3x : reynoutrine ; q3ga : hyperine ; q3ru : rutine ; q3rh : quercitrine ; k3g : kaempferol-3-glucoside ; peo3r : peonidin-3-rutinoside ; pe3g : pelargonidin-3-glucoside ; c3r : cyanidin-3-rutinoside ; c3gl : cyanidin-3-glucoside ; c3ga : ideaine ; m3g : malvidin-3-glucoside.

La spectrométrie de masse

Les composés phénoliques, en tant que composés organiques polaires de bas poids moléculaires, figurent parmi les analytes particulièrement adaptés à une analyse par spectrométrie de masse. Ces analyses réalisées en aval du système chromatographique permettent de connaître le rapport masse/charge (m/z) d'ions pseudomoléculaires chargés positivement ou négativement des composés sortant de la colonne de chromatographie.

Brièvement, les spectromètres de masse sont constitués de trois parties distinctes :

- la source d'ionisation
- l'analyseur
- le détecteur

La source d'ionisation permet de charger positivement ou négativement les molécules par ajout ou suppression d'un proton. Les masses alors observées seront du type $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$. Selon la source utilisée, des adduits d'origines variées peuvent apparaître. Par exemple, l'ion sodium conduit généralement à l'observation d'un signal de masse $[M+Na]^+$. Il existe différents types de source d'ionisation. Celle utilisée dans ce travail de thèse était de type électrospray (Figure 8). L'échantillon qui entre dans le spectromètre passe à travers un fin capillaire soumis à un champ électrique intense. De fines gouttelettes chargées se forment alors et s'évaporent progressivement grâce au chauffage de la source et au flux du gaz de nébulisation. L'augmentation de la densité de charge dans la gouttelette entraîne son éclatement, formant des microgouttelettes contenant les composés chargés. Ce type de source permet d'ioniser les molécules en douceur afin de limiter la fragmentation des composés étudiés.

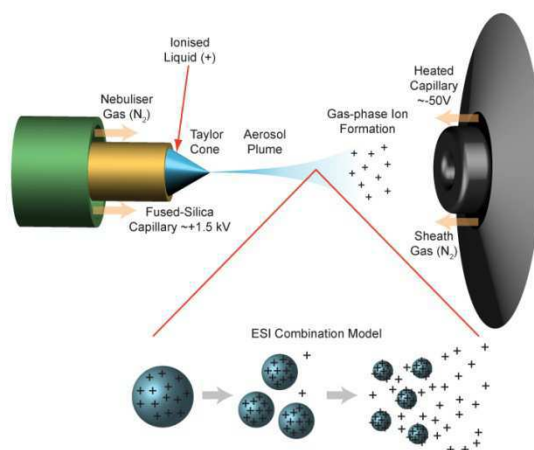


Figure 22. Représentation d'une source d'ionisation électrospray (Lamondlab, 2011).

L'analyseur peut être de différents types. Les plus communs sont les quadripôles, les trappes d'ions ou les temps de vol (TOF). Plusieurs analyseurs peuvent être branchés en série pour permettre la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Les trappes d'ions permettent de piéger les ions pour faire de la fragmentation spécifique permettant d'accéder aux relations MS/MS des molécules étudiées (piégeage d'ions ou de fragments pouvant à leur tour être fragmentés). Le spectromètre de masse utilisé au cours de ces travaux est un triple quadripôle. Le premier quadripôle peut être utilisé pour sélectionner une masse m/z en particulier (ce qui permet d'éliminer tous les autres produits co-élués). La seconde partie du spectromètre est en réalité une chambre de fragmentation et non véritablement un

quadrupôle. Enfin la dernière partie est un second quadrupôle qui peut également être utilisé pour sélectionner un fragment particulier parmi ceux produits dans la chambre de fragmentation. Cette utilisation particulière est appelée mode SRM (Selected Reaction Monitoring) et permet d'obtenir une réponse spécifique pour chaque composé puisqu'il est caractérisé par l'obtention d'un fragment défini à partir d'un ion parent précis. Cette méthode SRM est particulièrement adaptée aux travaux de quantification car elle permet de réduire significativement le bruit de fond de l'analyse et les co-élutions possibles (Jemal 2000).

Enfin, le détecteur permet de transformer les ions en signal électrique proportionnel à la quantité d'ions. Le signal est également amplifié pour permettre le traitement des données par informatique.

3. Quantification des composés

Principe de quantification

Généralement pour l'analyse des polyphénols, les études de quantification sont réalisées par couplage LC-UV ou LC-MS. Quel que soit le mode de détection retenu, il est nécessaire d'avoir des étalons pour la quantification. Les mesures quantitatives de notre étude ont été réalisées par étalonnage externe. Cela consiste à injecter une solution de témoins purs à différentes concentrations et à créer ensuite une droite d'étalonnage en fonction de l'aire sous la courbe du pic chromatographique du composé. Pour les détecteurs UV, ce sont les chromophores des molécules qui sont responsables du niveau de réponse du signal. Lorsque les composés appartenant à une même famille chimique ont un chromophore comparable (λ et ϵ), une droite d'étalonnage établie avec un étalon commercial peut être utilisée pour toutes les molécules de cette famille. La quantification obtenue est alors relative au standard utilisé puisque certains composés peuvent avoir le même maximum d'absorbance mais un coefficient d'extinction molaire différent. Dans le cas des spectromètres de masse, le signal obtenu est entièrement dépendant du comportement du composé lors de l'étape d'ionisation et de fragmentation. Il est donc nécessaire d'avoir un témoin purifié par composé à doser, ce qui limite considérablement le nombre de composés dosables en spectrométrie de masse.

De manière générale, les expériences de couplage chromatographique utilisant un détecteur UV présentent une meilleure reproductibilité que celles réalisées avec un spectromètre de masse. Par contre, ces dernières permettent d'atteindre des seuils de détection et de quantification inférieurs à ceux observés en UV-visible.

Les tests de validation de méthodes

L'un des principaux enjeux des analyses quantitatives est de limiter au maximum les biais de quantification pouvant intervenir lors du phénotypage. Différents tests peuvent être réalisés pour estimer la qualité/efficacité des méthodes de quantification en chromatographie liquide (d'après « ICH », International Conference on Harmonisation (2005)):

- Spécificité : capacité d'une méthode d'analyse à différencier et quantifier l'analyte en présence d'autres composants dans l'échantillon
- Fidélité : capacité d'une méthode à donner toujours la même valeur pour un analyte dosé dans des conditions similaires (répétabilité)
- Justesse : capacité d'une méthode à donner la valeur réelle de la concentration d'un composé donné (s'estime avec les tests de recouvrement qui comparent la réponse du détecteur obtenue pour une quantité d'analyte pur ajoutée à l'échantillon comparée à la quantité réelle de l'ajout)
- Linéarité des droites d'étalonnage : vérifie la relation entre la réponse du détecteur et l'injection de concentrations connues de l'analyte
- Limites de détection et de quantification : concentrations limites (basses de manière générale) pour lesquelles la méthode d'analyse est applicable
- Stabilité : temps nécessaire à la dégradation significative de l'analyte en fonction des conditions de stockage, de la matrice étudiée et du contenant utilisé

4. La chromatographie liquide pour l'étude des composés phénoliques des pommes

Plusieurs études ont été publiées concernant l'analyse des extraits et jus de pomme en HPLC-UV et HPLC-MS (Tsao, Yang et al. 2003; Abad-Garcia, Berrueta et al. 2007). Étant donné la grande quantité de composés, et tout particulièrement de procyanidines dans les échantillons de pomme, il est souvent nécessaire d'augmenter considérablement le temps des méthodes d'analyse pour avoir une résolution suffisante pour la quantification. Dans le but de simplifier les chromatogrammes, il est possible d'ajouter du phloroglucinol pour dépolymériser les procyanidines et les doser globalement. On peut également de cette manière connaître le degré de polymérisation moyen des tanins. Celui-ci est compris entre 4,2 et 7,5 pour la plupart des variétés de pommes à cidre et peut atteindre 40,7 et 50,3 pour les variétés 'Guillevic' et 'Avrolles' (Sanoner, Guyot et al. 1999; Kennedy and Jones 2001).

Deux études ont récemment été publiées l'une spécifiquement sur le développement d'une méthode de dosage en UHPLC-MS (Ceymann, Arrigoni et al. 2011) et l'autre utilisant une méthode en UHPLC-UV pour la cartographie des composés phénoliques (Chagne, Krieger

et al. 2012). Ces méthodes permettent de doser respectivement 12 et 23 composés phénoliques présents dans les extraits de pomme en un minimum de temps (moins de 10 min).

La chromatographie liquide est aujourd'hui une méthode très largement développée pour l'étude des composés phénoliques. De nombreuses données sont disponibles dans la littérature tant au niveau des conditions chromatographiques pour la séparation des composés que pour leur identification basée sur les données de spectrométrie. Pour ce qui est de l'étude des pommes et jus de pomme, de nombreuses méthodes ont été publiées en HPLC, mais elles sont généralement très longues. À notre connaissance, deux méthodes ont été publiées en UHPLC-MS et permettent de réduire significativement les temps d'analyse. En HPLC, plusieurs études ont mis en évidence des différences de quantification entre les détecteurs UV et masse, attribuées essentiellement aux problèmes de co-élution. En revanche, rien n'a encore été publié pour une méthode chromatographique plus performante, susceptible de limiter ces phénomènes d'élution simultanée telle que l'UHPLC.

III. Etude génétique des caractères quantitatifs

Les principaux caractères d'intérêt agronomique du pommier sont généralement des caractères complexes dont l'expression génique dépend de plusieurs gènes. L'étude de ces caractères est donc plus compliquée que pour un caractère monogénique. Des outils et méthodes d'analyse spécifiques ont été développés afin de mieux comprendre leur fondement génétique pour *a posteriori*, améliorer plus efficacement les variétés.

Le séquençage récent du génome du pommier est l'une des dernières avancées significatives dans le domaine. Les données de séquences publiées en 2010 (Velasco, Zharkikh et al.) ont d'ores et déjà permis de développer à très grande échelle de nouveaux marqueurs moléculaires (SNP) et d'entrevoir de nouvelles méthodes de sélection toujours plus performantes.

A. Le séquençage du génome du pommier

Le séquençage et l'assemblage du génome du pommier ont été entrepris en 2008 par l'équipe de IASMA-FEM en s'appuyant sur un large consortium international. La variété 'Golden Delicious' diploïde a été séquencée par des méthodes de séquençage classique

Sanger et à haut débit de 454 (Roche). L'approche itérative d'assemblage utilisée pour le génome de la vigne a été utilisée pour construire les contigs puis les méta-contigs. Leur longueur totale couvre environ 80% de la séquence totale estimée du génome et leur ancrage sur les cartes génétiques a été guidé par les marqueurs moléculaires SNP (Velasco, Zharkikh et al. 2010). La position des gènes et leur annotation prédites à partir des autres génomes disponibles (*Arabidopsis*, tomate, peuplier, vigne...) sont également disponibles. Ces informations sont regroupées sur un browser développé pour la visualisation et la manipulation des séquences génomiques et disponibles sur le site du Genome Database for Rosaceae (GDR, 2012).

Grâce à la séquence du pommier, un très grand nombre de marqueurs SNP ont pu être développés sur l'ensemble du génome (plusieurs millions) et les régions homologues entre groupes de liaison ont clairement pu être identifiées. De plus, depuis la publication du génome du pommier, les génomes du fraisier (Shulaev, Sargent et al. 2011) et du pêcher (GDR, 2012) ont également été séquencés et ont servi à mettre en évidence les régions synthéniques entre ces trois espèces (Illa, Sargent et al. 2011) ainsi que les différents modes d'évolution suivis par ces trois sous-familles de Rosaceae (Jung, Cestaro et al. 2012).

Les séquences actuellement disponibles ne couvrent pas la totalité du génome. De plus, des haplotypes alternatifs (jusqu'à quatre) ont été observés à certains endroits, entraînant une confusion dans le positionnement des gènes (communication personnelle_S. Gaillard, IRHS). Grâce à la réduction des coûts et à l'augmentation des capacités des nouvelles technologies de séquençage à haut débit (Next Generation Sequencing, NGS), de nombreux programmes de reséquençage ont été et sont actuellement entrepris, notamment par des membres du projet FruitBreedomics pour reséquencer une quinzaine de variétés et d'espèces de *Malus*. D'autre part, les travaux de séquençage haut débit d'ARN messagers (RNAseq) menés actuellement par différentes équipes internationales (Agricultural Research Council en Afrique du Sud, institut Plant & Food Research en Nouvelle Zélande, Université de Leuven en Belgique, IASMA FEM en Italie et IRHS d'Angers) permettront d'améliorer l'annotation du génome du pommier (communication personnelle_F. Laurens et J.-M. Celton, IRHS).

B. Construction des cartes génétiques

Une carte génétique est une liste de marqueurs ordonnés dont les distances sont déterminées par le taux de recombinaison mesuré en centiMorgan (cM). C'est Morgan qui, le premier, fit le lien entre crossing-over et distance génétique et la première carte génétique fut

publiée en 1913 par l'un de ces étudiants travaillant sur la drosophile (Sturtevant 1913). Il utilisait alors des marqueurs phénotypiques (comme la couleur des yeux) et a ainsi pu cartographier les gènes majeurs contrôlant ces caractères. Aujourd'hui, les marqueurs moléculaires sont largement employés pour la réalisation des cartes (Cheema and Dicks 2009). Chez les plantes, leur utilisation remonte aux années 1980 avec l'utilisation des marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) pour la construction des cartes génétiques du maïs et de la tomate (Helentjaris, Slocum et al. 1986). Depuis, le nombre de marqueurs disponibles ne cesse d'augmenter en lien avec le développement des techniques de biologie moléculaire et les connaissances sur les génomes.

1. Les marqueurs moléculaires

Un marqueur moléculaire peut être considéré comme une « borne » du génome, localisée à un endroit précis de l'ADN et transmissible à la descendance selon les règles classiques de l'hérédité (Semagn, Bjornstad et al. 2006). Contrairement aux marqueurs morphologiques ou biochimiques, ils sont généralement neutres vis-à-vis de l'environnement.

Les principales caractéristiques recherchées d'un marqueur moléculaires sont :

- Fort polymorphisme
- Co-dominance des allèles
- Fréquence et répartition homogène le long du génome
- Facilité d'accès *via* par exemple la mise à disposition de base de données (pour les marqueurs utilisant des amorces spécifiques)
- Facilité et rapidité de l'analyse
- Coût faible
- Utilisation en haut débit (automatisation, multiplexage...)
- Haute reproductibilité
- Haut transfert entre populations, espèces...

Ces marqueurs peuvent être utilisés pour différencier des clones ou cultivars, déterminer les liens de parenté entre individus (phylogénie), évaluer la biodiversité, étudier les flux de gènes entre espèces, cartographier des gènes ou développer la sélection assistée par marqueurs (SAM) (Kumar, Gupta et al. 2009).

Il existe plus d'une vingtaine de marqueurs moléculaires différents décrits dans la littérature, avec pour certains, plusieurs variantes ou synonymes (Semagn, Bjornstad et al. 2006). Ils sont en général classés selon les techniques d'analyse employées pour les étudier : deux

Tableau 21. Principe, avantages et inconvénients des principaux marqueurs moléculaires utilisés en cartographie génétique (Semagn, Bjornstad et al. 2006; Kumar, Gupta et al. 2009).

Marqueurs	Principe	Avantages	Inconvénients
RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	Utilisation d'enzymes de restriction pour digérer l'ADN génomique Transfert sur membrane par Southern blot et hybridation avec des amorces radioactives pour révéler le profil de bandes sur film photographique	Co-dominant Fréquent et répartition homogène Pas besoin de connaître la séquence Reproductible Transférable Locus spécifique	Faible polymorphisme Long et laborieux d'utilisation Cher Pas d'automatisation Grande quantité d'ADN nécessaire Développement de banque d'amorces spécifiques Utilisation de la radioactivité
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	Utilisation d'amorces d'oligonucléotides dessinées aléatoirement pour l'amplification PCR	Fréquent et répartition homogène Pas besoin de connaître la séquence Rapide et facile d'utilisation Automatisation Faible quantité d'ADN nécessaire	Dominant Non reproductible Non transférable
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	Utilisation d'enzymes de restriction pour fractionner le génome Ligation de séquences d'oligonucléotides connues aux extrémités des fragments (adaptateurs) Amplification des fragments par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des adaptateurs	Polymorphe Fréquent Pas besoin de connaître la séquence Automatisation Transférable Locus spécifique	Dominant Laborieux Cher Non reproductible Grande quantité d'ADN nécessaire
ISSR (Inter-Simple sequence repeat)	Utilisation d'amorces complémentaires des microsatellites Amplification par PCR des séquences entre deux microsatellites	Polymorphe Fréquent et répartition homogène Pas besoin de connaître la séquence Simple et rapide d'utilisation	Principalement dominant Peu reproductible Multilocus

Tableau 10 (suite).

Marqueurs	Principe	Avantages	Inconvénients
SSR (Simple Sequence Repeat)	Amplification des microsatellites par PCR <i>via</i> des amorces spécifiques des régions qui l'encadrent	Polymorphe Co-dominant Fréquent et répartition homogène Multiplexable Reproductible Transférable Peu d'ADN nécessaire	Connaitre la séquence Difficilement utilisable à haut débit
CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)	Amplification par PCR de fragments obtenus par restriction enzymatique	Reproductible Facile d'utilisation Faible quantité d'ADN nécessaire	Faible polymorphisme
SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)	Amplification d'un fragment d'ADN génomique par des amorces spécifiques Les amorces sont définies après clonage et séquençage des deux extrémités d'une bande obtenue avec un marqueur RAPD	Facile et rapide d'utilisation Reproductible Locus spécifique Faible quantité d'ADN nécessaire	Connaitre la séquence
STS (Sequence Tagged Site)	Amplification par PCR d'une région unique du génome à l'aide d'amorces spécifiques développées au départ pour des marqueurs RFLP ou AFLP	Co-dominant Répartition homogène Haut débit Reproductible	Connaitre la séquence Laborieux
SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	Amplification PCR de fragment d'ADN génomique possédant une base mutée entre deux chromosomes	Co-dominant Fréquent et répartition homogène Très haut débit Peu cher Plusieurs méthodes d'analyse disponibles	Connaitre la séquence Développement de banque d'amorces spécifiques Haute qualité d'ADN nécessaire

groupes principaux peuvent être distingués : les marqueurs basés sur la technique de PCR (Polymorphism Chain Reaction) et ceux qui ne l'utilisent pas (Semagn, Bjornstad et al. 2006; Kumar, Gupta et al. 2009). La PCR permet d'une part de réduire les quantités d'ADN nécessaires à l'analyse des marqueurs et d'autre part de cibler certaines régions spécifiques. Le Tableau 10 regroupe les informations concernant le principe, les avantages et les inconvénients des principaux marqueurs moléculaires utilisés en cartographie génétique. Les marqueurs SSR et SNP qui ont servis à l'élaboration des cartes génétiques utilisées au cours de cette thèse seront décrits plus en détail ci-après.

Les marqueurs SSR

Les marqueurs SSR sont constitués de courtes séquences d'ADN répétées en tandem (exemple d'un dinucléotide : ATATATAT). Ils peuvent être amplifiés par PCR grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques qui encadrent le marqueur. Les produits PCR sont ensuite analysés sur gel d'agarose. Si l'une des amorces a été synthétisée avec un fluorophore, il est possible de réaliser l'analyse à l'aide d'un séquenceur capillaire. Il est alors possible de multiplexer plusieurs marqueurs différenciés par la couleur du fluorophore. Le polymorphisme mis en évidence par les SSR est un polymorphisme de taille (mesuré en nombre de paires de bases) lié à la plus ou moins grande répétition des séquences. Il peut être relativement important, entre 11 et 21 allèles mis en évidence pour neuf marqueurs (Laurens, Durel et al. 2004). Les différents allèles peuvent se transmettre à la descendance et leur ségrégation peut être visualisée à l'aide du logiciel GenMapper® pour déterminer la classe génotypique de chacun des descendants.

Les marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat) ont été très utilisés chez le pommier depuis 1998 en raison de leur fort polymorphisme, de leur faible coût et de leur facilité d'utilisation (Gianfranceschi, Seglias et al. 1998). Une importante base de données est aujourd'hui disponible sur le site du GDR (2012) ainsi que sur celui du projet européen HiDRAS (High-quality Disease Resistant Apples for a Sustainable Agriculture, 2012). Ces marqueurs permettent de couvrir les 17 groupes de liaison avec une densité de couverture suffisante pour la détection de QTL (Quantitative Trait Loci).

Les marqueurs SNP

Les amorces développées pour ces marqueurs permettent la mise en évidence du polymorphisme d'un seul nucléotide, lié à l'insertion, la délétion ou la mutation d'une base.

Les marqueurs SNP sont co-dominants et il est seulement possible de différencier l'allèle sauvage de l'allèle muté (sans distinction des différentes mutations). Le taux de transférabilité de ces marqueurs chez le pommier a été évalué à 40,9% en moyenne, selon la variété considérée (Micheletti, Troggio et al. 2011).

En 2008, un premier set de 93 marqueurs SNP créé à partir des séquences géniques (EST = Expressed Sequence Tag) de pommier a été publié par une équipe Néo Zélandaise (Chagne, Gasic et al. 2008). Depuis 2010, avec le séquençage du génome de pommier et les projets de reséquençage de différentes variétés, plusieurs millions de SNP ont été mis en évidence. Une première puce couvrant l'ensemble du génome du pommier a été réalisée avec près de 8 000 SNP. Une première carte génétique, construite à l'aide de cette puce, a récemment été publiée (Antanaviciute, Fernandez-Fernandez et al. 2012). Grâce au reséquençage de variétés supplémentaires dans le cadre du projet FruitBreedomics, une puce 20 000 SNP est en cours de création. Les analyses avec cette nouvelle puce devraient être du même ordre de prix que celles réalisées avec la puce 8 000 SNP (environ 50€ par échantillon).

L'utilisation des marqueurs SNP chez le pommier est donc de plus en plus répandue. En fonction de l'objectif, les méthodes de génotypage utilisées peuvent être différentes. Pour l'analyse d'un nombre réduit de SNP, ce qui est le cas de la SAM ciblée sur quelques caractères, les méthodes à faible débit comme l'HRM (High Resolution Melt), KASPar (Kompetitive Allele Specific PCR) ou BeadExpress VeraCode peuvent être utilisées. La méthode HRM est basée sur le principe de PCR en temps réel suivie de l'analyse haute résolution des courbes de fusion des fragments amplifiés. Les méthodes KASPar et BeadExpress reposent sur la méthode d'amplification PCR : les amorces s'hybridant parfaitement à l'allèle sauvage permettent l'élongation de la séquence alors qu'elles s'hybrident moins bien avec les allèles mutés, limitant l'élongation. Lors de l'élongation, des fluorochromes sont insérés permettant par la suite de distinguer les homozygotes sauvages (double dose de fluorescence), muté (pas de fluorescence) et les hétérozygotes (une dose de fluorescence). Les résultats sont ensuite visualisés avec différents logiciels en fonction du type de marqueur utilisé. La principale différence entre ces deux méthodes est la présence de codes barres avec la méthode BeadExpress qui permettent de différencier chaque marqueur et ainsi de multiplexer très fortement les SNP. Dans le cadre de cette thèse, La méthode BeadExpress a été utilisée pour le génotypage des individus avec un set de 384 marqueurs développé à IASMA-FEM.

Les puces hautes densités actuellement disponibles permettent de génotyper un très grand nombre d'individus à des prix de plus en plus attractifs. Le génotypage par séquençage (GBS) est de plus en plus développé, pour des coûts encore plus attractifs. Il reste toutefois

quelques aspects bio-informatiques à étudier avant que cette technique ne se développe à grande échelle (Poland, Brown et al. 2012).

2. Principe de cartographie génétique chez le pommier

Le pommier, espèce exclusivement allogame, possède une forte hétérozygotie. Contrairement aux descendants issus de parents homozygotes qui ont deux allèles possibles par locus, les descendances issues de parents hétérozygotes peuvent présenter jusqu'à quatre allèles par locus. Les méthodes classiques de cartographie génétique conduisant à la création d'une seule carte F1 ont donc dû être adaptées (Maliepaard, Jansen et al. 1997). La méthode repose alors sur la construction de deux cartes parentales dont l'ensemble des marqueurs peut par la suite être intégré pour créer une troisième carte appelée carte intégrée.

Préalablement à la réalisation de cartes génétiques, il faut vérifier le polymorphisme des marqueurs pour les parents de la descendance. Les marqueurs sélectionnés sont ensuite analysés sur l'ensemble de la descendance. En fonction des marqueurs et du génotype des parents, plusieurs cas de figures peuvent être rencontrés qui seront plus ou moins informatifs pour la construction de la carte (Tableau 11). Le logiciel de cartographie estime alors leur position par rapport aux autres marqueurs.

Tableau 22. Différents cas de figure de polymorphisme des marqueurs moléculaires dans une descendance issue de parents hétérozygotes. En vert les marqueurs utilisables pour les deux cartes mâle et femelle, en rose les marqueurs utilisables que pour la carte femelle et en bleu les marqueurs utilisables que pour la carte mâle.

	Allèles mâles différents des allèles femelles		Allèles mâles identiques aux allèles femelles	
	Polymorphe mâle	Monomorphe mâle	Polymorphe mâle	Monomorphe mâle
Polymorphe femelle	ab x cd	ab x cc	ab x ab	ab x bb
Monomorphe femelle	aa x bc	aa x bb	aa x ab	aa x aa

Avec les marqueurs polymorphes pour les deux parents, les allèles peuvent être notés a, b, c et d. Les descendants issus d'un croisement ab x cd pourront être : ac, ad, bc ou bd, en proportion équivalente. Dans le cas où la proportion ¼ n'est pas vérifiée pour chacune des classes génotypiques, on parlera alors de distorsion. Elle peut être plus ou moins importante, pouvant aller jusqu'à l'absence complète d'une classe génotypique (cas par exemple d'une combinaison létale ou d'une sélection drastique des individus pour un caractère lié au

marqueur considéré). Les marqueurs très distordus sont généralement difficiles à cartographier et sont retirés de l'analyse. Les marqueurs de type $ab \times ab$ peuvent servir à l'élaboration des cartes génétiques mais comme l'affiliation des allèles pour les descendants ab ne peut être déterminée, ils peuvent entraîner des biais dans la détection de QTL et sont donc eux aussi généralement exclus des analyses.

L'analyse des marqueurs sur l'ensemble de la descendance permet de les ordonner et d'estimer la distance entre eux. Plus les marqueurs sont proches et moins il y a d'événements de recombinaison (ou crossing-over) entre ces marqueurs. Ces événements de recombinaison sont estimés en comparant la phase des individus de la descendance : pour les marqueurs d'un même groupe de liaison (GL), la majorité des individus de la descendance aura la phase parentale tandis qu'une minorité aura subi des événements de recombinaison entraînant une modification de la phase (phase recombinée, Figure 9). Il est donc nécessaire d'avoir une grande quantité d'individus génotypés (au minimum une centaine) pour pouvoir observer des recombinaisons entre marqueurs proches. Le pourcentage d'individus recombinant entre deux marqueurs (ayant subi un crossing-over) renseigne directement sur la distance génétique mesurée en centiMorgan (cM). Par exemple, 1% de recombinaison équivaut à 1 cM (Sturtevant 1913). Au-delà de 50% de recombinaison on dit que les marqueurs sont indépendants et aucune distance génétique ne peut être calculée.

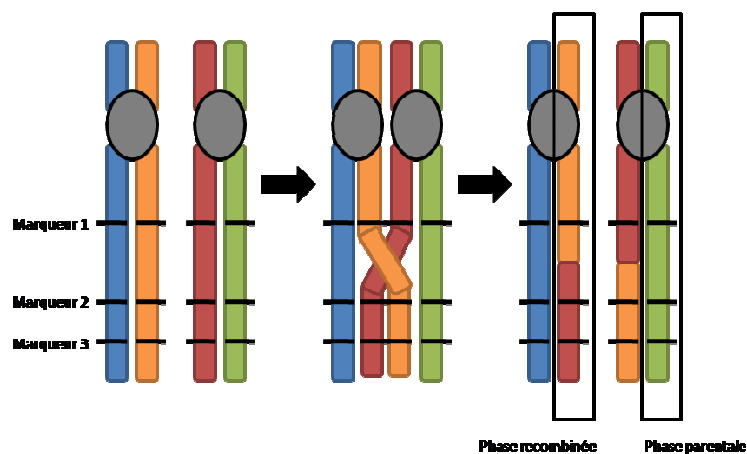


Figure 23. Crossing-over entre deux chromosomes appariés au moment de la méiose.

Plusieurs logiciels sont disponibles pour l'élaboration des cartes génétiques. Ils permettent de regrouper, d'ordonner et d'estimer les distances entre les marqueurs. Les cartes génétiques établies dans cette étude ont été réalisées avec le logiciel JoinMap qui permet

l'analyse de populations issues du croisement de deux parents hétérozygotes (Van Ooijen 2006). Il peut être utilisé en cartographie de régression ou maximum de vraisemblance et deux fonctions sont disponibles pour calculer les distances génétiques : la fonction Haldane qui considère que chaque crossing-over est indépendant des autres et la fonction Kosambi qui tient compte des interférences possibles liées à la présence de deux crossing-over proches (Cheema and Dicks 2009).

Il existe de nombreuses études qui ont permis de développer des marqueurs moléculaires pour la cartographie génétique du pommier. La carte établie à l'aide de marqueurs SSR par Silfverberg-Dilworth et son équipe en 2006 est utilisée jusqu'à présent comme carte de référence (Silfverberg-Dilworth, Matasci et al. 2006). Une première carte génétique réalisée avec les marqueurs SNP a également été publiée très récemment (Antanaviciute, Fernandez-Fernandez et al. 2012). Près de 2300 marqueurs SNP ont ainsi pu être cartographiés pour une descendance à l'aide de la puce 8 000 SNP.

C. Cartographie génétique des caractères quantitatifs

Les caractères phénotypiques d'un individu peuvent être classés en deux groupes principaux en fonction du nombre de gènes impliqués. On parle alors d'une part, de caractères monogéniques, dont l'expression phénotypique est de type « tout ou rien », et d'autre part, de caractères quantitatifs, impliquant plusieurs gènes, dont l'expression conduit à un phénotype continu. Les régions contenant les gènes impliqués dans l'expression des caractères quantitatifs sont appelés QTL pour Quantitative Trait Loci (Collard, Jahufer et al. 2005).

Le principal objectif de la génétique quantitative est de comprendre les fondements génétiques impliqués dans l'expression des caractères complexes ou quantitatifs. Les méthodes d'analyses reposent toutes sur la nécessité d'étudier des individus contrastés phénotypiquement et génotypiquement. Cependant, il est souvent difficile d'associer sans ambiguïté un phénotype donné avec un génotype particulier. Les différents QTL pour un caractère donné peuvent interagir avec le fond génétique (phénomène d'épistasie) ainsi qu'avec l'environnement. Toutefois, l'hérédité de ces caractères repose sur des fondements semblables à ceux des gènes majeurs.

3. Principe de détection QTL en population simple

La recherche de QTL abordée dans cette thèse repose sur l'étude d'une descendance qui ségrége pour le caractère étudié et pour laquelle on dispose de marqueurs polymorphes. Deux types de données sont donc nécessaires pour réaliser une détection de QTL :

- Les données de phénotypage : valeurs quantitatives attribuées à chacun des individus de la population pour les caractères étudiés. Dans le cadre de ces travaux, il s'agit de la teneur en composés phénoliques.
- Les données de génotypage : formes alléliques des marqueurs. Ces données servent dans un premier temps à la construction de la carte génétique puis à la cartographie des QTL à proprement parler.

Des logiciels spécialisés intègrent ensuite l'ensemble de ces données et déterminent statistiquement les loci associés aux phénotypes observés comme représenté dans la Figure 10 (Collard, Jahufer et al. 2005).

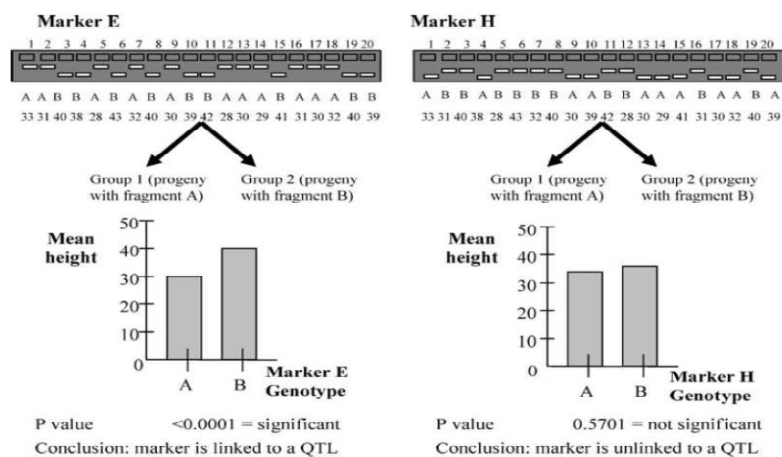


Figure 24. Principe de cartographie QTL (Collard, Jahufer et al. 2005).

Le logiciel MapQTL

Le logiciel MapQTL utilisé dans cette étude pour la détection de QTL, a été développé pour l'analyse de populations issues de croisements entre parents hétérozygotes (Van Ooijen, Boer et al. 2002). Ce logiciel permet entre autres des analyses paramétriques comme l'Interval Mapping (IM) ou le Multiple QTL Mapping (MQM) et non paramétriques comme le test de Kruskal-Wallis (KW). En IM, tous les intervalles entre deux marqueurs adjacents sont analysés simultanément (Collard, Jahufer et al. 2005). Le MQM, réalisé après l'IM, permet de tenir compte de l'effet des QTL détectés précédemment qui sont alors placés en co-

facteurs pour refaire la détection. Cela permet dans un premier temps de mettre à l'écart les QTL les plus forts et permettre ainsi l'émergence des plus faibles, et dans un second temps de valider les QTL détectés jusqu'alors. Les résultats obtenus en IM et MQM sont exprimés en LOD (logarithm of odds) score. Un LOD de 3 correspond à une probabilité 1000 fois supérieure d'avoir un QTL à la position indiquée que de ne pas l'avoir. Il est alors possible de déterminer le LOD score en tout point du GL. Une représentation graphique est alors créée par le logiciel schématisant le GL concerné et la courbe de LOD correspondante (Figure 11). Les tests de permutations réalisés par le logiciel MapQTL permettent de déterminer le seuil de significativité des QTL à prendre en compte dans les détections en IM et MQM. La valeur du r^2 est également calculée pour chaque QTL, correspondant au pourcentage de variation phénotypique du caractère expliqué par le QTL. Cette valeur est principalement dépendante de la liaison entre le phénotype et le génotype au marqueur considéré, de l'héritabilité du caractère et de la différence phénotypique existante entre individus.

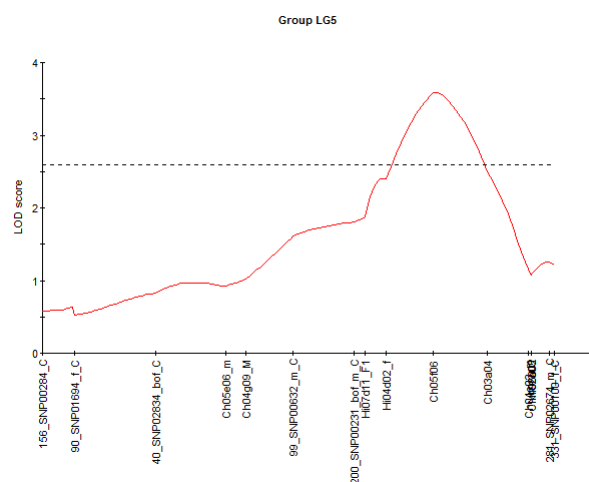


Figure 25. Représentation d'une courbe de LOD. La courbe en pointillés représente le LOD seuil déterminé par le test de permutation. Les différents marqueurs du groupe de liaison sont positionnés sur l'axe des abscisses.

4. Autres méthodes de détection de QTL

La détection de QTL sur une ou un nombre faible de populations permet d'obtenir des résultats intéressants mais limités au matériel étudié (les deux ou quelques parents impliqués). Leur intérêt en sélection est donc *a priori* limité. D'autres approches permettent de prendre en compte une variabilité plus grande comme les détections en populations connectées, en pédigrée (pedigree-based analysis, PBA) ou en génétique d'association (GA).

L'étude de populations connectées par un parent commun permet généralement d'augmenter la précision des QTL détectés mais la variabilité considérée est encore relativement faible (Calenge, Drouet et al. 2005).

La détection de QTL en PBA consiste en l'étude de plusieurs populations connectées par leurs pédigrées. Cette méthode permet de travailler sur un grand nombre de populations de petites tailles et d'augmenter très fortement la variabilité considérée. Cette approche a été développée pour la première fois sur le pommier dans le cadre du projet Européen HiDRAS (Bink, Boer et al. 2008) (HiDRAS, 2012).

La GA est une méthode plus récente permise par le développement d'un très grand nombre de marqueurs SNP. La population considérée est formée d'un ensemble de variétés et non plus d'une ou plusieurs descendances. La variabilité considérée est alors beaucoup plus importante. Des études préalables sont toutefois nécessaires pour éviter la structuration de la population et estimer le déséquilibre de liaison (Rehman Arif, Nagel et al. 2012).

D. Identification des gènes candidats

La mise en évidence de gènes candidats est une avancée complémentaire dans la compréhension des mécanismes génétiques. Leur identification peut se faire avec ou sans *a priori*, *in silico* ou *in vitro*. Les gènes mis en évidence doivent ensuite être validés.

1. Recherche des gènes candidats

Un gène candidat peut être « n'importe quel gène potentiellement impliqué dans la variation du caractère, choisi pour sa fonction biologique et/ou sa localisation sur la carte génétique. » (Pflieger, Lefebvre et al. 2001). Les approches sans *a priori* permettent ainsi de rechercher les gènes responsables d'un caractère sans connaître à l'avance les mécanismes impliqués. C'est le cas par exemple des méthodes de transcriptomique utilisant les puces full transcripts. Le principe repose sur la mise en évidence des transcrits différentiellement exprimés entre deux individus (ou groupe d'individus) contrastés pour le caractère d'intérêt (et donc potentiellement impliqués). Des approches avec *a priori* peuvent également être développées si les gènes impliqués dans le phénomène étudié sont connus. On peut par exemple dessiner des amorces spécifiques des gènes candidats et les cartographier sur une carte génétique. La co-localisation de ces gènes avec des QTL renforce leur implication potentielle dans le caractère étudié. Dans le cas où la séquence génomique de l'individu étudié est connue, il est possible de rechercher les gènes candidats *in silico* directement dans les intervalles de confiance des QTL. Le logiciel BLAST2GO utilisé dans ce but au

cours de ma thèse permet d'aligner l'ensemble des séquences extraites de l'intervalle du QTL contre l'ensemble des bases de données génomiques disponibles sur le site NCBI. Sur la base des homologies de séquences, il est possible d'obtenir la fonction présumée de ces gènes (Conesa, Gotz et al. 2005). De plus, le module « KEGG map » de BLAST2GO permet de positionner l'ensemble des enzymes présumées sur les différentes voies de biosynthèse disponibles dans la base KEGG.

2. Validation des gènes candidats

Une fois les gènes candidats mis en évidence il est nécessaire de confirmer leur implication dans le caractère. On peut alors réaliser des PCR quantitatives qui permettent d'estimer la quantité de transcrits présent dans un échantillon. La comparaison des concentrations entre différents échantillons contrastés permettent de déterminer l'implication du gène ciblé dans le caractère étudié. La méthode la plus pertinente pour confirmer l'implication d'un gène dans un phénotype particulier est la transformation génétique. Cette technique permet de désactiver le gène candidat ou au contraire de l'insérer dans un tissu, cultivar ou organisme ne le possédant pas à l'état sauvage. L'observation du phénotype après transformation et la comparaison avec un témoin non transformé renseigne directement sur l'implication de ce gène dans le caractère.

Le développement de plus en plus rapide des nouvelles technologies de génotypage et de séquençage rend aujourd'hui les études génétiques beaucoup plus simples, rapides et beaucoup moins chères qu'avant. Le séquençage du génome du pommier a permis une très grande avancée dans les méthodologies et les outils développés pour cette espèce. Le développement des méthodes de génétiques d'association ou de sélection génomique ont ainsi été rendu possible avec le développement des marqueurs SNP. La recherche des gènes candidats *in silico* est également facilitée.

E. Application de la cartographie de QTL chez le pommier

1. Détections de QTL pour la résistance et la qualité du fruit

L'emploi de produits phytosanitaires pour lutter contre les bioagresseurs est l'une des principales causes de pollution liée à l'agriculture. L'étude génétique de la résistance du pommier est donc primordiale pour tenter d'améliorer les variétés existantes dans le but de limiter les intrants. Jusqu'à présent, les programmes d'amélioration génétique se sont

principalement focalisés sur les gènes majeurs de résistance. C'est le cas par exemple du gène majeur *Vf* conférant une résistance aux principales souches de tavelure introgressé dans un grand nombre de variétés de pommier (Korban and Tartarini 2009). La résistance conférée est très efficace mais non durable puisque les agents pathogènes ont la capacité d'évoluer très rapidement et de contourner ce type de résistance. L'un des moyens d'augmenter la durabilité des résistances génétiques est le pyramidage de facteurs de résistance majeurs et partiels (QTL) qui limite les pressions de sélection sur les populations pathogènes (McDonald and Linde 2002; Palloix, Ayme et al. 2009; Brun, Chevre et al. 2010). La détection de QTL de résistance chez le pommier a ainsi fait l'objet d'un grand nombre d'études, principalement pour la résistance à la tavelure (Liebhard, Koller et al. 2003; Calenge, Faure et al. 2004), à l'oïdium (Calenge and Durel 2006), au feu bactérien (Calenge, Drouet et al. 2005) et aux pucerons (Stoeckli, Mody et al. 2008). Les premiers travaux de pyramidage réalisés chez le pommier avec deux gènes majeurs et deux QTL de résistance à la tavelure ont montré une meilleure résistance, plus durable dans le temps (Lasserre-Zuber_poster RGC5).

La plupart des variétés de pommiers à cidre ont une alternance de production très marquée. Celle-ci se définit par une forte production de fruits une année, suivie d'une très forte diminution l'année suivante, voire de l'absence totale de fructification. Le principal moyen employé pour limiter l'alternance est l'éclaircissage de l'arbre qui consiste à réduire la charge en fruits en éliminant les fleurs ou les jeunes fruits de façon manuelle ou à l'aide d'éclaircisseurs chimiques ou mécaniques. Certaines variétés s'éclaircissent naturellement et les bases génétiques liées à ce caractère font l'objet d'études menées entre l'INRA de Montpellier et l'Institut Plant & Food Research de Nouvelle Zélande (Guitton, Kelner et al. 2012).

Des études QTL ont également été réalisées pour tenter de comprendre les mécanismes liés à la qualité du fruit. Différentes études se sont intéressées aux composés aromatiques (Dunemann, Ulrich et al. 2009), à la qualité (Kenis, Keulemans et al. 2008) et à la texture (Longhi, Moretto et al. 2012) du fruit. Les analyses portant sur l'architecture de l'arbre (Segura, Durel et al. 2009) et la floraison (Celton, Martinez et al. 2011) ont également permis d'obtenir des QTL pour ces caractères.

2. Les composés phénoliques : des études beaucoup plus récentes

Très peu d'études portent sur la détection de QTL des composés phénoliques chez les plantes. La majorité des études disponibles dans la littérature se concentrent principalement sur une classe de composés en particulier. De façon non exhaustive on peut citer les études

menées sur les anthocyanes des pétales de lys (Abe, Nakano et al. 2002), de la vigne (Fournier-Level, Le Cunff et al. 2009), de la framboise (Kassim, Poette et al. 2009; Dobson, Graham et al. 2012) et du cassis (Hackett, Russell et al. 2010), des tannins du haricot (Caldas and Blair 2009), du colza (Lipsa, Snowdon et al. 2012) et de la vigne (Huang, Doligez et al. 2012), des flavonoïdes du riz (Jin, Xiao et al. 2009; Shao, Jin et al. 2011) ou encore des monolignols et acides phénols du maïs (Barriere, Thomas et al. 2008). L'étude de Reaeizad et al. (2011) a plus particulièrement été réalisée sur l'ensemble des composés phénoliques du tourteau de colza par génétique d'association. 49 cultivars ont été analysés et 53 marqueurs ont été identifiés pour leur association avec la teneur en acides phénols, en monomères et polymères de flavanols, et en anthocyanes.

Deux études QTL récentes se sont intéressées aux composés phénoliques des pommes en Nouvelle-Zélande (Chagne, Krieger et al. 2012) et Hollande (Khan, Chibon et al. 2012). Elles se basent sur deux descendances de pommiers à couteau, respectivement 'Royal Gala' x 'Braeburn' et 'Prima' x 'Fiesta'. Les approches de quantification des composés phénoliques et de détection de QTL employées dans ces travaux sont différentes : l'équipe Néo Zélandaise a dosé les composés majoritaires pour deux années de récolte par UHPLC-UV et la détection de QTL a ensuite été réalisée avec le logiciel MapQTL sur les deux cartes parentales séparément. Sept clusters ont pu être cartographiés sur les GL1, GL14 et GL15 pour les acides p-coumaroylquiniques, sur le GL9 pour les anthocyanes, sur le GL16 pour les flavanols et sur le GL17 pour la rutin et l'acide chlorogénique (Figure 12).

L'équipe Hollandaise a détecté 418 composés dans la peau et 254 dans la chair par HPLC-MS. Cependant, seulement 69 et 30 composés respectivement ont pu être identifiés, au moins partiellement. Parmi ces 99 composés, 81 sont des polyphénols ou des phénylpropanoïdes. La détection QTL a ensuite été réalisée avec le logiciel MetaNetwork qui permet l'analyse d'un grand nombre de caractères en même temps. Cinq régions ont été mises en évidence dans cette étude sur le GL1 pour les glycosides de flavonols, sur le GL8 pour la quercétine rhamnoside, sur le GL13 pour les glycosides d'isorhamnétine, sur le GL16 pour les glycosides de kaempférols et sur le GL17 pour l'acide chlorogénique (Figure 13).

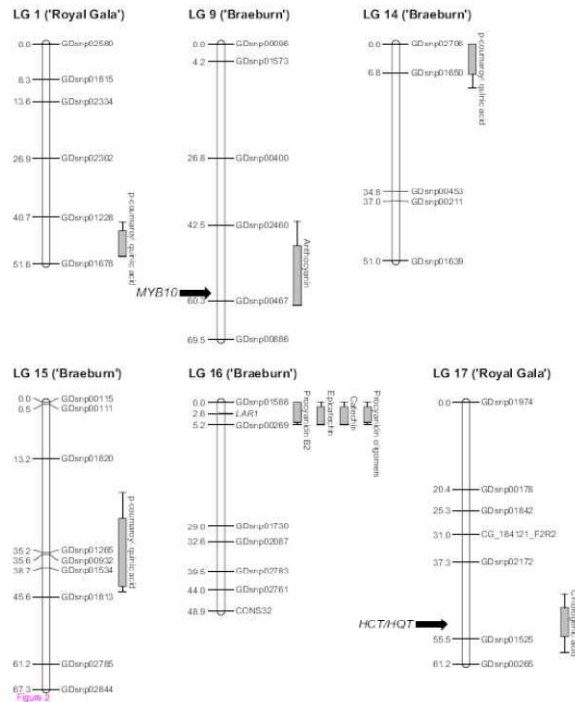


Figure 26. Détection de QTL réalisée sur les cartes génétiques de 'Royal Gala' et 'Braeburn' pour la teneur en composés phénoliques de la peau et de la chair des fruits et positionnement des gènes candidats (Chagne, Krieger et al. 2012).

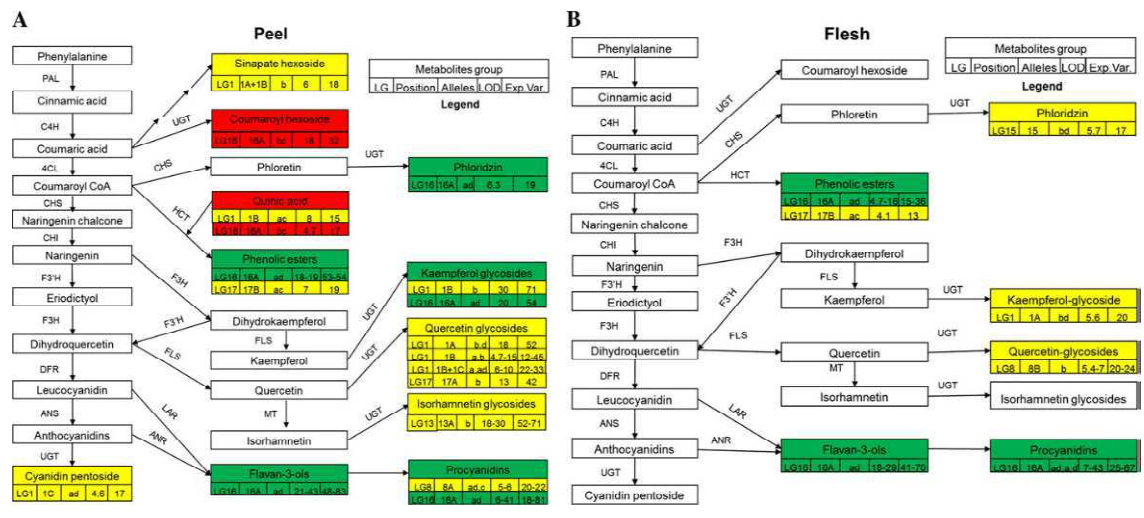


Figure 27. Résultats de la détection QTL réalisée sur les cartes génétiques de 'Prima' et 'Fiesta' pour la teneur en composés phénoliques de la peau (A) et la chair (B) du fruit (Khan, Chibon et al. 2012). En vert : les mQTL pour lesquels les allèles favorables sont sur une même phase parentale, en jaune : les mQTL pour les composés détectés en dehors du haut du GL16, en rouge : les composés inversement corrélés aux composés en vert et qui ont un mQTL sur le haut du LG16. Le LG porteur des mQTL est indiqué. Les lettres A, B, C... ont été utilisées pour distinguer les différents mQTL obtenus à différents endroits du génome pour un composé donné. Les lettres a et b correspondent aux allèles originaires du parent 'Prima' et c et d ceux du parent 'Fiesta'. PAL : phenylalanine ammonia-lyase, C4H : cinnamate-4-hydroxylase, 4CL : 4-coumaroyl:CoA-ligase, CHI : chalcone isomerase, CHS : chalcone synthase, F3'H : flavonone 3' hydroxylase, DFR : dihydroflavonol 4-reductase, HCT : hydroxycinnamoyl-CoA quinate/shikimate hydroxycinnamoyl transferase, LAR : leucoanthocyanidin 4-reductase, UGT : UDP-glycosyltransferase, FLS : flavonolsynthase et ANS : anthocyanidin synthase.

Dans ces deux études, le haut du GL16 pour la teneur en flavanols a très largement été mis en avant et la recherche de gènes candidats a permis de mettre en évidence une leucoanthocyanidine reductase (LAR) impliquée dans la biosynthèse de ces composés.

Les approches QTL menées jusqu'à présent sur le pommier ont permis de mettre en évidence un grand nombre de facteurs génétiques impliqués dans la résistance des plantes ou la qualité du fruit. L'étude des composés phénoliques chez le pommier est beaucoup plus récente. Les QTL mis en évidence dans ces études montrent déjà d'importantes régions impliquées dans l'expression de ces composés.

IV. Sélection assistée par marqueurs

La création variétale est un processus long et complexe, en particulier pour les espèces pérennes comme le pommier. Il faut compter entre 15 et 25 ans entre le premier croisement et l'inscription d'une nouvelle variété (Lauri and Laurens 2005). Cela s'explique en partie par la durée de la phase juvénile (de 3 à 5 ans) et par le temps nécessaire à l'évaluation de la stabilité des caractères dans différentes conditions environnementales. Le temps et le coût des programmes de sélection peuvent être réduits et surtout optimisés grâce à l'introduction de marqueurs moléculaires au travers de la sélection assistée par marqueur (SAM). Cette méthode, à condition d'avoir des marqueurs fortement liés aux caractères et spécifiques des familles en sélection, permet de déterminer précocement les potentialités d'un individu et ainsi d'éliminer rapidement les individus de faible qualité. Le sélectionneur a alors le choix soit de réduire le nombre d'individus testés en parcelle ou, à surface égale en verger, d'augmenter la qualité des individus en sélection.

Cependant, il est nécessaire de réaliser des études préalables, souvent longues, pour déterminer les marqueurs utilisables en sélection. L'utilisation des QTL en sélection reste aujourd'hui encore marginale, principalement à cause de la faible densité des cartes génétiques, de l'influence du fond génétique et de l'environnement sur les QTL, de la faible variabilité allélique considérée et du coût élevé des infrastructures et des consommables nécessaires à la SAM (Collard and Mackill 2008). De plus, les approches de SAM réalisées sur le blé et l'orge ont montré qu'elles étaient surtout efficaces pour la sélection des caractères monogéniques ou de QTL à effets forts (Miedaner and Korzun 2012).

Le développement des nouvelles technologies de génotypage et de détection de QTL sont en passe de combler un certain nombre de ces limitations. Les cartes génétiques du

pommier ont très largement été densifiées avec le développement des marqueurs SNP. De plus, le coût d'analyse de ces marqueurs est en constante diminution. De leur côté, Les méthodes de génétique d'association et d'analyse en pédigrée (PBA) permettent de prendre en compte une très grande variabilité allélique.

Deux projets internationaux sont actuellement développés pour palier le « gap » entre les résultats des recherches génétiques et la sélection. En 2009 a débuté le projet RosBREED principalement porté par plusieurs équipes Américaines. Il a pour objectif d'améliorer l'efficacité de la SAM et développer les approches en PBA pour quatre espèces fruitières de la famille des Rosaceae comprenant le pommier (RosBREED, 2012). Le projet FruitBreedomics, débuté en 2011, est quant à lui principalement porté par des équipes Européennes mais compte parmi ses participants la plupart des équipes mondiales impliquées sur la génétique et la génomique du pommier et pêcher. Il a pour objectifs d'améliorer l'efficacité de la SAM et développer les approches en PBA, la génétique d'association et les méthodes de transcriptomique pour ces deux espèces (Laurens, Durel et al. 2010).

V. Enjeux et objectifs de la thèse

Que ce soit en lien avec leur rôle protecteur pour la plante, leur effet sur la santé humaine ou leur importance pour l'industrie agroalimentaire, les composés phénoliques constituent une classe majeure de métabolites secondaires à étudier. Leur caractérisation et l'identification des enzymes de biosynthèse ont déjà fait l'objet d'un grand nombre d'études mais il reste encore aujourd'hui de nombreuses questions concernant la génétique de ces composés.

La pomme, espèce d'importance économique mondiale, est l'un des fruits les plus riches en composés phénoliques. La sélection assistée par marqueurs (SAM) est particulièrement indiquée pour ce type d'espèces qui requiert des cycles de sélection particulièrement long et coûteux. Des études préalables, comme la cartographie de QTL, sont nécessaires avant d'entreprendre ce genre d'approche.

Deux études ont été publiées sur la cartographie QTL des composés phénoliques des pommes (Chagne, Krieger et al. 2012; Khan, Chibon et al. 2012), Cf. § III.E.2, p.56. Deux principales différences sont à noter entre ces études antérieures et celle présentée dans ce manuscrit :

- La descendance étudiée ici est de type pomme à cidre alors que les études antérieures portaient sur des pommes à couteau. Les différences phénotypiques

entre ces deux types de pomme ont largement été démontrées dans les paragraphes précédents et la comparaison génétique des deux montrera également des points de divergence.

- L'étude des jus est tout à fait originale dans ces travaux de thèse puisque les deux études précédentes sont centrées sur l'analyse des fruits.

Les travaux développés au cours de cette thèse sont articulés autour de trois questions de recherche qui constitueront par la suite les trois chapitres principaux de ce manuscrit :

- I. Les méthodes de génotypage actuelles, rapides et simples d'utilisation, permettent l'analyse d'un grand nombre d'individus. En revanche, les méthodes de phénotypage sont encore souvent longues et laborieuses ce qui limite souvent les études génétiques. Les méthodes HPLC décrites dans la littérature pour l'analyse des jus de pomme permettent d'automatiser les dosages des composés phénoliques mais restent encore trop longues, compte tenu du nombre d'échantillons nécessaire aux détections de QTL. De plus, des différences significatives peuvent être obtenues en fonction du détecteur considéré (Weingerl, Strlic et al. 2009; Sallustio, Noll et al. 2011).
 - La méthode UHPLC peut-elle être utilisée à haut débit pour le phénotypage et quelles sont les différences entre une quantification en masse ou en UV ?
- II. Les composés phénoliques ont déjà fait l'objet de nombreuses études visant à les caractériser qualitativement et quantitativement, aussi bien dans les fruits que dans les jus de pomme. En revanche, ce travail n'a pour le moment jamais été réalisé au sein d'une descendance de pommiers à cidre.
 - Quels sont les profils phénoliques et la variabilité observée dans les fruits et les jus préparés à partir d'une descendance de pommiers à cidre ? Quelle est l'héritabilité au sens large de ces caractères ? (Travaux réalisés en collaboration avec l'INRA de Rennes)
- III. Malgré leur importance pour la filière cidricole, les composés phénoliques n'ont à l'heure actuelle fait l'objet d'aucune étude génétique.
 - Quels sont les QTL impliqués dans la teneur en composés phénoliques des fruits et des jus pour une descendance de pomme à cidre ? Quels sont les gènes candidats sous-jacents ?

Chapitre I :

Développement, validation et comparaison de deux méthodes de chromatographie liquide (UHPLC-UV et UHPLC-MS/MS) pour la quantification des composés phénoliques du jus de pomme.

Contexte

Avant de commencer l'étude génétique des composés phénoliques, il a fallu déterminer la méthode avec laquelle le phénotypage devait être réalisé. L'étude de la bibliographie a permis de mettre en évidence l'efficacité, la précision et la reproductibilité des méthodes de chromatographie liquide associées aux détecteurs de type masse ou UV. En revanche, toutes les méthodes développées en HPLC classique pour l'analyse de matrices complexes, comme peut l'être un jus de pommes, sont souvent très longues et/ou peu résolutive.

Comme les détections de QTL nécessitent un très grand nombre d'échantillons, l'adaptation de ces méthodes existantes pour notre étude aurait engendrée des temps d'analyse beaucoup trop longs. Avec l'acquisition en 2010 d'une UHPLC associée à un détecteur de type masse triple quadrupôles, suivi en 2011 d'un détecteur UV-PDA par le laboratoire SONAS, il nous a été possible de développer des méthodes de séparation des composés phénoliques plus rapides qu'en HPLC et d'assurer une quantification spécifique des composés, tout particulièrement grâce à l'utilisation du mode SRM.

Ce premier chapitre de la thèse propose donc deux méthodes en UHPLC-UV et UHPLC-MS/MS pour la séparation et la quantification des composés phénoliques majoritaires du jus de pomme. Ces deux méthodes ont été validées séparément en estimant les limites de détection et de quantification, la linéarité, le recouvrement et la précision pour la quantification de 15 composés phénoliques majoritaires. Les quantifications obtenues pour 120 génotypes de la descendance étudiée ont permis de comparer ces deux modes de détection. Il en résulte une très bonne corrélation des dosages obtenus en UV et en SRM. En revanche, une surestimation de l'acide chlorogénique en UV met en évidence une possible co-élution non détectée en SRM. A l'inverse, la surestimation des dosages de l'épicatéchine, l'acide 4-*p*-coumaroylquinique, l'avicularine et la quercitrine en SRM semble, quant à elle, mettre en évidence des effets de matrice interférant au niveau de la source d'ionisation du spectromètre de masse. Malgré l'utilisation d'un système chromatographique performant et un choix de conditions expérimentales (temps d'analyse de 35 min pour une résolution >1.5), quelques divergences demeurent entre les mesures quantitatives obtenues avec les deux détecteurs.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans « Molecules » et d'un poster présenté lors du XXVIth International Conference on Polyphenols (Annexe I).

Le détail de la méthode chromatographique utilisée en 2009 est présenté en Annexe II. Seuls le débit de solvant, le temps d'analyse et le spray voltage sont différents de ceux présentés dans ce chapitre.

L'ensemble des composés détectés avec cette méthode est présenté en Annexe III.

COMPARISON OF TWO METHODS, UHPLC-UV AND UHPLC-MS/MS, FOR THE QUANTIFICATION OF POLYPHENOLS IN CIDER APPLE JUICES

Cindy F. Verdu^{a,b,c,d,*}, Julia Gatto^a, Ingrid Freuze^e, Pascal Richomme^a, François Laurens^{b,c,d}, David Guilet^a

^aLaboratoire de Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux, EA 921, IFR 149 Quasav, Université d'Angers, 16 bd Daviers, 49045 Angers, France.

^bUniversité d'Angers, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, 49045 Angers, France.

^cAgroCampus-Ouest, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 49045 Angers, France.

^dINRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture and Semences, 49071 Beaucouzé, France.

^ePlateforme d'Ingénierie et Analyses Moléculaires, Université d'Angers, Bâtiment K-UFR Sciences, 2 bd Lavoisier, 49045 Angers, France.

*Corresponding author: cindyverdu@gmail.com; Tel.: +33 (0)2 41 22 57 83; Fax: +33 (0)2 41 22 66 34.

Abstract

The aim of this study was to develop faster and more efficient phenotyping methods for in-depth genetic studies on cider apple progeny. The UHPLC chromatographic system was chosen to separate polyphenolic compounds, and quantifications were then simultaneously performed with a UV-PDA detector and an ESI-triple quadrupole mass analyzer (SRM mode). Both quantification methods were validated using two apple juice samples for 15 major compounds, on the basis of linearity, limits of detection and quantification, recovery and precision tests. The comparison between UV and SRM quantifications in 120 different samples of a cider apple progeny showed an excellent correlation for major compounds quantified with both methods. However, an overestimation was revealed for five compounds with the UV detector and the mass analyzer. Co-elution and matrix effects are discussed to explain this phenomenon. SRM methods should therefore be considered with restrictions in some cases for quantification measurements when several phenolic compounds are simultaneously quantified in complex matrices such as apple juices. For both methods, analyses were carried out over short periods of time while maintaining a high quality for the simultaneous quantification of phenolic compounds in apple juice. Each method is relevant for more in-depth genetic studies of the polyphenol content of apple juice.

Keywords: *Malus x domestica*; LC-UV; LC-MSⁿ; phenolic compounds.

1. Introduction

Cider is essentially produced and consumed in Europe and Canada. Apple varieties and manufacturing processes differ, depending on the country. In France, ciders are the result of a combination of many apple varieties, chosen on the basis of their acidity and tannin content (Tavernier and Jacquin 1959). Cider quality is defined with respect to color, astringency, bitterness, aroma, acidity and sugar content. Some of these traits are directly related to the phenolic content. The polymeric degree of procyanidins influences either the bitterness or the astringency of the beverage, whereas its color is linked to the enzymatic oxidation of p(Weingerl, Strlic et al. 2009)henolic compounds such as procyanidins, (+)-catechin and phloridzin by polyphenol oxidase (Lea and Arnold 1978; Song, Yao et al. 2007). Some hydroxycinnamic acids may also be the precursors of some volatile compounds responsible for cider aroma (Herrero, Cuesta et al. 1999). Furthermore, these compounds are widely considered to have a favorable antioxidant potential for human health. Indeed, phenolic compounds have shown *in vitro* anticancer properties (Lin and Weng 2006). For example, chemoprevention of human colon cancer has been reported for apple procyanidins, whereas it appears that the flavonoids, quercetin and naringenin, lower lung cancer risk (Le Marchand, Murphy et al. 2000; Gosse, Guyot et al. 2005; Maldonado-Cellis, Bousserouel et al. 2009). As far as cardiovascular and coronary heart diseases are concerned, diets high in flavanones and anthocyanidins are associated with a reduced risk of death (Mink, Scrafford et al. 2007).

Apple, apple juice and cider consumption are inversely correlated with the development of diseases such as asthma, diabetes, cancer and cardiovascular diseases (Boyer and Liu 2004; Crozier, Jaganath et al. 2009). Linked to the *in vitro* effects of phenolic compounds, the favorable effects of apple consumption are often attributed to their high phenolic content related to their high antioxidant potential. Lee et al. (2003) showed that quercetin glycosides, epicatechin and procyanidin B2 contribute more than vitamin C to the total antioxidant potential of apples (Lee, Kim et al. 2003). However, it is still not understood how these compounds can transfer their antioxidant potential to the human body and what is the protective role of other constituents such as fibers against these diseases (McDougall, Morrison et al. 1996; Lotito and Frei 2006).

To understand the favorable effects of phenolic compounds on human health, a large number of studies have been devoted to apples in the past. The main classes of polyphenols are monomeric and polymeric flavan-3-ols

(e.g., catechins or procyanidins), phenolic acids (e.g., chlorogenic acid), flavonols (e.g., quercitrin) and dihydrochalcones (e.g., phloridzin) (Tsao, Yang et al. 2003).

The present study was carried out to develop a rapid, sensitive and reproducible quantification method of phenolic compounds in order to conduct a genetic study based on a large number of progenies. Indeed, despite their great interest for the cider industry, no genetic study had yet been published for cider apples. Our study was based on a cider apple progeny containing 120 different individuals. Because of the high number of samples, a fast phenotyping method was required and the UHPLC method seemed to be the most appropriate. Faster methods have been recently proposed to quantify polyphenols using more powerful chromatographic systems such as UHPLC coupled with a UV detector (Novakova, Spacil et al. 2010; Ortega, Romero et al. 2010) or a mass analyzer (Ortega, Romero et al. 2010; Ceymann, Arrigoni et al. 2011).

Nevertheless, significant differences have already been reported between the quantification of phenolic compounds obtained using the HPLC-UV and HPLC-MS methods. This disparity has often been associated with co-elution phenomena and, more generally, with matrix effects, particularly those observed in HPLC-UV analysis (Weingerl, Strlic et al. 2009).

To define which detector could be adapted to our analytical requirement, two UHPLC methods using a UV-PDA detector and an ESI-triple quadrupole mass analyzer used in SRM (Single Reaction Monitoring) mode were developed. UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS were used simultaneously to quantify 15 major phenolic compounds in cider apple juice. Both methods were separately validated by linearity, limits of detection and quantification, recovery and precision tests. Additionally, both quantifications obtained for 120 samples were used to compare results for major phenolic compounds.

2. Materials and Methods

2.1. Standards and chemicals

LC/MS-grade MeOH was purchased from Carlo Erba reagents (Val de Reuil, France). Formic acid and acetic acid of LC/MS grade were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France). Ultrapure water was obtained from a MilliQ water purification system (Millipore S.A., Molsheim, France). Standards of procyanidins B1, B2, B5 and C1, 4-*p*-coumaroylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid and phloretin xyloglucoside were obtained from Polyphenol Biotech (Bordeaux, France). (+)-catechin, (-)-epicatechin, chlorogenic acid, phloridzin and rutin

were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Hyperin was obtained from Extrasynthese (Genay, France), avicularin was obtained from LGC Standards SARL (Molsheim, France), and quercitrin was purified in the laboratory (more than 80% purity).

2.2. UHPLC-UV-MS instrumentation and conditions

All UHPLC analyses were performed using a Thermo Accela High Speed LC system (Thermo Scientific, Gometz le Châtel, France) equipped with a refrigerated autosampler. Samples were injected into a Zorbax Eclips Plus C18 column (2.1 x 50 mm, 1.8 μ m; Agilent) using a 10- μ L loop in partial loop mode. The column was heated at 30°C and was equipped with an in-line filter (0.2 μ m) (Thermo Scientific). The following solvents were used: (A) 0.1% formic acid in water, and (B) methanol with a time gradient mode T (min)/%B: 0/10, 1/10, 3/18, 11/18.5, 13/21.5, 17/25.5, 21/29, 23/32, 35/50. The flow rate was set at 250 μ L/min.

The UV experiments were performed with a Thermo Accela PDA detector. Hydroxycinnamic acids were detected at 320 nm and dihydrochalcones, flavonols and flavanols were detected at 280 nm.

The MS experiments were performed with a Thermo TSQ Quantum Access MAX equipped with an electrospray interface (ESI) operating in the negative ionization mode. Each standard was infused into the electrospray ion source at 5 μ g/mL in MeOH using a syringe pump at a flow rate of 250 μ L/min to determine the collision energy, the tube lens offset and the SRM transitions chosen to be the most sensitive with the lowest collision energy for each compound (Table 1).

The Selective Reaction Monitoring (SRM) mode was used to quantify phenolic compounds. The ESI conditions were as follow: spray voltage, 3500 V; vaporizer temperature, 350°C; sheath gas pressure, 48 arbitrary units (au); ion sweep gas, 1 au; auxiliary gas pressure, 13 au; capillary temperature, 200°C; skimmer offset, 0 au. The collision gas used was argon at a pressure of 1.5 mTorr. The data were processed using Xcalibur software (2.1). The retention times (Rt) of each compound are also listed in Table 1.

Moreover, the method described made it possible to separate and quantify the major phenolic compounds of apple juices in 35 min. Quantifications were simultaneously performed with a UV-PDA detector and an ESI-triple quadrupole mass spectrometer. The spectrometer divert valve was set to the waste position during the first minute to prevent more polar compounds such as polysaccharides from entering the ion source.

2.3. Preparation of standard solutions

A 1 mg/mL stock solution was prepared for each standard in MeOH and stored at -80°C (except for chlorogenic acid and epicatechin: 10 mg/mL). Stock solutions were combined into one single solution according to the expected relative proportions of each compound in targeted apple juices. This single solution was further diluted in order to prepare different working solutions (SWS1, SWS2 and SWS3; data not shown). Calibration curves were fitted for each standard using ten different final concentrations corresponding to the appropriate range for each compound (e.g., 0.5-500 ng injected for catechin; 0.015-50 ng injected for hyperin). Five replicates were taken and the mean linear regression of the mass of analyte injected versus its peak area was used as a calibration curve. The SWS solutions were stored at -80°C.

2.4. Sample preparation

The progeny used in this study was derived from two INRA hybrids, X5210 and X8402, crossed in 2000, and composed of 120 trees. Trees were planted on their own roots in 2003 in the orchards of the Horticulture Experimental Unit at INRA, Angers-Nantes.

Fruits (1 kg/tree) were harvested between September and November 2010 at the mature stage “50% of fallen fruits” which is the harvest stage in commercial cider orchards. The two hybrids used to validate the method (P12R3A28 and P12R3A67) were harvested in September 2009. Whole fruits were then cored and crushed to extract the juices. Sodium fluoride was added to stop phenolic oxidation and apple juices were stored at -80°C.

Sample stability was estimated with three replicates per tree prepared according to the two methods described above and stored at -80°C. Samples were then defrosted, mixed and placed in the autosampler 5 minutes before analysis began. Full analysis was completed after 44 hours with injections every 5 hours. Stability was estimated through ANOVA analysis.

2.5. Validation study

The method was developed on the 15 major phenolic compounds present in apple juices. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), linearity, recovery and precision of the method were evaluated.

For the LC-UV and LC-MS/MS methods, LOD and LOQ were estimated by injecting serial dilutions of working solutions with the final criterion signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively. The linearity of the calibration curves was assessed by injecting ten volumes of SWS in five replicates. Residuals (difference between nominal concentration and calculated concentration by the linear model) and their distribution (normally distributed around the mean) were monitored. The recovery of the method was tested in both apple juices, P12R3A28 and P12R3A67, with the addition of 100 μL of SWS1. These two mixes (P12R3A28-SWS1 and P12R3A67-SWS1) were analyzed in triplicate (1 μL injection). Results were expressed for each analyte by comparing their levels in spiked samples with those obtained in initial juices to which a known amount of analyte was added: $\text{recovery (\%)} = (\text{amount}_{\text{juice}} + \text{amount}_{\text{added}}) / \text{amount}_{\text{measured}} * 100$. The precision of the method, expressed by the relative standard deviation (RSD %), was estimated by measuring the compound levels in several replications of both apple juices. The intra-day variation was evaluated on five replicates of both apple juices, whereas the inter-day variation was evaluated on three replicates per juice on three different days.

3. Results and Discussion

3.1. Sample preparation

During this study, two analytical methods for the quantification of the major polyphenols in apple juices, i.e., UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS, were applied to a large number of apple juice samples (batch of 120 juices in triplicate), leading to long waiting times in the autosampler. To evaluate the stability of phenolic compounds based on former observations, a quantification of each compound was made every 5 hours for a storage period (autosampler at 4°C) of two days (Suarez, Picinelli et al. 1998). Two sample preparations were tested: the first one consisted in the injection of the raw apple juice, whereas the second one corresponded to a dilution with an equal volume of MeOH with 1% acetic acid.

A significantly better stability of compounds over 44 hours was obtained under acid conditions (data not shown).

3.2. UHPLC-UV& UHPLC-MS/MS conditions

Optimization of the chromatographic conditions was guided by the research of resolution values of adjacent peaks greater than 1.5. Separations were performed with a total run time of 35 min in order to avoid co-elutions that could have significantly impaired the UV quantification of polyphenols (except for compounds 10 and 11; Fig. 1). The analysis time was divided into three segments in the ESI-triple quadrupole mass spectrometer. The

first one (0 to 2 min) made it possible to avoid sugar signals. The second one (2 to 28 min) was used to analyze more polar phenolic compounds. In this segment, nine compounds were analyzed in parallel with a scan width and time fixed at 0.5 m/z and 0.08 s, respectively. The third segment (28 to 35 min) made it possible to analyze less polar compounds. Six compounds were there analyzed in parallel (0.5 m/z and 0.08 s). With these reduced scan times, the digital resolutions were still sufficient for automatic integration and quantification. At the same time, a full scan analyses was completed in the third quadrupole between 150 and 1160 m/z, with a scan time of 0.289 s. Additionally, the SRM mode developed in this method allowed an accurate identification with very good signal-to-noise ratios for compounds of interest (Fig. 2). Indeed, 4-caffeoylquinic acid, rutin, quercitrin and avicularin compounds could be easily quantified, even when they were barely detected in the TICs of apple juices.

These conditions allowed us to separate major phenolic compounds in 35 min. This time analysis is longer than that reported by Ceyman et al. (2011) (Ceymann, Arrigoni et al. 2011). We chose to increase analysis time to separate all major phenolic compounds present in apple juice, especially to avoid, as much as possible, co-elutions that may affect UV and mass quantifications due to possible matrix effects already reported by other authors (Weingerl, Strlic et al. 2009; Sallustio, Noll et al. 2011). The chromatogram obtained under these conditions is available to quantify 25 additional compounds identified primarily as polymeric flavanols, subject to the availability of standards.

3.3. Method validation

Both methods (UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS) were validated for quantification of the 15 major apple phenolic compounds, in accordance with performance criteria, by assessing precision, recovery, linearity, LOD and LOQ. The slopes, linear ranges, correlation coefficients of the calibration curves, LOD, LOQ, precision and recovery data are summarized in Table 2. The precision of each method was evaluated including estimations of the intra- and inter-day variations. It is expressed as a relative standard deviation (RSD %). Except for 4-caffeoylquinic acid, intra-day RSD values for all compounds were below 4.0% for the UHPLC-UV method and 5.8% for the UHPLC-MS method. Inter-day RSD varied from 2.6 to 6.2% (11.6% for 4-caffeoylquinic acid) with UV detection, and the values recorded with MS detection were slightly higher with variations ranging from 3.0 to 10.0%. The recovery of the methods was tested in the two apple juices, P12R3A28 and P12R3A67, with the addition of SWS1. For recovery rates, the results obtained ranged from 94.3 to 110.4% with UV detection and from 91.2 to 113.3% with MS detection (Table 2 for P12R3A28 apple juice). The recovery was more than

95% for most of the major phenolic compounds with the two methods. The error range, from 5 to 13%, for epicatechin, procyanidin C1, 4-*p*-coumaroylquinic acid and flavonols, is acceptable, given the number of simultaneous quantified compounds and requirements for genetic studies. The linearity of the method was evaluated with the injection of the SWS at ten injection volumes, in five replicates. For each compound, the range of linearity was assessed after control of the residuals. Calibration data from both methods indicated the linearity for all standards of the UV detection ($r^2 > 0.990$) and the MS detection ($r^2 > 0.989$). As expected, the LOD and LOQ were higher for UV detection with values – depending on standards – comprised between 0.33 and 4 ng (LOD) and 0.5 and 10 ng (LOQ), when compared to those recorded for MS detection of 0.003 and 2 ng (LOD) and 0.007 and 6.67 ng (LOQ).

3.4. Comparison of the UHPLC-UV & UHPLC-MS/MS methods

Apple juices were prepared from 120 progenies and were analyzed in triplicate in both methods. Table 3 shows the range of each compound present in the apple juices prepared from the apple progeny studied. The major compound of apple juice is chlorogenic acid, with concentrations ranging from 97.23 to 741.1 $\mu\text{g/mL}$ apple juice. Procyanidin B2 is the second major compound with concentrations ranging from 76.2 to 355.7 $\mu\text{g/mL}$. The least concentrated compound is rutin, with a concentration ranging from 0.16 to 1.75 $\mu\text{g/mL}$. These results are in accordance with former studies published on cider apple juice (Kahle, Krauss et al. 2005). For all standards, the concentrations measured by the two methods in apple juices were in agreement over the range of calibration, with correlation coefficients $r^2 > 0.948$, except for avicularin and hyperin, with $r^2 = 0.898$ and $r^2 = 0.861$, respectively (Fig. 3). The slopes of the linear regression obtained by comparison of the quantification of 120 apple juices with the UV-PDA detector and the ESI-triple quadrupole mass spectrometer (Fig. 3) ranged from 0.468 (avicularin) to 1.345 (chlorogenic acid). For hyperin, procyanidin B1, procyanidin C1, catechin, 4-caffeoylquinic acid, phloridzin and phloretin xyloglucoside, the slope values (around 1.0 ± 0.1) indicated that UV quantification was in accordance with MS/MS quantification. There seems to be no systematic bias for these compounds in both methods (no co-elution phenomena, no matrix effect). Despite the independent validation of the two methods, the quantifications were not equivalent for five compounds. On one hand, chlorogenic acid was overestimated with the UV-PDA detector compared to the MS quantification (slope value: 1.345). Matrix effects are generally associated with response suppression effects, as observed in ESI-MS quantification, when compared to other detection methods (Cappiello, Famiglini et al. 2008; Weingerl, Strlic et al. 2009). Under our conditions, a co-elution phenomenon probably explains the UV/MS differences in chlorogenic acid estimations

(Caporossi, Tranfo et al. 2010). Indeed, this analyte was co-eluted with an unidentified compound with positive UV absorbance at 320 nm and which was not quantified under SRM conditions with MS filters at 353 and 192 uma. This hypothesis was supported by the emergence of a weak peak at 436.7 uma under UHPLC-MS conditions, at the same retention time as chlorogenic acid. Despite the use of the UHPLC system and a relatively long time analysis, the chromatographic resolution was not sufficient to avoid co-elutions for concentrated compounds such as chlorogenic acid in apple juices. The use of SRM was therefore well adapted in this case.

On the other hand, quercitrin, epicatechin and 4-*p*-coumaroylquinic acid, as well as avicularin, were underrated with the UV-PDA detector compared to the MS quantification (slope values: 0.782, 0.629, 0.649 and 0.468, respectively). Several studies have already reported similar results without any additional explanation (Weingerl, Strlic et al. 2009; Sallustio, Noll et al. 2011). Since we compared the results obtained from simultaneous UV and MS analysis here, samples or standard preparations could not be implicated in these variations. Results could be explained by matrix effects, often highlighted in LC-ESI-MS, with an increasing ionization response associated with co-eluting components. The recovery test results obtained for the P12R3A28 apple juice for these compounds seem to be in accordance with this hypothesis since four of the five results obtained are the highest ones in this assay. However, results obtained for the second apple juice, P12R3A67, were better and did not show any matrix effects. Nevertheless, it remains difficult to draw conclusions on the basis of these results. It therefore appears that LC-MS quantifications cannot be ubiquitously applied to the linear quantification of all phenolic compounds, especially when dealing with complex matrixes such as apple juices. Further studies will then be required to validate our explanations. Hernando et al. (2007) have already proposed to greatly dilute the sample in order to reduce the presence of matrix interference (Hernando, Ferrer et al. 2007). However, this is only applicable for some apple juices that are sufficiently concentrated to be quantified with both methods.

Conclusion

The use of the UHPLC system to separate phenolic compounds in apple juice allowed a more sensitive and more rapid analysis than conventional HPLC. The two methods for the quantification of phenolic compounds in apple juices by UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS were validated on the basis of LOD, LOQ, linearity, recovery and precision tests. A total of 120 different samples of cider apple juice were analyzed using these two methods, and 12 major compounds were quantified with both methods and then compared. Good correlations, ranging between 0.860 and 0.989, were obtained for all compounds. However, the slope value showed an overestimation of the UV detector for chlorogenic acid and an overestimation of the mass analyzer for epicatechin, 4-*p*-

coumaroylquinic acid, avicularin and quercitrin. The overestimation of chlorogenic acid could be explained by a co-elution with an unknown compound, highlighting the advantage of using the SRM mode to quantify highly concentrated compounds. For the four other compounds, some matrix effects may be responsible of the overestimation.

Even if these five compounds are relatively overestimated with one detector, the high correlation coefficient obtained indicates that both methods are well adapted for genetic studies. Moreover, UHPLC-based methods make it possible to significantly reduce the analysis time and to provide a better resolution, compared to HPLC methods. Given the large number of samples required for genetic analysis, UHPLC is the preferable method to be used in genetic studies.

Acknowledgements

This work was financially supported by funding for a PhD grant from the SFR 149 QUASAV (Structure Fédérative de Recherche: Qualité et Santé du Végétal), Angers, France. The authors would like to thank the team of the Horticulture Experimental Unit of INRA, Angers-Nantes, that takes care of the trees of the studied progeny.

References

- Boyer, J. and R. H. Liu (2004). "Apple phytochemicals and their health benefits." *Nutrition Journal* **3**(1): 5.
- Caporossi, L., G. Tranfo, et al. (2010). "LC Determination of the Skin Exposure to Oxamyl on Greenhouse Workers and Comparison Between DAD and MS–MS Detection." *Chromatographia* **72**: 281-287.
- Cappiello, A., G. Famiglini, et al. (2008). "Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* **80**(23): 9343-9348.
- Ceymann, M., E. Arrigoni, et al. (2011). "Rapid high performance screening method using UHPLC-MS to quantify 12 polyphenol compounds in fresh apples." *Analytical Methods* **3**: 1774-1778.
- Crozier, A., I. B. Jaganath, et al. (2009). "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." *Royal Society of Chemistry* **26**: 1001-1043.

- Gosse, F., S. Guyot, et al. (2005). "Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis." Carcinogenesis **26**(7): 1291-1295.
- Hernando, M. D., C. Ferrer, et al. (2007). "Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil." Analytical and Bioanalytical Chemistry **389**: 1815-1831.
- Herrero, M., I. Cuesta, et al. (1999). "Changes in Organic Acids During Malolactic Fermentation at Different Temperatures in Yeast-Fermented Apple Juice." Journal of the Institute of Brewing **105**(3): 191-195.
- Kahle, K., M. Krauss, et al. (2005). "Polyphenol profiles of apple juices." Molecular Nutrition and Food Research **49**: 797-806.
- Le Marchand, L., S. P. Murphy, et al. (2000). "Intake of Flavonoids and Lung Cancer." Journal of the National Cancer Institute **92**(2): 154-160.
- Lea, A. G. H. and G. M. Arnold (1978). "The phenolics of ciders: Bitterness and astringency." Journal of the Science of Food and Agriculture **29**(5): 478-483.
- Lee, K. W., Y. J. Kim, et al. (2003). "Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(22): 6516-6520.
- Lin, J.-K. and M.-S. Weng (2006). Flavonoids as Nutraceuticals. The Science of Flavonoids. E. Grotewold. Columbus: 26.
- Lotito, S. B. and B. Frei (2006). "Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?" Free Radical Biology and Medicine **41**: 1727-1746.
- Maldonado-Cellis, M.-E., S. Bousserouel, et al. (2009). "Differential Induction of Apoptosis by Apple Procyanidins in TRAIL-Sensitive Human Colon Tumor Cells and Derived TRAIL-Resistant Metastatic Cells." Journal of Cancer Molecules **5**(1): 21-30.
- McDougall, G. J., I. M. Morrison, et al. (1996). "Plant Cell Walls as Dietary Fibre: Range, Structure, Processing and Function." Journal of the Science of Food and Agriculture **70**(2): 133-150.
- Mink, P. J., C. G. Scrafford, et al. (2007). "Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women." The American Journal of Clinical Nutrition **85**: 895-909.

- Novakova, L., Z. Spacil, et al. (2010). "Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures." Talanta **80**: 1970-1979.
- Ortega, N., M.-P. Romero, et al. (2010). "Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples." Journal of Food Composition and Analysis **23**(3): 298-305.
- Sallustio, B. C., B. D. Noll, et al. (2011). "Comparison of blood sirolimus, tacrolimus and everolimus concentrations measured by LC-MS/MS, HPLC-UV and immunoassay methods." Clinical Biochemistry **44**: 231-236.
- Song, Y., Y.-X. Yao, et al. (2007). "Polyphenolic Compound and the Degree of Browning in Processing Apple Varieties." Agricultural Sciences in China **6**(5): 607-612.
- Suarez, B., A. Picinelli, et al. (1998). "Changes in Phenolic Composition of Apple Juices by HPLC with Direct Injection." Journal of the Science of Food and Agriculture **78**: 461-465.
- Tavernier, J. and P. Jacquin (1959). Etude technologique de variétés de pommes à cidre. Paris, Comité des fruits à cidre et des productions cidricoles.
- Tsao, R., R. Yang, et al. (2003). "Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(21): 6347-6353.
- Weingerl, V., M. Strlic, et al. (2009). "Comparison of Methods for Determination of Polyphenols in Wine by HPLC-UV/VIS, LC/MS/MS and Spectrophotometry." Acta Chimica Slovenica **56**: 698-703.

Figures

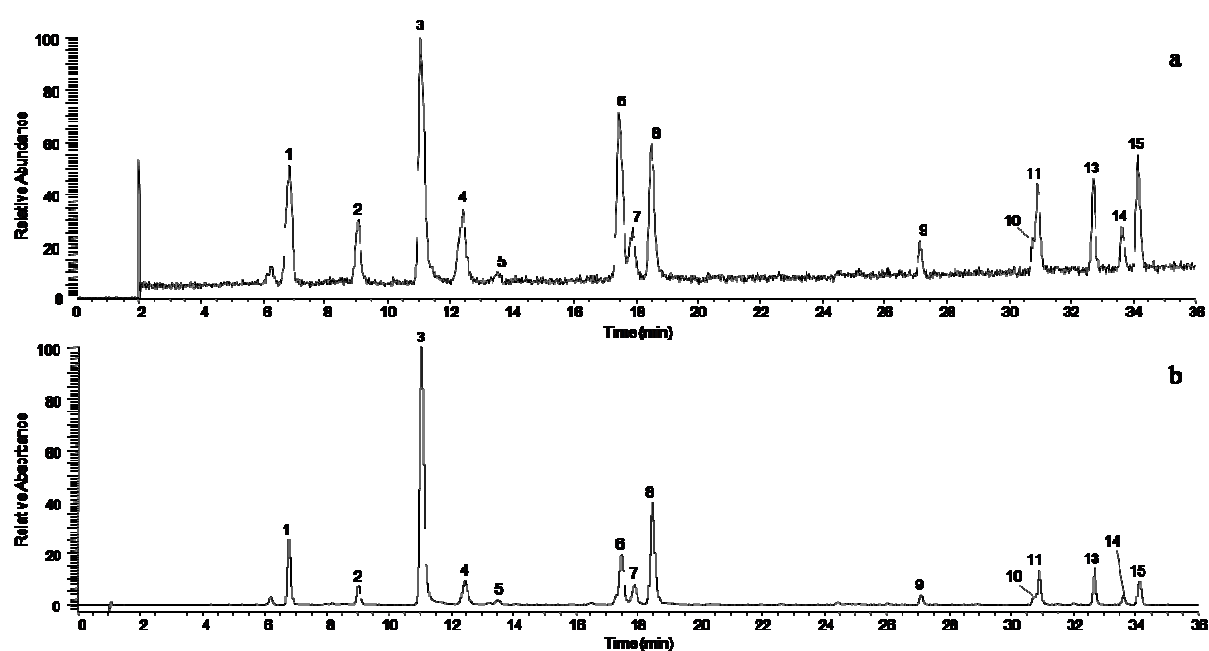


Figure 1. UHPLC-ESI Total Ion Current (TIC) A) and UHPLC-UV (λ 280 nm) B) chromatograms of standard working solutions. Procyanidin B1 (1), catechin (2), chlorogenic acid (3), procyanidin B2 (4), 4-caffeoylquinic acid (5), epicatechin (6), procyanidin C1 (7), 4-*p*-coumaroylquinic acid (8), procyanidin B5 (9), hyperin (10), phloretin xyloglucoside (11), phloridzin (13), avicularin (14) and quercitrin (15).

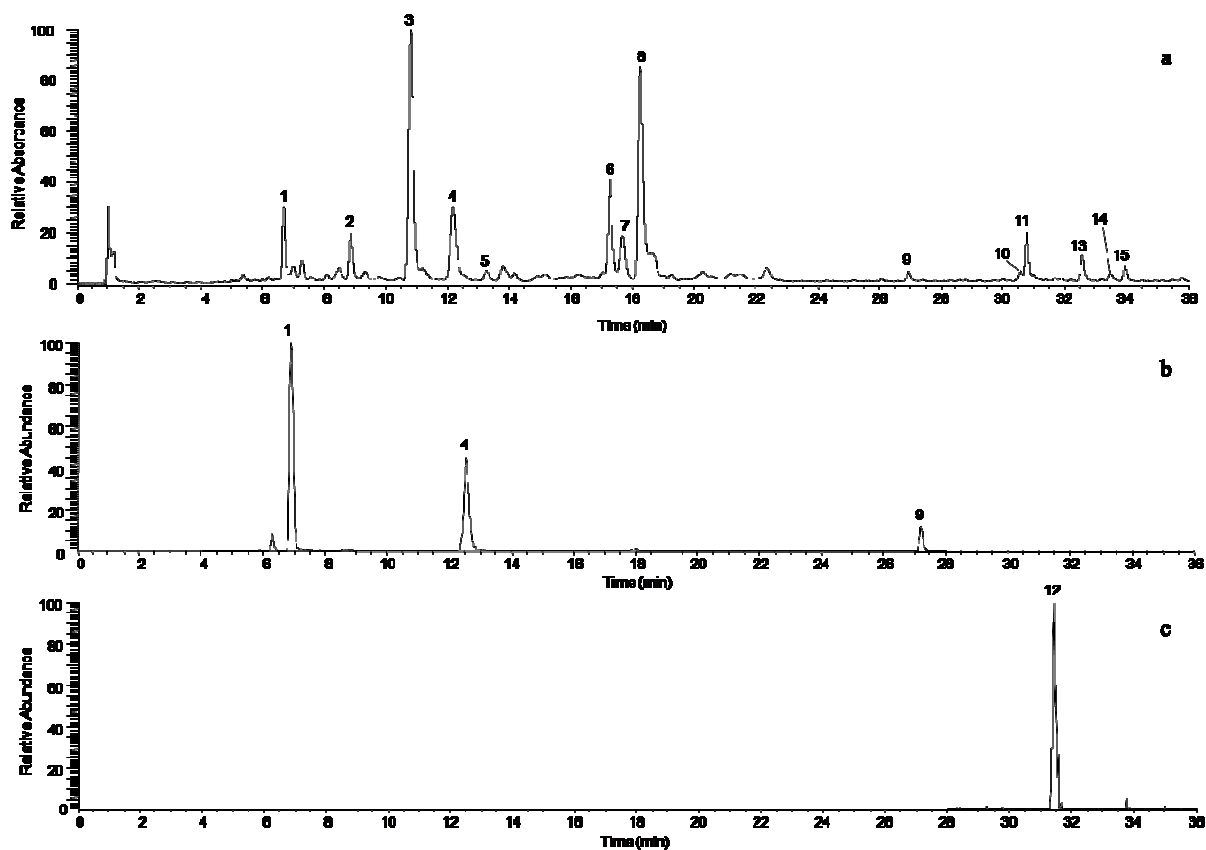


Figure 2. UHPLC-UV TIC (λ 280 nm, A) and UHPLC-MS/MS in Single Reaction Monitoring (SRM) optimized for procyanidin B: 577 m/z parent ions and 289 m/z fragment ions were selected with collision energy at 16 V (B); and for rutin: 609 m/z parent ions and 300 m/z fragment ions were selected with collision energy at 40 V (C). Procyanidin B1 (1), catechin (2), chlorogenic acid (3), procyanidin B2 (4), 4-caffeoylquinic acid (5), epicatechin (6), procyanidin C1 (7), 4-*p*-coumaroylquinic acid (8), procyanidin B5 (9), hyperin (10), phloretin xyloglucoside (11), rutin (12), phloridzin (13), avicularin (14) and quercitrin (15).

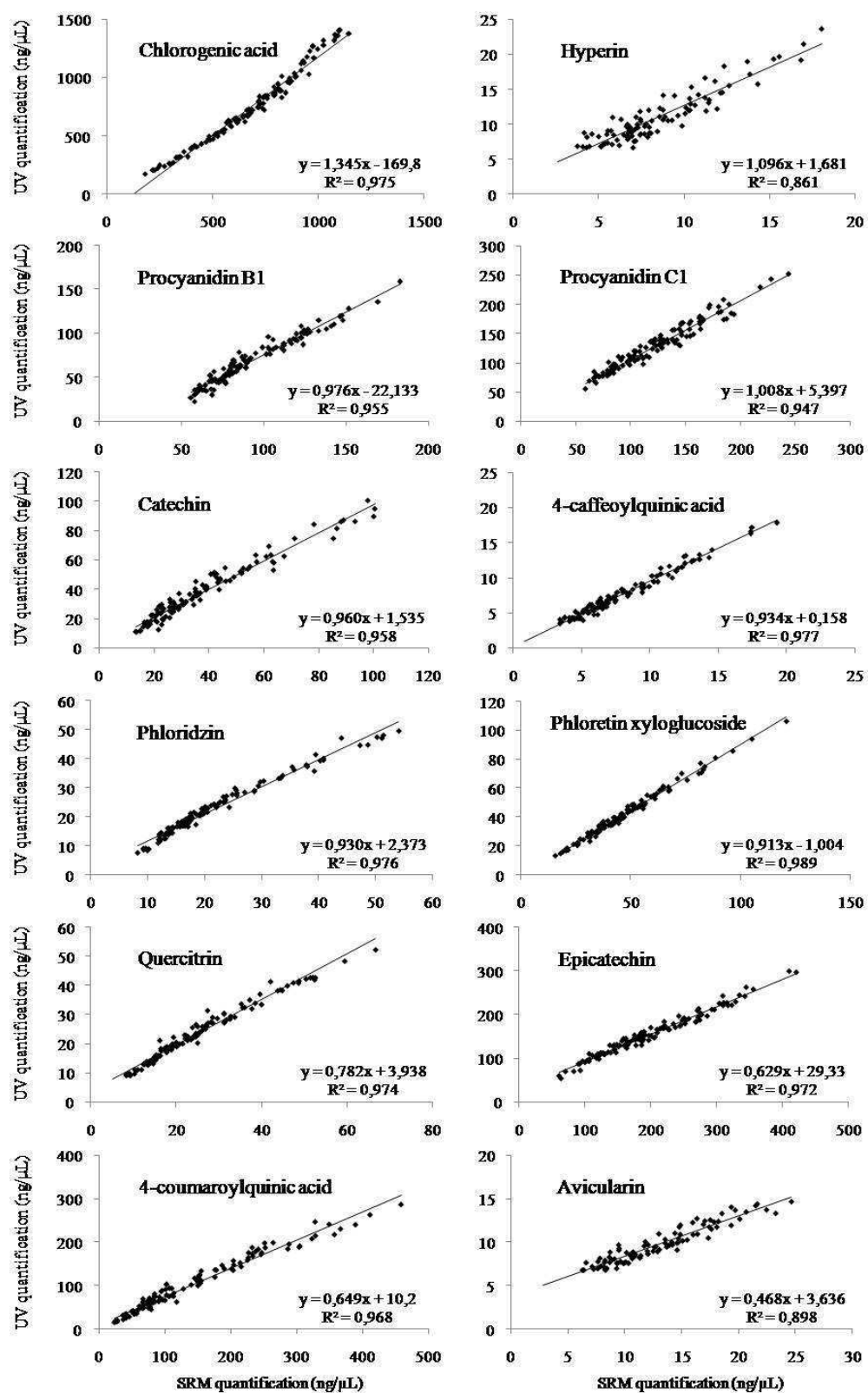


Figure 3. Comparison of the quantifications of 120 apple juices (n=3, P value < 0.0001) with the UV-PDA detector (X-axis) and the ESI-triple quadrupole mass analyzer (Y-axis).

Tables

Table 1. Retention time (Rt), MS/MS fragment ions, collision energy (CE) and Tube Lens Offset (TLO) for the 15 major phenolic compounds of apple juices.

Compounds ^a	R _t (min)	Precursor ion [M-H] ⁻ (m/z)	Fragments [M-H] ⁻ (m/z)	CE (V)	TLO (a.u.)
PB1	6.8	577	289	30	159
Ca	9.1	289	245	16	159
CA	11.2	353	191	22	62
PB2	12.5	577	289	30	159
4CA	13.5	353	173	20	58
Eca	17.6	289	245	16	159
PC1	18.0	865	289	45	159
4PCQA	18.6	337	173	16	159
PB5	27.2	577	289	30	159
QGa	30.8	463	300	32	159
PLXG	31.0	567	273	20	139
QR	31.6	609	300	40	159
PLG	32.8	435	167	32	159
QA	33.7	433	300	15	160
QRh	34.2	447	300	32	159

^aPB1: procyanidin B1; Ca: (+)-catechin; CA: chlorogenic acid; PB2: procyanidin B2; 4CA: 4-caffeoylquinic acid; Eca: (-)-epicatechin; PC1: procyanidin C1; 4PCQA: 4-*p*-coumaroylquinic acid; PB5: procyanidin B5; QGa: hyperin; PLXG: phloretin xyloglucoside; QR: rutin; PLG: phloridzin; QA: avicularin; QRh: quercitrin.

Table 2. Calibration curve parameters for the 15 major phenolic compounds according to UV or MS detection and results of the validation study for P12R3A28 apple juice.

Compounds ^a	Regression equation ^b	Correlation coefficient (r)	Linear range ^c	LOD ^c	LOQ ^c	Juice ^c	Precision (%)		Added ^c	Measured ^c	RSD (%)	Recovery ^f (%)
							Intra ^d	Inter ^e				
UHPLC-UV												
PB1	Y=21689+2153.2X	0.9923	13.30 -500	0.3	1.7	24.76	3.3	4.1	10,00	36.26	1.0	95.9
Ca	Y=-489.51+3086.7X	0.9989	4.0-150	0.5	2.0	18.63	1.8	4.1	3.0	20.83	2.3	103.8
CA	Y=45046+9890.3X	0.9997	20-1500	<0.5	0.5	110.39	2.6	2.6	30,00	138.14	1.7	101.6
PB2	Y=13047+1674.0X	0.9944	13.3-500	0.7	6.7	76.82	2.6	2.6	10,00	92.1	2.7	94.3
4CA	Y=8413+8554.6X	0.9912	1.67-25	0.3	1.7	2.44	5.3	11.6	0.5	3,00	9.5	98,00
ECa	Y=-23692+3783.4X	0.9971	33.3 -500	0.7	1.7	67.18	3.4	2.9	10,00	73.37	1.1	105.2
PC1	Y=12620+1922.0X	0.9900	20-300	1.0	4.0	51.58	3.7	3.2	10,00	57.29	5.8	107.5
4PCQA	Y=9224.5+10112X	0.9999	1.67-500	0.3	0.7	22.16	2.2	2.6	10,00	32.23	2.2	99.8
PB5	Y=-390.79+3058.7X	0.9995	1.78-66.5	0.9	1.8	4.51	4.0	4.2	1.33	5.74	2.1	101.7
QGa	Y=-1292.4+7250.6X	0.9994	1.33-50	3.3	10.0	5.18	1.3	2.9	1.0	5.78	4.7	106.9
PLXG	Y = 935.15+5226.0X	0.9997	2.0-150	0.5	1.0	18.65	2.1	2.8	3.0	22.19	4.5	97.6
QR	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd
PLG	Y=-782.23+8112.4X	0.9998	1.33-100	0.3	1.3	6.86	1.8	3.2	2.0	8.54	2.1	103.8
QA	Y=-665.42+7232.9X	0.9991	3.33-50	3.3	10.0	3.35	2.2	3.8	1.0	3.94	3.0	110.4
QRh	Y=-2177.8+5159.0X	0.9994	4.0-150	4.0	10.0	3.32	1.7	6.2	3.0	6.04	1.4	104.6
UHPLC-MS/MS												
PB1	Y=-42711+39800X	0.9970	6.67 -500	0.2	0.17	23.89	2.6	10.7	10,00	34.14	2.7	99.3
Ca	Y=-92586+46791X	0.9938	4.0-150	2.0	4.0	15.31	4.4	9.8	3.0	18.44	5.7	99.3
CA	Y=7634200+302370X	0.9922	20-1500	0.5	1.0	126.16	3.2	6.8	30,00	171.18	2.9	91.2
PB2	Y=-3107.7+29137X	0.9968	1.67-500	0.2	0.33	66.06	3.7	8.1	10,00	77.18	3.1	98.6
4CA	Y=39949+297480X	0.994	0.33-25	0.08	0.33	1.99	6.8	9.0	0.5	2.42	2.8	102.7
ECa	Y=-328880+53294X	0.9957	13.3 -500	1.7	6.7	69.88	5.1	8.8	10,00	80.03	3.7	99.8
PC1	Y=12323+20204X	0.9976	4.0-300	<0.1	0.2	34.01	0.3	4.9	10,00	41,00	1.4	107.4
4PCQA	Y=- 1655300+131390X	0.9893	0.67-500	0.17	0.67	21.46	2.5	3.0	10,00	27.76	2.6	113.3
PB5	Y=-9772.9+37935X	0.9961	0.89-66.5	0.08	0.2	3.24	2.3	5.07	1.33	4.46	4.9	102.4
QGa	Y=-66428+333280X	0.9977	0.67-50	<0.02	0.02	4.9	2.8	3.5	1.0	5.76	3.8	102.4
PLXG	Y=565330+480430X	0.9981	2.0-150	<0.05	1.0	21.46	3.9	5.0	3.0	24.81	3.0	98.6
QR	Y=-10222+570740X	0.9991	0.070-5	0.003	0.007	0.1	7.2	3.7	0.1	0.19	5.7	102.8
PLG	Y=-4619.6+198410X	0.997	0.33-100	<0.03	0.03	6.68	5.4	5.2	2.0	8.33	3.1	104.1
QA	Y=-61100+84940X	0.9973	1.33-50	0.17	1.3	2.84	5.8	4.0	1.0	3.46	2.7	110.9
QRh	Y=-218580+174400X	0.9972	2.0-150	<0.05	0.05	3.68	4.2	3.9	3.0	5.96	1.4	112.1

^aPB1: procyanidin B1; Ca: (+)-catechin; CA: chlorogenic acid; PB2: procyanidin B2; 4CA: 4-caffeoylquinic acid; ECa: (-)-epicatechin; PC1: procyanidin C1; 4PCQA: 4-*p*-coumaroylquinic acid; PB5: procyanidin B5; QGa: hyperin; PLXG: phloretin xyloglucoside; QR: rutin; PLG: phloridzin; QA: avicularin; QRh: quercitrin.

^by = peak area; x = concentration of compound (μg/mL)

^cin nanograms

^dintra-day (n=5)

^einter-day (n=3x3)

^frecovery (%) = (amount_{juice} + amount_{added})/amount_{measured} × 100%

nd: not detected

Table 3. Range of concentrations of different phenolic compounds quantified with the UV-PDA detector and the ESI-triple quadrupole mass analyzer in 120 apple juices prepared from the progeny, X5210 x X8402.

Compounds ^a	UHPLC-UV		UHPLC-MS/MS	
	Min ^b	Max ^b	Min ^b	Max ^b
PB1	16.7	231.7	39.1	326.7
Ca	5.6	138.2	11.9	105.5
CA	89.3	2240.9	97.3	741.1
PB2	120.1	650.3	nq	nq
4CA	3.4	17.8	1.8	12.4
ECa	54.3	298.5	49.4	246.8
PC1	54.9	269.7	54.1	242.8
4PCQA	2.9	394.1	12.2	126.3
PB5	6	35.7	nq	nq
QGa	6.7	23.7	2.3	12
PLXG	13.3	113.9	14.6	126.9
QR	nd	nd	0.2	1.7
PLG	7.5	74.1	6.3	44.3
QA	6.8	20.6	2.8	10.3
QRh	9.2	76.6	3.8	37.2

^aPB1: procyanidin B1; Ca: (+)-catechin; CA: chlorogenic acid; PB2: procyanidin B2; 4CA: 4-caffeoylquinic acid; ECa: (-)-epicatechin; PC1: procyanidin C1; 4PCQA: 4-*p*-coumaroylquinic acid; PB5: procyanidin B5; QGa: hyperin; PLXG: phloretin xyloglucoside; QR: rutin; PLG: phloridzin; QA: avicularin; QRh: quercitrin.

^bin µg/mL apple juice

nd: not detected

nq: not quantified

Chapitre II :

Analyse des données de phénotypage et comparaison des profils phénoliques obtenus dans les jus de pomme et les fruits préparés à partir d'une descendance de pommiers à cidre.

Contexte

La descendance de pommiers étudiée au cours de cette thèse a été réalisée à l'origine pour la création de nouvelles variétés cidrières. Elle est issue du croisement de deux hybrides sélectionnés l'un pour ses qualités cidrières, l'autre pour sa résistance aux maladies. Les 462 arbres qui composent cette descendance sont plantés sur le site de l'INRA d'Angers. Cette descendance a été sélectionnée dans le cadre du programme interrégional INNOVACIDRE (2005-2010) qui a eu pour objectif la sélection de nouveaux géniteurs de pommiers à cidre. Dans le cadre de ce projet, des analyses sur la teneur en composés phénoliques des fruits ont été réalisées à l'INRA de Rennes pour les fruits récoltés entre 2007 et 2010. Leur dosage dans les jus et la cartographie de QTL ont été réalisés dans le cadre de cette thèse.

Avant de réaliser la détection de QTL, nous avons souhaité étudier les différences quantitatives et qualitatives existantes entre les extraits de fruit analysés à l'INRA de Rennes et les jus de pomme préparés à Angers. Les variations liées à l'année de récolte ont également été pris en compte. Dans l'état actuel de nos connaissances, aucune étude n'a fait état de l'analyse des profils phénoliques au sein d'une descendance de pommes à cidre.

Les concentrations et les profils phénoliques observés dans la descendance sont représentatifs des principales variétés à cidre Européennes décrites dans la littérature, aussi bien pour les jus que pour les fruits. Les composés phénoliques sont plus concentrés dans les fruits, en lien avec leur rendement d'extraction. Tous les composés ont un effet génétique significatif mais pour certains flavonols, l'effet de l'année de récolte est supérieur. L'héritabilité calculée est forte pour tous les composés, avec des valeurs plus faibles pour les jus.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication soumise dans « Journal of the Science of Food and Agriculture ».

Les distributions des données phénotypiques obtenues dans les fruits en 2008 et 2009 et dans les jus en 2009 et 2010 (UV et SRM) sont présentées en Annexe IV.

POLYPHENOL VARIABILITY IN THE FRUITS AND JUICES OF A CIDER

APPLE PROGENY

Cindy F. Verdu^{a,b,c,d}, Nicolas, Childebrand^{b,c,d}, Nathalie Marnet^e, Gildas Lebail^e, Fabrice Dupuis^{b,c,d}, François Laurens^{b,c,d}, David Guilet^a, Sylvain Guyot^{e,*}

^aUniversité d'Angers, EA 921, Laboratoire de Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, 49045 Angers, France.

^bUniversité d'Angers, UMR1345, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, 49045 Angers, France.

^cAgroCampus-Ouest, UMR1345, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 49045 Angers, France.

^dINRA, UMR1345, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 49071 Beaucouzé, France.

^eINRA, UR117, Cidricoles et Biotransformation des Fruits et Légumes, 35650, Le Rheu, France.

*Corresponding author: Sylvain.Guyot@rennes.inra.fr; Tel.: +33 (0)2 23 48 52 09; Fax: +33 (0)2 23 48 52 10.

Abstract

Background: Polyphenols have a favorable antioxidant potential on human health, suggesting that their high content in apple is responsible for the beneficial effects of apple consumption. They are also linked to the quality of apple juices and ciders since they are predominantly responsible for astringency, bitterness, color and aroma. Major phenolic compounds were quantified by liquid chromatography in fruits and juices from a cider apple progeny harvested for three years. The total content of procyanidins and their average degree of polymerization (DP_n) were also determined in fruits by phloroglucinolysis. Variability and extraction yield of these compounds were determined.

Results: The variability observed in the progeny was representative of the variability observed in many cider apple varieties. Hydroxycinnamic acids were the most extractable group, with an average extraction yield of 67%, whereas flavonols and anthocyanins were the least.

Conclusion: This study is the first one to introduce variability and extraction yields of the main phenolic compounds in both fruits and juices of a cider apple progeny. This dataset will be used for an upcoming QTL mapping study, an original approach that has never been undertaken for cider apple.

Keywords: *Malus x domestica*; cider apple; phenolic compound; extractability; phloroglucinolysis.

1. Introduction

Apple is one of the most highly produced fruits in the world, with more than 69.5 million tons produced in 2010 over an area of 4.7 million hectares (FAO, <http://faostat3.fao.org/>). Cider is made using specific varieties of apple that are different from the ones used for dessert apple production. A large number of cider apple varieties are grown throughout the world, with a wide diversity in terms of organoleptic criteria (including astringency, bitterness, aroma, color and acidity), crop management and disease resistance (Bore and Fleckinger 1997). This variability among varieties in different countries is very pronounced, particularly with regard to their polyphenol composition (Sanoner, Guyot et al. 1999; Alonso-Salces, Barranco et al. 2004; Marks, Mullen et al. 2007). For these reasons, they can serve as a relevant genetic resource for breeders.

Six main phenolic groups are present in apple: flavanols, which are subdivided into monomers (i.e., catechins) and oligomers (i.e., procyanidins, also referred to as condensed tannins), hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones, flavonols and anthocyanins. Hydroxycinnamic acids are mainly represented by 5-caffeoylquinic acid (often referred to as chlorogenic acid), 4-caffeoylquinic acid and 4-*p*-coumaroylquinic acid. Flavanol monomers are mainly represented by (+)-catechin and (-)-epicatechin, the latter being the most abundant in apple. Procyanidins are the group with the highest global concentration in apple and the largest number of compounds (Guyot, Le Bourvellec et al. 2002). Each compound is differentiated by the nature of the constitutive flavanol units, the polymerization degree and the position of the interflavanic linkages. Therefore, this polydispersity (or the heterogeneity of the distribution of molecular masses) in apple makes it difficult to individually quantify procyanidin molecules with polymerization degrees above 3-4. However, the use of acidolysis in the presence of nucleophiles (i.e., thiolysis or phloroglucinolysis), coupled with HPLC analysis, makes it possible to characterize and quantify the global procyanidin fraction in crude apple samples (Guyot, Marnet et al. 2003). Dihydrochalcones are mainly represented by phloridzin (phloretin 2'-*O*-glucoside) and phloretin xyloglucoside in apple. Flavonols are essentially represented by quercetin glycosides, mainly avicularin (quercetin-3-*O*-arabinoside), hyperin (quercetin-3-*O*-galactoside), isoquercitrine (quercetin-3-*O*-glucoside), quercitrin (quercetin-3-*O*-rhamnoside), reynoutrin (quercetin-3-*O*-xyloside) and rutin (quercetin-3-*O*-rutinoside). They are mainly present in the skin of the fruit, along with anthocyanins, essentially represented by ideain (cyanidin-3-*O*-galactoside) (Marks, Mullen et al. 2007).

Phenolic compounds are directly linked to the major organoleptic criteria of apples and their products (apple juice, cider, etc.). Procyanidins are directly responsible for the astringent sensation resulting from their complexation with salivary proteins. They are also involved in the bitter taste of cider as the result of specific

interactions with bitterness receptors in the mouth. The intensity of these sensory properties is directly linked to the procyanidin structures and, in particular, their degree of polymerization (Lea and Arnold 1978). Chlorogenic acid is the preferential substrate of the polyphenol oxidase. In the presence of oxygen, it is enzymatically converted into *O*-quinone, which further reacts with catechins, procyanidins and dihydrochalcones, resulting in the formation of oxidation products including yellow-orange molecules responsible for the color of apple juice and cider (Oszmianski and Lee 1990; Song, Yao et al. 2007; Guyot, Bernillon et al. 2008). Moreover, during the fermentation step of cider making, the ester hydrolysis of hydroxycinnamic acids could be the precursor of some aromatic compounds (Herrero, Cuesta et al. 1999).

In addition, it has been reported that phenolic compounds are involved in the health benefits of fruit and vegetable-rich diets (Crozier, Jaganath et al. 2009). Apples are widely consumed throughout the world and are rich in strong antioxidant polyphenols, including quercetin, (+)-catechin, phloridzin and 5-caffeoylquinic acid. Epidemiologic studies have shown that apple consumption is linked to the reduced risk of some cancers, cardiovascular disease, diabetes and asthma (Boyer and Liu 2004; Biedrzycka and Amarowicz 2008).

A wide variability of phenolic compound concentrations is observed among apple varieties, and cider apple are usually more concentrated in polyphenols than dessert apple varieties (Sanoner, Guyot et al. 1999; Tsao, Yang et al. 2003).

A considerable difference between the phenolic content of fruits and juices has already been reported. The work of Guyot et al. (2003) on hydroxycinnamic acids, flavanols and dihydrochalcones has shown that the transferability of phenolic compounds during juice processing can be very different according to the variety. For example, it ranges from 57% for the 'Avrolles' variety, to 77% for the 'Kermerrien' variety (Guyot, Marnet et al. 2003). However, the juice of polyphenol-rich varieties has a higher phenolic compound content. This observation is also true for all phenolic groups. Differences among fruits and juices were mainly explained by the extraction yield of phenolic compounds during juice processing. Monomers and polymers of flavanols had the smallest transferability rate as a result of their high retention in the mash, explained by their affinity for cell wall components (Renard, Baron et al. 2001). The centrifugation of the juice further reduces the concentration of procyanidins and the mean polymerization degree by removing tannins associated with fruit solid parts suspended in the raw juice (Guyot, Marnet et al. 2003). Moreover, the release of polyphenoloxidase (PPO) during grinding in addition to juice oxygenation causes the degradation of some phenolic compounds (Oszmianski and Lee 1990). The addition of sodium fluoride during juice processing makes it possible to inactivate the PPO and to limit the degradation of compounds by oxidation (Ding, Chachin et al. 1998).

Numerous studies have focused on the genetic bases of phenolic compounds (Barriere, Thomas et al. 2008; Rezaeizad, Wittkop et al. 2011; Shao, Jin et al. 2011; Huang, Doligez et al. 2012). Anthocyanins have been particularly well studied in fruits since they are major contributors to fruit quality (Fournier-Level, Le Cunff et al. 2009; Hackett, Russell et al. 2010; Dobson, Graham et al. 2012). A cluster of three MYB genes involved in the anthocyanin content was identified following a QTL study on grape (Fournier-Level, Le Cunff et al. 2009). In apple, two studies have recently been published on QTL detection of phenolic compounds measured in dessert apple progenies (Chagne, Krieger et al. 2012; Khan, Chibon et al. 2012). Chagne et al. (2012) reported the quantification of 16 and 23 phenolic compounds in two different harvesting years using an ultra-high performance liquid chromatograph (UHPLC) coupled to a UV-PDA detector. Khan et al. (2012) reported the quantification of 81 phenolic compounds belonging to the two groups of phenylpropanoids and polyphenols in the skin and the flesh, using a high performance liquid chromatograph (HPLC) coupled to a mass spectrometer associated with MSClust software. To our knowledge, these are the only studies that have been done on the variability of phenolic content existing within an apple progeny.

Since cider apples contain many more phenolic compounds than dessert apples, a progeny derived from a cross between a cider and a dessert apple was studied to perform a genetic study on phenolic content. An initial study was first carried out to develop a liquid chromatography method suitable for the quantification of major phenolic compounds in juices (Verdu et al., submitted).

2. Material and methods

2.1. Phenolic standards and chemicals

LC/MS-grade MeOH was purchased from Carlo Erba reagents (Val de Reuil, France). Formic acid and acetic acid of LC/MS grade were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France). Ultrapure water was obtained from a MilliQ water purification system (Millipore S.A., Molsheim, France). Standards of procyanidins B1 and B2, 4-*p*-coumaroylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid and phloretin xyloglucoside were obtained from Polyphenol Biotech (Bordeaux, France). (+)-catechin, (-)-epicatechin, 5-caffeoylquinic acid, phloridzin and rutin were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Hyperin, isoquercitrine and quercitrin were obtained from Extrasynthese (Genay, France), and avicularin was obtained from LGC Standards SARL (Molsheim, France). (-)-Epicatechin-phloroglucinol adduct was purified in the laboratory. Reynoutrin was identified according to its *m/z* ratio and its retention time (Schieber, Keller et al. 2001).

2.2. Plant material

The material was a cider apple progeny consisting of 385 individuals derived from a cross between the hybrids X5210 and X8402. The former (X5210) is derived from the cider variety, 'Kermerrien', whereas the latter (X8402) is a dessert apple hybrid whose grandparents include the two varieties, 'Florina' and 'Prima'.

The cross between X5210 and X8402 was made in 2000. Plantlets were selected in a greenhouse for scab and powdery mildew resistance. Trees were planted in 2003 at the INRA Horticulture Experimental Unit in Angers, France, with their roots.

This study was carried out both on fruit extracts and apple juices. Fruit extracts were prepared from 92 apples harvested in 2008 and 137 harvested in 2009 (referred to as F08 and F09, respectively, in this paper). Apple juices were prepared from 209 and 123 hybrids from the progeny harvested in 2009 and 2010, respectively (J09 and J10, respectively). The fruits were collected at the mature stage "when 50% of the fruits have fallen off the tree", which is the harvest stage used in commercial cider orchards.

2.3. Sample preparation

2.3.1. Fruit sampling and sample preparation

For each individual, 30 fruits were randomly collected from one tree and divided into three batches of ten fruits. For each batch, fruits were mechanically cut according to a systematic procedure that made it possible to randomly select four small pieces per fruit that were immediately frozen in liquid nitrogen (Renard 2005). Samples were then freeze-dried and reduced to a fine and homogeneous powder with an electrical crusher (Retsch, model YGG, Bioblock Scientific). The powders were then kept under vacuum in a desiccator until analysis.

2.3.2. Apple juice preparation

The apple juice preparation consisted of mixing 330 g of cored apples using a juice extractor (Philips HR1865), adding sodium fluoride (200 mg L⁻¹ of apple juice) to limit oxidation of phenolic compounds, and centrifuging at 15000 g during 15 min (Sigma 4K15) to recover the clear apple juice. Following this preparation, one volume of methanol was added and the mixture was filtered on PTFE filters (0.2 µm, Uptidisc, Interchim, France) before chromatographic analysis.

2.4. Quantification of phenolic compounds

2.4.1. Analysis method for fruit extracts

Methanol extraction of freeze-dried powders. Simple polyphenols, including monomeric catechins, low molecular weight procyanidins, hydroxycinnamic acids, flavonols, dihydrochalcones and anthocyanins, were extracted from the powders using acidified methanol. Precisely weighted aliquots of powders (in the 50-100 mg range) were extracted using 1.2 ml of pure methanol containing 1% v/v acetic acid for 15 min in an ultrasonic bath (Brasson 2200, USA). The mixture was then filtered on PTFE filters (0.45 μm , Uptidisc, Interchim, France).

Acidolysis of procyanidin oligomers and polymers in the presence of phloroglucinol (phloroglucinolysis).

In previously published studies, (Guyot, Marnet et al. 2001; Guyot, Le Bourvellec et al. 2002; Guyot, Marnet et al. 2003) acidolysis of procyanidins was applied on apple powders using an excess of benzylmercaptan as a nucleophilic agent (thiolysis reaction). Phloroglucinol rather than benzylmercaptan was used in this study because of its advantages (odorless and non-toxic) (Matthews, Mila et al. 1997; Kennedy and Jones 2001). Moreover, comparative assays using thiolysis or phloroglucinolysis revealed no significant differences in their efficiency to quantify and characterize the procyanidin fraction in crude apple samples (Marnet, Guyot et al. 2002). Interestingly, the phloroglucinolysis reaction leads to the depolymerization of procyanidin structures making the distinction between terminal and extension units of procyanidins. Then, quantitative HPLC analysis of the phloroglucinolysis media allows the determination of the total procyanidin concentration, the nature and the proportion of the constitutive units of procyanidins in the crude samples. This makes it possible to calculate their average degree of polymerization (DP_n) (Guyot, Marnet et al. 2001).

The phloroglucinolysis method was adapted from Kennedy and Jones (2001). Freeze-dried apple powders (30 mg) were treated with a solution of 0.3 M HCl in MeOH containing 75 g L⁻¹ phloroglucinol and 10 g L⁻¹ ascorbic acid at 50°C for 50 min, and then combined with 1.2 mL of aqueous sodium acetate to stop the reaction. The mixture was then filtered on PTFE filters (0.45 μm , Uptidisc, Interchim, France).

RP-HPLC of methanol extracts and phloroglucinolysis reaction media. HPLC analysis was performed using a Waters 2690 separation module equipped with an autosampler, a cooling system set to 4°C, and a Waters 996 photodiode array detector. The column was a 250mm×4mm ID with a bead diameter of 5 μm , and an end-capped

Purospher RP 18 column (Merck) maintained at 30°C. The mobile phase contained (A) 2.5% acetic acid and (B) acetonitrile, which was previously degassed and then continuously sparged with high-purity helium during analysis. The solvent system was a gradient of aqueous acetic acid, 2.5% v/v (solvent A), and acetonitrile (solvent B). The following gradient was applied at a constant flow rate of 1 ml.min⁻¹: initial, 3% B; 0-5 min, 9% B linear; 5-15 min, 16% B linear; 15-45 min, 50% B linear, followed by washing and reconditioning of the column. The volume of injection was 10 µL.

The acquisition, integration and processing of the signal was controlled using Millennium software 2010, version 2.1. Simultaneous monitoring was performed at 280 nm for flavan-3-ols and dihydrochalcones, 320 nm for hydroxycinnamic acids, 350 nm for flavonols, and 520 nm for anthocyanins. Spectra were recorded between 200 and 600 nm. Phenolic compounds were identified on the basis of their retention times and their characteristic spectra in comparison to available standards. Except for the series of flavonols that were all quantified at 350 nm as hyperoside equivalent, the other phenolic compounds and phloroglucinolysis products were quantified using their own calibration curve: 5-caffeoylquinic acid and 4-p-coumaroylquinic acid were quantified at 320 nm; (-)-epicatechin, (+)-catechin, procyanidins B1 and B2, phloretin xyloglucoside, phloridzin and epicatechin-PLG adduct were quantified at 280 nm ; and ideain, the only molecule from the anthocyanin class considered in this study, was quantified at 520 nm according to its own calibration curve.

2.4.2. Analytic method for apple juices

UHPLC analyses were performed using a Thermo Accela High Speed LC system (Thermo Scientific, Gometz le Châtel, France) equipped with a refrigerated autosampler. Samples were injected into a Zorbax Eclips Plus C18 column (50mmx2.1mm, 1.8 µm; Agilent) using a 10-µL loop in partial loop mode. The column was heated at 30°C and was equipped with an in-line filter (0.2 µm) (Thermo Scientific). The solvent system was a gradient of aqueous formic acid, 0.1% v/v (solvent A), and methanol (solvent B). The following gradient was applied at a constant flow rate of 250 µL.min⁻¹: initial, 0% B; 0-1 min, 10% B linear; 1-3 min, 18% B linear; 3-11 min, 18.5% B linear; 11-13 min, 21.5 % B linear; 13-17 min, 25.5% B linear; 17-21 min, 29% B linear; 21-23 min, 32% B linear; 23-35 min, 50% B linear, followed by washing and reconditioning of the column. The volume of injection was 1µL. The MS experiments were performed with a Thermo TSQ Quantum Access MAX equipped with an electrospray interface (ESI) operating in the negative ionization mode. Each standard was infused into the electrospray ion source at 5 µg mL⁻¹ in MeOH using a syringe pump at a flow rate of 250 µL min⁻¹ to determine the collision energy, the tube lens offset and the SRM transitions chosen to be the most sensitive with

the lowest collision energy for each compound. The Selective Reaction Monitoring (SRM) mode was used to quantify phenolic compounds. The ESI conditions were as follow: spray voltage, 3500 V; vaporizer temperature, 350°C; sheath gas pressure, 48 arbitrary units (au); ion sweep gas, 1 au; auxiliary gas pressure, 13 au; capillary temperature, 200°C; skimmer offset, 0 au. The collision gas used was argon at a pressure of 1.5 mTorr. The data were processed using Xcalibur software (2.1).

Phenolic compounds were identified on the basis of their retention times and their characteristic fragmentation pattern in comparison with available standards. Quantifications were performed in SRM mode, using the calibration curves of standards.

In addition to procyanidins B1 and B2, ten other major procyanidins were individually quantified by UHPLC-UV at 280 nm with a Thermo Accela PDA detector in juices prepared in 2010 to estimate the total content of flavanols.

2.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with R software version 2.13.1 (R Development Core Team 2008) and GraphPadPrism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Two separate analyses of variance (ANOVA) were performed for fruits and juices, to evaluate the genetic effect, the harvest year effect and the interaction genetic x year.

Principal component analyses (PCA) were performed for fruits and juices to estimate the correlation between different traits. Each year was analyzed separately because there were not enough individuals in common between the two harvest years.

Using the method of Guyot et al. (2003), the extraction yields were calculated for each compound, and each individual was analyzed for both fruit and juice phenolic content in 2009 as follows: Yield (%) = $\frac{([C_j] * R)}{[C_f] * d} * 100$ where $[C_j]$ and $[C_f]$ were the concentration of the considered polyphenol in the juice (mg L^{-1}) and in the fruit (mg kg^{-1}), respectively. R was the extraction yield of the juice (kg of juice per kg of fresh fruits) and d was the density of the juice (kg L^{-1}).

3. Results and discussion

3.1. Phenolic compounds in fruits

Four flavanols ((+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidins B1 and B2), six flavonols (avicularin, hyperoside, isoquercitrin, quercitrin, reynoutrin and rutin), two hydroxycinnamic acids (5-caffeoylquinic acid and 4-*p*-coumaroylquinic acid), two dihydrochalcones (phloridzin and phloretin xyloglucoside) and the anthocyanin ideain, were measured by HPLC-UV for two harvest years. The phloroglucinolise reaction was used to estimate the total content of procyanidins and the average degree of polymerization of flavanols.

The total concentration of polyphenols in fruit samples was comprised between 1058 and 6418 mg kg⁻¹ of fresh weight (FW), with an average concentration of 2707 mg kg⁻¹ (Table 1). These results are in agreement with total polyphenol concentrations determined in different cider and dessert apple varieties (Table 2). The lowest concentration obtained in our progeny was close to the ones determined for the 'Golden Delicious' (a dessert apple variety) and 'Judor' varieties (1040 mg kg⁻¹ of FW), and the highest was close to that of the cider variety 'Jeanne Renard' (6990 mg kg⁻¹ of FW) (Sanoner, Guyot et al. 1999). This wider range observed in our progeny could be explained by the parents: X5210, a descendant of the cider apple variety, 'Kermerrien' (4500 mg kg⁻¹ of FW in Sanoner et al. (1999)), and X8402 (1400 mg kg⁻¹ of FW in our experiment), a descendant of the dessert apple variety, 'Florina' (2240 mg kg⁻¹ of FW in Wojdylo et al. (2008)).

Phloroglucinolysis coupled to HPLC analysis revealed that the most concentrated group was the flavanols, which represented 65% of average total polyphenols in the fruit (Table 1). The total content of flavanols ranged from 592 to 4769 mg kg⁻¹ of FW, with an average concentration of 1761 mg kg⁻¹. These results were consistent with other results obtained on cider varieties, with a total flavanol content ranging from 621 to 6195 mg kg⁻¹ of FW (Sanoner, Guyot et al. 1999). The most concentrated compounds within flavanols were (-)-epicatechin and procyanidin B2, with both concentrations close to 210 mg kg⁻¹ FW (Fig. 1). They ranged from 33 to 574 mg kg⁻¹ of FW for (-)-epicatechin, and from 49 to 460 mg kg⁻¹ of FW for procyanidin B2 (without one outlier at 730 mg kg⁻¹). These concentrations were consistent with previous studies (Table 2). The polymerization degree (DPn) of the flavanol class in the progeny was 3.0, ranging from 2.1 to 5.6. This result was consistent with major cider varieties, mainly comprised between 3.7 and 7.5. However, some varieties such as 'Guillevic' and 'Avrolles' could have a DPn that was higher than 40 (Sanoner, Guyot et al. 1999; Alonso-Salces, Barranco et al. 2004).

The second most concentrated group was hydroxycinnamic acids, with 26.4% of average total polyphenols (Table 1). The concentration of hydroxycinnamic acids in the progeny ranged from 86 to 2000 mg kg⁻¹ of FW, with an average concentration of 715 mg kg⁻¹. 5-caffeoylquinic acid was the most concentrated hydroxycinnamic acid and the most concentrated phenolic compound in fruits, with an average concentration close to 610 mg kg⁻¹ FW and ranging from 79 to 1865 mg kg⁻¹ (Figure 1). These results were consistent with previous studies done on cider apples and high compared to dessert apples (Table 2). In some varieties such as ‘Ellis Bitter’ or ‘Harry Masters Jersey’, (-)-epicatechin is the major fruit phenolic compound (Marks, Mullen et al. 2007) .

Dihydrochalcones represent 4.8% of average total polyphenols in the fruit (Table 1). Phloridzin and phloretin xyloglucoside had proximate average concentrations in the progeny, close to 60 mg kg⁻¹ of FW and ranging from 17 to 190 mg kg⁻¹ for phloridzin (without one outlier at 250 mg kg⁻¹), and from 6 to 180 mg kg⁻¹ for phloretin xyloglucoside (Fig. 1). These results were consistent with previous studies on cider apples and higher than those on dessert apples (Table 2).

Flavonols represent 3.5% of total phenolic compounds, ranging from 20 to 274 mg kg⁻¹ of FW, with an average concentration of 94 mg kg⁻¹ (Table 1). These concentrations were low compared to previous studies performed on English cider apples where flavonol concentrations ranged from 149 to 1215 mg kg⁻¹ of FW in peel (Marks, Mullen et al. 2007). However, the range between the most and the least concentrated individuals was higher in our progeny (14-fold) than in English varieties (8-fold). Quercitrin was the most concentrated flavonol, with 49% of total flavonol concentration ranging from 6 to 161 mg kg⁻¹ of FW (Fig. 1). In previous works, hyperin was commonly more concentrated than quercitrin (Marks, Mullen et al. 2007; Wojdylo, Oszmianski et al. 2008). On average, it represented 34% and 33%, whereas quercitrin represented only 13% and 23% of the total flavonols in English cider and dessert apple varieties, respectively. However, in some varieties such as the ancestor, ‘Florina’, quercitrin was the most concentrated flavonol, with a concentration of 45 mg kg⁻¹ of FW, whereas the concentration of hyperin was 29 mg kg⁻¹ (Wojdylo, Oszmianski et al. 2008). Rutin was the least concentrated flavonol (3.8%) and the least concentrated phenolic compound, with concentrations ranging from 1 to 10 mg kg⁻¹ of FW (without one outlier at 39 mg kg⁻¹; Fig. 1).

Anthocyanins quantified in fruits represented 0.2% of total phenolic compounds (Table 1). The maximum concentration of ideain obtained in the progeny was 58 mg kg⁻¹ of FW, which was low compared to previous studies on cider apples but higher than concentrations in dessert apples (Table 2).

ANOVA was carried out with 14 common individuals harvested in 2008 and 2009. The genetic effect, harvest year effect and the interaction genetic x year were significant for all compounds (Supplementary data, Table S1). For most compounds, the genetic factor is the most important. However, for the flavonols avicularin, hyperin, isoquercitrin and reynoutrin, the year effect was more important than the genetic effect. These results were obtained with only 14 individuals and they may not be very representative. Nevertheless, the instability and low repeatability of flavonols was previously reported in *Malus x domestica* germplasm grown in New Zealand (Volz and McGhie 2011). These variations were mainly explained by the sensitivity of flavonols to light and temperature.

PCA analyses were performed separately each year with all phenolic compounds because there were not enough common individuals between the two harvest years (Fig. 2). The first dimension was around 33% and 30%, and the second around 19% and 16% in 2008 and 2009 respectively. Although these dimensions explain only 50% of all variables, these PCA can highlight existing correlations between variables best representing in the plane. For both years, a good correlation was observed within flavanols, on the one hand, and within flavonols on the other. No correlation between these two groups was observed. Previous studies on the ‘Granny Smith’ apple variety had already shown that phenolic compounds were highly correlated within their chemical groups (Perez-Illarbe, Hernandez et al. 1997). Similar observations were also reported in dessert apple progenies studied by Chagne et al. (2012) and Khan et al. (2012), with strong correlations between compounds of the same phenolic group. In contrast to our results, hyperin and reynoutrin were correlated with procyanidins in the skin (Chagne, Krieger et al. 2012). These results tend to show the regulation systems of the biosynthetic pathway of phenolic compounds which act more on an entire group of compound than one particular compound.

3.2. Phenolic compounds in apple juices

In cider industries, apples are rapped and pressed mechanically to get the juice. An enzymatic treatment can also be applied before pressing to hydrolyze the cell walls (Grimi et al., 2011). These devices are not suitable for the small amount of fruit that we had available, so we decided to prepare our juice samples with a centrifuge although we are conscious that this juice preparation procedure strongly differ from the industrial processes and is closer to a homemade apple juice. Twelve major phenolic compounds of apple juices were measured by UHPLC-MS/MS for two harvest years: four flavanols ((+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidins B1 and B2),

four flavonols (avicularin, hyperin, quercitrin and rutin), three hydroxycinnamic acids (5-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid and 4-*p*-coumaroylquinic acid) and the dihydrochalcones, phloridzin. In 2010, the dihydrochalcone, phloretin xyloglucoside, and ten other major procyanidins were also quantified. Since the addition of these 11 compounds makes comparisons with J09 difficult, only the results for J10 are presented below.

The total concentration of polyphenols in the juices was comprised between 740 and 3742 mg L⁻¹ of juice, with an average concentration of 1994 mg L⁻¹ (Table 3). These results are in agreement with total polyphenol concentrations previously determined in juices prepared from cider apple varieties (Table 2). The Basque cider variety, 'Larrabetzu', was particularly concentrated, with a total phenolic content of 13600 mg L⁻¹. The second most concentrated variety in this study was 'Mendexa 10', with a total polyphenol concentration of 4300 mg L⁻¹ (Alonso-Salces, Barranco et al. 2004). However, total concentrations determined in dessert and German cider varieties were lower than ours (Table 2).

The largest group was the flavanols, with 50.7% of average total phenolic content in the juice (Table 3). The total concentration of flavanols ranged from 451 to 2168 mg L⁻¹, with an average concentration of 1011 mg L⁻¹. These results are consistent with a previous study where the total flavanol content of Basque cider apple juice determined with phloroglucinolysis analysis ranged from 347 to 3511 mg L⁻¹, with an average concentration of 968.5 mg L⁻¹ (Alonso-Salces, Barranco et al. 2004). Procyanidin B2 was the most concentrated flavanol with an average concentration of 289 mg L⁻¹, ranging from 120 to 650 mg L⁻¹ (Fig. 3). The second one was (-)-epicatechin, with concentrations ranging from 61 to 433 mg L⁻¹, with an average concentration of 206.9 mg L⁻¹. Procyanidin B2 represented an average of 28.6% and (-)-epicatechin an average of 20.4% of the total flavanol content. Their concentrations were consistent with those determined for Basque cider varieties (Table 2). Depending on the variety, procyanidin B2 or (-)-epicatechin was the major flavanol compound. (-)-epicatechin represented between 6.5% and 29.7% and procyanidin B2 between 7.9% and 20.6% of the total flavanol content (Alonso-Salces, Barranco et al. 2004). The least concentrated compound was (+)-catechin, with concentrations comprised between 13 and 143 mg L⁻¹ of juice (without one outlier at 178 mg L⁻¹) (Fig. 3). These results were consistent with previous studies on Basque cider varieties (Table 2).

The second major phenolic group was hydroxycinnamic acids, with 43.3% of total phenolic compounds (Table 3). The total content ranged from 137 to 1788 mg L⁻¹, with an average concentration of 863 mg L⁻¹. 5-

caffeoylquinic acid is the most concentrated hydroxycinnamic acid and the most concentrated phenolic compound in juices, ranging from 77 to 1413 mg L⁻¹, with an average concentration of 700 mg L⁻¹ (Fig. 3). The range of this compound in our progeny is particularly high (18-fold) compared to previous works on Spanish (4-fold), German (6-fold) and Basque (6-fold) cider apple varieties (Table 2).

Dihydrochalcones represented 3.6% of the total phenolic content in juices (Table 3). Total dihydrochalcones determined in our study ranged from 31 to 244 mg L⁻¹, with an average concentration of 73 mg L⁻¹. These results were consistent with previous studies on German cider varieties (Table 2). Phloretin xyloglucoside is more concentrated than phloridzin in our progeny, as previously reported in most cultivars (Fig. 3) (Mangas, Rodriguez et al. 1999; Alonso-Salces, Barranco et al. 2004; Kahle, Krauss et al. 2005).

Flavonols were the least concentrated compounds in our progeny, with 2.4% of the total content of phenolic compounds present in juices (Table 3). The concentration of this group ranged from 16 to 179 mg L⁻¹, with an average concentration of 47 mg L⁻¹. These results were very high compared to those previously obtained (Table 2). Quercitrin is the most concentrated flavonol, with 55% of total flavonol concentration, ranging from 5 to 98 mg L⁻¹ (without one outlier at 130 mg L⁻¹). Rutin is the least concentrated flavonol (1.4%) and the least concentrated phenolic compound, with concentrations ranging from 0.06 to 3.35 mg L⁻¹ of juice. These high concentrations compared to previous studies could be due to the extraction method used for juice preparation since we used a juice extractor, whereas pressing was used in previous studies (Alonso-Salces, Barranco et al. 2004; Kahle, Krauss et al. 2005).

The same profiles were obtained for common compounds quantified in both J09 and J10. However, average concentrations obtained in J09 for catechins (207 mg L⁻¹), hydroxycinnamic acids (755 mg L⁻¹) and flavonols (31 mg L⁻¹) were lower than those obtained in J10. A wider range was obtained for these groups (catechins: from 22 to 584 mg L⁻¹; hydroxycinnamic acids: from 82 to 2053 mg L⁻¹; flavonols: from 8 to 118 mg L⁻¹), which could be explained by the larger number of individuals studied (209 individuals in J09 and 123 in J10).

ANOVA was performed with 57 common progenies harvested in 2009 and 2010 for the 12 compounds quantified in both years. The genetic effect, harvest year effect and the interaction genetic x year were significant for all compounds except for (+)-catechin and avicularin, which did not have significant effects for harvest year

and the genetic x year interaction, respectively (Supplementary data, TableS2). The genetic effect was always the biggest one, except for hyperin that had a dominant year effect.

PCA analyses were performed separately for both years using all of the phenolic compounds. The first dimension was around 37% and 29%, and the second around 15% and 16% in 2009 and 2010 respectively. The results obtained were close to those obtained in fruits. A good correlation was observed for flavanols, on the one hand, and for flavonols on the other, and no correlation between these two groups was observed. The two acids, 4-caffeoylquinic acid and 4-*p*-coumaroylquinic acid, were also correlated in 2010 (Fig. 4).

3.3. Extractability of polyphenols from the fruit to the juice

Globally, similar profiles were obtained in fruits and juices with flavanols as the major group, followed by hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and flavonols. However, in fruits, flavanols and hydroxycinnamic acids represented 65 and 26.4% of the average total phenolic content, respectively, whereas in juices, they represented 50.7 and 43.3%, respectively. These differences were directly linked to the extraction yield of compounds during fruit processing. The degradation of compounds by oxidation was minimized by the addition of sodium fluoride. The detailed polyphenol profiles of the fruits were thus compared to the corresponding juices (same year of harvest) according to the method used by Guyot et al. (2003). The mean extraction yield was then calculated and is illustrated in Fig. 5. Hydroxycinnamic acid was the least affected group following the juice preparation, with an average extraction yield of 67%. Flavanol monomers were the second group that had the best extraction yield, around 48%. Since the total procyanidin content was not evaluated in juices in 2009, it was not possible to determine the extraction yield of this group. However, the average concentration of procyanidins determined in juices prepared in 2010 compared to the total procyanidin content obtained in fruits showed an average extraction yield of around 30%. These results are consistent with those obtained by Guyot et al. (2003). The high association between procyanidins and the solid parts of the fruit, particularly cell wall materials, explains this low extraction yield (Renard, Baron et al. 2001). However, individually, procyanidin B2 had a significantly higher extraction yield compared to monomers (CAT and ECAT on Fig. 5). This result could be in part explained by the better solubility in water of procyanidin B2 compared to (-)-epicatechin, which had an octanol-water partition coefficient of 0.172 and 1.299, respectively (Zanchi, Konarev et al. 2009). Moreover, the tanning effect of procyanidins is directly related to the degree of polymerization (De Freitas and Mateus 2002).

Since procyanidin B2 is a dimer, its association with the proteins of the matrix was less than other more polymerized tannins. The extraction yield was particularly low for flavonols, around 18% (Fig. 5). In fruits, more flavonol compounds could be quantified compared to the juices. Isoquercitrin was not detected and reynoutrin was not sufficiently concentrated to be quantified in juices with our method. This low extraction yield could be explained by the localization of these compounds in the fruit skin. Nevertheless, in our progeny, the extraction yield determined for flavonols was better than that previously reported in cider apple varieties, ranging around 10% (Price, Prosser et al. 1999). The difference could be due to the juice extraction method used since they used a commercial scale pressing method, whereas our fruits were cored and crushed with a juice extractor. In 2009, since the dihydrochalcones, phloretin xyloglucoside, was not quantified, the average extraction yield was only estimated for phloridzin, around 17% (Fig. 5). If we consider the average concentration of total dihydrochalcones determined in J10 compared to that determined in fruits, the extraction yield was better, nearly 33%. Nevertheless, these results are very low compared to previous results that showed an extraction yield of 80% (Guyot, Marnet et al. 2003). However, to determine the fruit content, Guyot et al. (2003) had only considered the flesh of apples, whereas the skin and the seeds, very concentrated in dihydrochalcones, were included in our study (Guyot, Marnet et al. 1998; Alonso-Salces, Barranco et al. 2004; Khanizadeh, Tsao et al. 2008). The extraction yield previously measured by Guyot et al. (2003) had therefore probably been overestimated. Finally, ideain was exclusively found in fruits, which is the confirmation of its localization in the fruit skin.

3.4. Variability of polyphenol contents between two apple progenies

The variability observed in the progeny was representative of that observed for different cider apple varieties. In our progeny, 4-*p*-coumaroylquinic acid had the largest range in fruits (125-fold), and hyperin had the lowest (13-fold). The variability of DPn was estimated in a progeny for the first time. It was almost 3-fold depending on the individuals. In juices, rutin had the largest range since it was 56 times more concentrated in the most concentrated individual compared to the least concentrated. Procyanidin B2 had the lowest one, less than 6-fold. The variability observed in juices was less than that observed in fruits. This could be explained by the loss of some phenolic compounds during the juice preparation. However, rutin was the only compound for which the variability was greater in the juices than in the fruits.

The comparison with the New Zealand study on dessert apple progeny showed that the variability observed in our progeny was similar for 4-*p*-coumaroylquinic acid and reynoutrin, but was higher for isoquercitrin and

quercitrin in our progeny. However, the variability observed in our progeny was low for flavanols, DHC and anthocyanins. Indeed, the difference between the most and the least concentrated individual in the dessert progeny was 172-fold for (+)-catechin and 203-fold for ideain in the skin, and 61-fold for phloridzin or phloretin xyloglucoside in the flesh (Chagne, Krieger et al. 2012). In our cider progeny, they were 35-, 18-, 30- and 15-fold, respectively (Table 1). These comparisons were based on minimum and maximum values found in progenies. These results have to be examined with great care since extreme values were not critically representative of the entire progeny. In addition, the Chagne et al. (2012) study was performed for skin and flesh separately, which could have accentuated the variability observed compared to the whole fruit.

Conclusion

The genetic basis of the progeny under study resulting from a cross between a dessert apple and a hybrid of a cider apple, allowed us to obtain mean values and ranges for each compound that were very similar to previous studies on phenotypic variability in cider apples for both fruit extracts and juices. As expected, fruits were more concentrated than juices for all the compounds detected. The differences observed between fruits and juices for each polyphenol compound can easily be explained by their various extractability properties: hydroxycinnamic acids were the most extractable group, followed by flavanol monomers, procyanidins, dihydrochalcones, flavonols and anthocyanins. However, phenolic profiles were similar between fruits and juices with 5-caffeoylquinic acid and rutin as the most and least concentrated compounds, respectively. ANOVA results have shown a high genetic effect for all compounds, which suggests a considerable part of genetic variability in the expression of these traits. However, for flavanols, a greater effect of the harvest year was observed in both fruits and juices, consistent with their high sensitivity to light and temperature. The high genetic effect will allow us to use this dataset for future QTL mapping analysis.

Acknowledgements

The authors would like to thank M. Boucourt and E. Lepautremat for their technical assistance in sample harvesting and preparation, R. Mabon, A. Leroux and C. Baron for their technical contribution to sample preparation and polyphenol analysis, J.M. Le Quéré for his help collecting and organizing the data, and the team of the Horticulture Experimental Unit of INRA, Angers-Nantes, that took care of the trees. This study was

financially supported by funding for a PhD grant from the SFR 149 QUASAV, Angers, France, and the INNOVACIDRE project funded by the Region Bretagne, Pays de la Loire and Basse Normandie.

References

- Alonso-Salces, R. M., A. Barranco, et al. (2004). "Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Cultivars and Their Technological Properties." J Agric Food Chem **52**: 2938-2952.
- Barriere, Y., J. Thomas, et al. (2008). "QTL mapping for lignin content, lignin monomeric composition, p-hydroxycinnamate content, and cell wall digestibility in the maize recombinant inbred line progeny F838 x F286." Plant Sci **175**(4): 585-595.
- Biedrzycka, E. and R. Amarowicz (2008). "Diet and Health: Apple Polyphenols as Antioxydants." Food Rev Int **24**: 235-251.
- Bore, J.-M. and J. Fleckinger (1997). Pommiers à cidre variétés de France. Paris.
- Boyer, J. and R. H. Liu (2004). "Apple phytochemicals and their health benefits." Nutr J **3**(1): 5.
- Chagne, D., C. Krieger, et al. (2012). "QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit." BMC Plant Biol **12**: 12.
- Crozier, A., I. B. Jaganath, et al. (2009). "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." R Soc Chem **26**: 1001-1043.
- De Freitas, V. and N. Mateus (2002). "Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates." J Sci Food Agric **82**(1): 113-119.
- Ding, C.-K., K. Chachin, et al. (1998). "Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Loquat Fruit." J Agric Food Chem **46**: 4144-4149.
- Dobson, P., J. Graham, et al. (2012). "Over-seasons Analysis of Quantitative Trait Loci Affecting Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Raspberry." J Agric Food Chem **60**: 5360-5366.
- Fournier-Level, A., L. Le Cunff, et al. (2009). "Quantitative Genetic Bases of Anthocyanin Variation in Grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) Berry: A Quantitative Trait Locus to Quantitative Trait Nucleotide Integrated Study." Genet **183**: 1127-1139.

- Guyot, S., S. Bernillon, et al. (2008). Multiplicity of phenolic oxydation products in apple juices and ciders, from synthetic medium to commercial products. Recent advances in polyphenol research. **1**: 278-292.
- Guyot, S., C. Le Bourvellec, et al. (2002). "Procyanidins are the most Abundant Polyphenols in Dessert Apples at Maturity." LWT **35**: 289-291.
- Guyot, S., N. Marnet, et al. (1998). "Reversed-Phase HPLC following Thiolytic for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien)." J Agric Food Chem **46**: 1698-1705.
- Guyot, S., N. Marnet, et al. (2001). "Direct thiolysis on crude apple materials for high-performance liquid chromatography characterization and quantification of polyphenols in cider apple tissues and juices." Methodes Enzym **335**: 57-70.
- Guyot, S., N. Marnet, et al. (2003). "Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices." J Agric Food Chem **51**(21): 6240-6247.
- Hackett, C. A., J. Russell, et al. (2010). "Multi-environment QTL mapping in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) using mixed models." Theor Appl Genet **121**: 1483-1488.
- Herrero, M., I. Cuesta, et al. (1999). "Changes in Organic Acids During Malolactic Fermentation at Different Temperatures in Yeast-Fermented Apple Juice." J Inst Brew **105**(3): 191-195.
- Huang, Y. F., A. Doligez, et al. (2012). "Dissecting genetic architecture of grape proanthocyanidin composition through quantitative trait locus mapping." BMC Plant Biol **12**: 30.
- Kahle, K., M. Krauss, et al. (2005). "Polyphenol profiles of apple juices." Mol Nutr Food Res **49**: 797-806.
- Kennedy, J. A. and G. P. Jones (2001). "Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol." J Agric Food Chem **49**(4): 1740-1746.
- Khan, S. A., P.-Y. Chibon, et al. (2012). "Genetic analysis of metabolites in apple fruits indicates an mQTL hotspot for phenolic compounds on linkage group 16." J Exp Bot **63**(8): 2895-2908.
- Khanizadeh, S., R. Tsao, et al. (2008). "Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing." J Food Comp Anal **21**: 396-401.
- Lea, A. G. H. and G. M. Arnold (1978). "The phenolics of ciders: Bitterness and astringency." J Sci Food Agric **29**(5): 478-483.

-
- Mangas, J. J., R. Rodriguez, et al. (1999). "Study of the Phenolic Profile of Cider Apple Cultivars at Maturity by Multivariate Techniques." J Agric Food Chem **47**: 4046-4052.
- Marks, S. C., W. Mullen, et al. (2007). "Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples." J Sci Food Agric **87**: 719-728.
- Marnet, N., S. Guyot, et al. (2002). Phloroglucinolysis applied to the characterisation and the quantification of procyanidins in apples and their derived products. Polyphenols Communications 2002. XXI International Conference on Polyphenols, Marrakech - Maroc.
- Matthews, S., I. Mila, et al. (1997). "Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles." J Agric Food Chem **45**: 1195-1201.
- Oszmianski, J. and C. Y. Lee (1990). "Enzymic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system." J Agric Food Chem **38**(5): 1202-1204.
- Perez-Illzarbe, J., T. Hernandez, et al. (1997). "Cold storage of apples (cv. Granny Smith) and changes in phenolic compounds." Z Lebensm Unters Forsch A **204**: 52-55.
- Price, K. R., T. Prosser, et al. (1999). "A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing." Food Chem **66**: 489-494.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Renard, C. M. G. C. (2005). "Variability in cell wall preparations : quantification and comparison of common methods." Carbohydr Polym **60**: 515-522.
- Renard, C. M. G. C., A. Baron, et al. (2001). "Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences." Biol Macromol **29**: 115-125.
- Rezaeizad, A., B. Wittkop, et al. (2011). "Identification of QTLs for phenolic compounds in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by association mapping using SSR markers." Euphytica **177**: 335-342.
- Sanoner, P., S. Guyot, et al. (1999). "Polyphenol Profiles of French Cider Apple Varieties (*Malus domestica* sp.)." J Agric Food Chem **47**(12): 4847-4853.
- Schieber, A., P. Keller, et al. (2001). "Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography." J Chrom A **910**: 265-273.
-

- Shao, Y., L. Jin, et al. (2011). "Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice." Theor Appl Genet **122**: 1005-1016.
- Song, Y., Y.-X. Yao, et al. (2007). "Polyphenolic Compound and the Degree of Browning in Processing Apple Varieties." Agric Sci China **6**(5): 607-612.
- Tsao, R., R. Yang, et al. (2003). "Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)." J Agric Food Chem **51**(21): 6347-6353.
- Volz, R. K. and T. K. McGhie (2011). "Genetic variability in apple fruit polyphenol composition in *Malus x domestica* and *Malus sieversii* germplasm grown in New Zealand." J Agric Food Chem **59**: 11509-11521.
- Wojdylo, A., J. Oszmianski, et al. (2008). "Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties." J Agric Food Chem **56**(15): 6520-6530.
- Zanchi, D., P. V. Konarev, et al. (2009). "Rigidity, conformation, and solvation of native and oxidized tannin macromolecules in water-ethanol solution." J Chem Phys **130**(24): 245103.

Figures

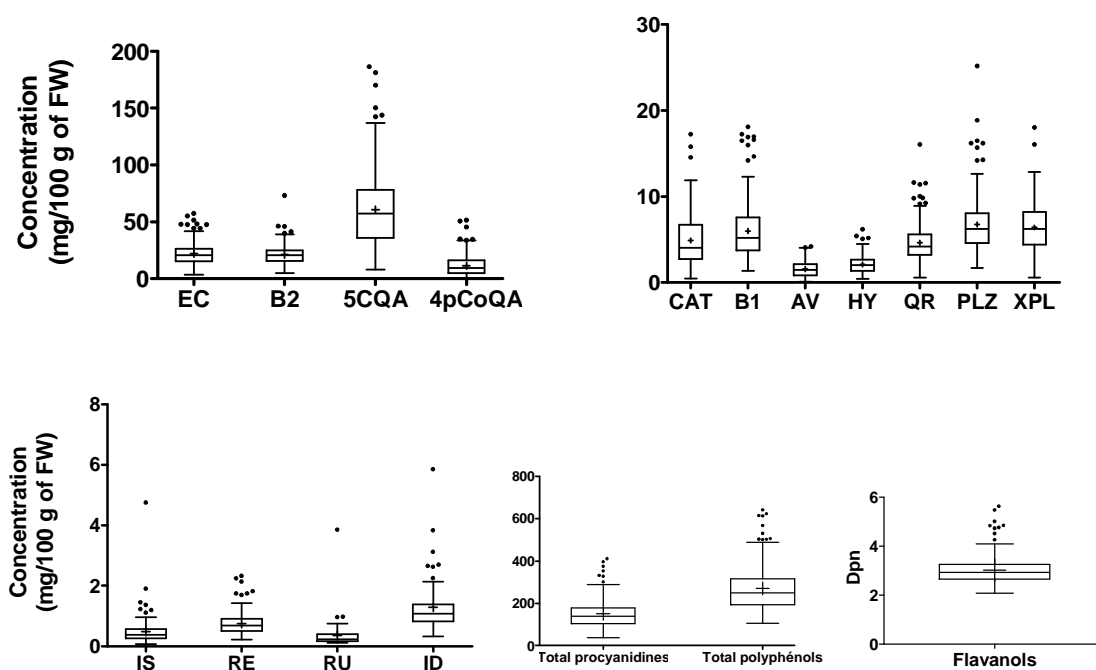


Figure 1. Turkey boxplot for the mean polyphenol concentration (mg/100g of fresh weight) in the whole fruit (2008 and 2009 harvest years). EC: (-)-epicatechin; CAT: (+)-catechin; B1: procyanidin B1; B2: procyanidin B2; 5CQA: 5-caffeoylquinic acid; 4pCoQA: 4-*p*-coumaroylquinic acid; AV: avicularin; HY: hyperin; IS: isoquercitrin; QR: quercitrin; RE: reynoutrin; RU: rutin; PLZ: phloridzin; XPL: phloretin xyloglucoside; ID: ideain; DPn: mean polymerization degree. Outliers and means are represented with circles and crosses, respectively.

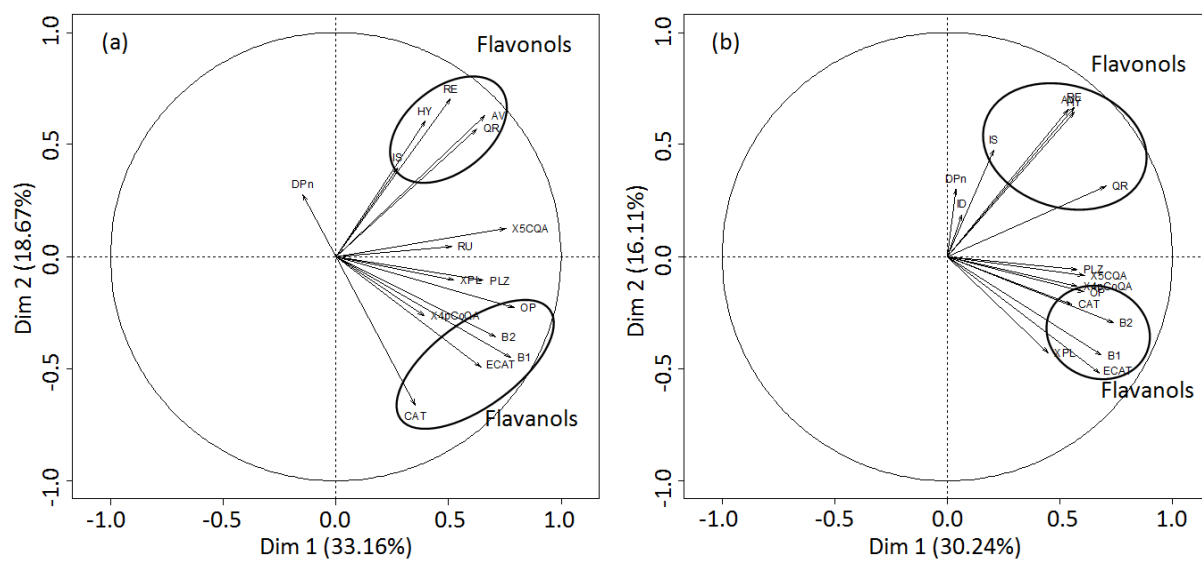


Figure 2. PCA of phenolic compounds quantified in fruits harvested in 2008 (a) and 2009 (b). Abbreviations: see Fig. 1; DPn: polymerization degree of flavanols; OP: total procyanidins without procyanidins B1 and B2; X4pCoQA: 4-*p*-coumaroylquinic acid; X5CQA: 5-caffeoylquinic acid.

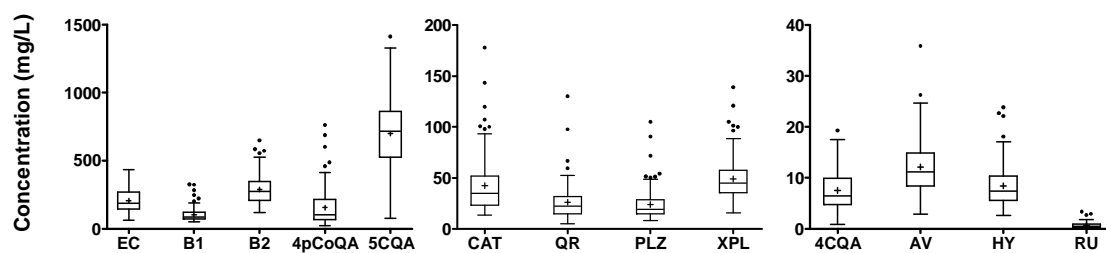


Figure 3. Turkey boxplot for the mean polyphenol concentration (mg/L) in juices prepared in 2010. Abbreviations: see Fig. 1; 4pCoQA: 4-*p*-coumaroylquinic acid. Outliers and means are represented with circles and crosses, respectively.

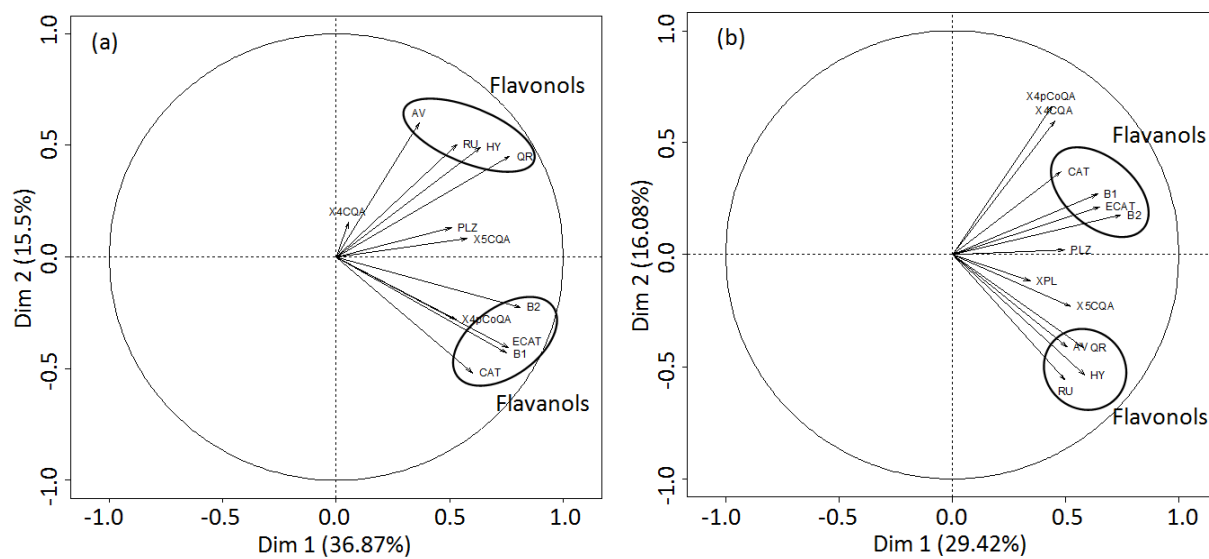


Figure 4. PCA of phenolic compounds quantified in juices prepared in 2009 (a) and 2010 (b). Abbreviations: see Fig. 1; X4CQA: 4-caffeoylquinic acid; X4pCoQA: 4-*p*-coumaroylquinic acid; X5CQA: 5-caffeoylquinic acid.

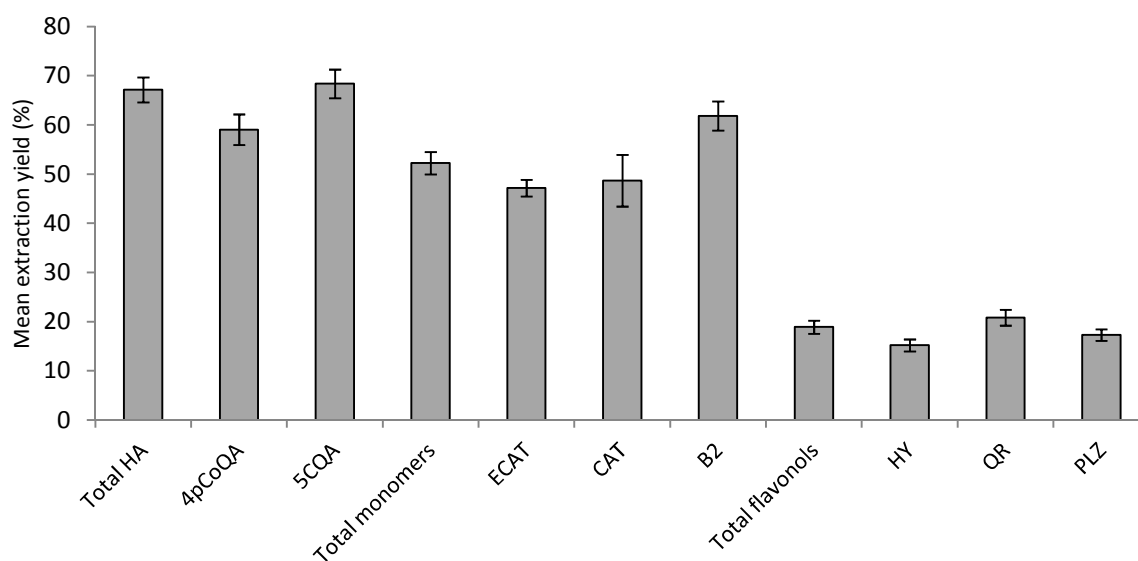


Figure 5. Mean extractability level (in %) of individual phenolic compounds as well as total hydroxycinnamic acids (HA), flavanol monomers, and flavonols determined within the 124 common individuals analyzed both for fruits and juices in 2009. Abbreviations: see Fig. 1.

Tables

Table 1. Mean concentration (mg kg⁻¹ of fresh weight) of phenolic compounds present in the whole fruit (2008 and 2009 harvest year)^a

	Total catechins	Total PCA	Total flavanols	DPn	Total HA	Total DHC	Total flavonols	Ideain *	Total polyphenols
Average	253	1508	1761	30	715	131	94	13	2707
Median	237	1394	1644	29	654	127	88	11	2488
Minimum	33	376	592	21	86	35	20	3	1058
Maximum	656	4112	4769	56	2000	332	274	58	6418

^a: PCA: procyanidins; DPn: average degree of polymerization of flavanols; HA: hydroxycinnamic acids; DHC: dihydrochalcones.

*: The average, median, minimum and maximum concentrations of ideain were determined for the 82 individuals for which ideain were detected. 134 individuals had no anthocyanins.

Table 2. Range of total polyphenol content, total procyanidins determined with acidolysis reaction, polymerization degree of flavanols and some other phenolic compounds in fruit (expressed in mg kg⁻¹ of fresh weight) and juice (expressed in mg L⁻¹) of different apple varieties^a

Number and type of apple varieties			Total polyphenols	Total PCA	ECAT	CAT	B2	DP flavanols	5CQA	References
19 English apples	cider	peel (mg kg ⁻¹ of FW)	546-6306		116-2095	10-265	107-1362		30-1163	(Marks, Mullen et al. 2007)
		flesh (mg kg ⁻¹ of FW)	485-4920		ND-2225	6-408	ND-1368		69-1766	
2 juices, 12 French and 1 English apples		cider (mg kg ⁻¹ of FW)	1040-6990	515-4731	tr-1410	tr-154		42-503	154-1195	(Sanoner, Guyot et al. 1999)
67 dessert apples		(mg kg ⁻¹ of FW)	1046-5448	469-4679	13-551	2-145	137-400	6-57	3-592	(Wojdylo, Oszmianski et al. 2008) ^b
31 Basque apples	cider	(mg L ⁻¹)	660-13600	347-3511	39-822	3.3-40.7	47-550	2.7-4.6	172-1099	(Alonso-Salces, Barranco et al. 2004)
7 German apples	cider	(mg L ⁻¹)	261.2-970		29.8-189.1	3-60	29.2-138.4		80.6-487.6	(Kahle, Krauss et al. 2005)
46 Spanish apples	cider	1994 season (mg L ⁻¹)	570-2060		4.1-234.6		ND-222.9		25.1-377.1	(Mangas, Rodriguez et al. 1999)
		1995 season (mg L ⁻¹)	750-2420		ND-206.5		ND-246.9		21.2-350.5	
4 dessert apples		(mg L ⁻¹)	154.4-178		15.1-51.4	2.5-7	29.6-42.5		32.7-54.1	(Kahle, Krauss et al. 2005)

Number and type of apple varieties			DHC	PLZ	XPL	Total flavonols	HY	QR	RU	ID	References
19 English apples	cider	peel (mg kg ⁻¹ of FW)		25-1061	ND-201		40-520	18-236	2-6	ND-494	(Marks, Mullen et al. 2007)
		flesh (mg kg ⁻¹ of FW)		16-159	ND-73		ND-1.2	ND-12		ND-12	
2 juices, 12 French and 1 English apples		cider (mg kg ⁻¹ of FW)		16-102	10-98						(Sanoner, Guyot et al. 1999)
67 dessert apples		(mg kg ⁻¹ of FW)		1-61	3-41		2-107	4-138	ND-19	ND-20	(Wojdylo, Oszmianski et al. 2008) ^b
31 Basque apples	cider	(mg L ⁻¹)		11-92	15-137		0.34-4	0.48-6.5			(Alonso-Salces, Barranco et al. 2004)

7	German	cider	(mg L ⁻¹)	33.5-171	13.2-93.6	20.3-135.9	tr-26.7	tr-8.1	tr-4.6	ND-0.8	(Kahle, Krauss et al. 2005)
46	Spanish	cider	1994 season (mg L ⁻¹)		3.7-36.6	4-159.1					(Mangas, Rodríguez et al. 1999)
			1995 season (mg L ⁻¹)		2.5-32.4	3.3-107.2					(Kahle, Krauss et al. 2005)
4	dessert	apples	(mg L ⁻¹)	9.8-35.2	4.1-9.3	2.7-25.9	tr-3.6	tr-2.2	tr-1.9		

^a: PCA: procyanidins; ECAT: (-)-epicatechin; CAT: (+)-catechin; B2: procyanidin B2; DP: polymerization degree; 5CQA: 5-caffeoylquinic acid; DHC: dihydrochalcones; PLZ: phloridzin; XPL: phloretin xyloglucoside; HY: hyperin; QR: quercitrin; RU: rutin; ID: ideain; ND: not detected; tr: trace.

^b: Values presented by Wojdylo et al. (2008) were modified to be expressed in g of FW. We chose an arbitrary correction factor of 5.

Table 3. Concentration (mg L⁻¹) of phenolic compounds present in the juice (2010 harvest year)^a

	Total catechins	Total PCA	Total flavanols	Total HCA	Total flavonols	Total DHC	Total polyphenols
Average	249	762	1011	863	47	73	1994
Median	231	716	988	883	43	65	1911
Minimum	61	339	451	137	16	31	740
Maximum	611	1604	2168	1788	177	244	3742

^a: Abbreviations: see Table 1

Supplementary data

Table S1. Analyses of variance for phenolic compounds quantified in 14 fruits harvested in 2008 and 2009.

		Df	F value	Pr(>F) ^b
(-)-epicatechin	Genetic	13	56.8667	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	264.1410	< 2.2e-16 ***
	Genetic x Year	13	5.7625	1.459e-06 ***
	Residuals	56		
(+) -catechin	Genetic	13	137.63	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	131.39	6.735e-14 ***
	Genetic x Year	6	123.76	< 2.2e-16 ***
	Residuals	38		
5-caffeoylquinic acid	Genetic	13	351.949	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	674.942	< 2.2e-16 ***
	Genetic x Year	13	41.623	< 2.2e-16 ***
	Residuals	56		
4- <i>p</i> -coumaroylquinic acid	Genetic	13	187.976	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	25.003	5.983e-06 ***
	Genetic x Year	13	33.938	< 2.2e-16 ***
	Residuals	56		
avicularin	Genetic	13	9.7257	3.625e-10 ***
	Harvest year	1	293.9314	< 2.2e-16 ***
	Genetic x Year	13	9.5106	5.388e-10 ***
	Residuals	56		
hyperin	Genetic	13	2.5057	0.008906 **
	Harvest year	1	19.2121	5.198e-05 ***
	Genetic x Year	13	7.0121	8.303e-08 ***
	Residuals	56		
isoquercitrin	Genetic	13	11.247	1.053e-09 ***
	Harvest year	1	67.544	3.327e-10 ***
	Genetic x Year	8	10.609	6.417e-08 ***
	Residuals	41		
phloridzin	Genetic	13	29.0180	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	115.4964	3.15e-15 ***
	Genetic x Year	13	5.1033	7.37e-06 ***
	Residuals	56		
procyanidin B1	Genetic	13	130.901	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	280.104	< 2.2e-16 ***
	Genetic x Year	12	14.135	2.018e-12 ***
	Residuals	52		
procyanidin B2	Genetic	13	44.9601	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	33.2019	3.885e-07 ***
	Genetic x Year	13	7.7954	1.800e-08 ***
	Residuals	55		
quercitrin	Genetic	13	19.6917	2.621e-16 ***

	Harvest year	1	87.6548	4.708e-13 ***
	Genetic x Year	13	9.8981	2.648e-10 ***
	Residuals	56		
reynoutrin	Genetic	13	10.7439	1.761e-10 ***
	Harvest year	1	189.0417	< 2.2e-16 ***
	Genetic x Year	12	6.0709	1.877e-06 ***
	Residuals	51		
phloretin xyloglucoside	Genetic	13	83.6100	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	11.0416	0.001574 **
	Genetic x Year	13	7.9364	1.166e-08 ***
	Residuals	56		
other procyanidins	Genetic	13	88.786	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	636.008	< 2.2e-16 ***
	Genetic x Year	13	11.394	1.985e-11 ***
	Residuals	56		
DP flavanols ^a	Genetic	13	112.3149	<2.2e-16 ***
	Harvest year	1	11.3882	0.001348 **
	Genetic x Year	13	5.5348	2.53e-06 ***
	Residuals	56		

^a: DP: polymerization degree.

^b: *, P = 0.1; **, P = 0.05; ***, P = 0.01.

		Df	F value	Pr (>F) ^a
(-)-epicatechin	Genetic	56	7,9445	<2,2e-16***
	Harvest year	1	36,5646	6.541e-09 ***
	Genetic x Year	56	3,6779	4.344e-12 ***
	Residuals	213		
(+) -catechin	Genetic	55	20.4264	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	1,1839	0,2778
	Genetic x Year	55	4.3150	1.039e-14 ***
	Residuals	208		
5-caffeoylquinic acid	Genetic	56	20.0224	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	8.3113	0.004344 **
	Genetic x Year	56	3.0395	4.026e-09 ***
	Residuals	213		
4-caffeoylquinic acid	Genetic	56	4.4218	1.896e-15 ***
	Harvest year	1	4.3310	0.03862 *
	Genetic x Year	56	2.2040	2.901e-05 ***
	Residuals	213		
4-coumaroylquinic acid	Genetic	56	30.644	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	39.829	1.584e-09 ***
	Genetic x Year	56	6.077	< 2.2e-16 ***
	Residuals	213		
avicularin	Genetic	56	1.6838	0.004544 **
	Harvest year	1	7.8355	0.005594 **
	Genetic x Year	56	1.3703	0.058676 .
	Residuals	213		
hyperin	Genetic	56	3.8682	5.835e-13 ***
	Harvest year	1	86.6051	< 2.2e-16 ***
	Genetic x Year	56	1.6145	0.00835 **
	Residuals	213		
rutin	Genetic	56	5.8554	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	4.7958	0.02961 *
	Genetic x Year	56	2.5930	4.868e-07 ***
	Residuals	213		
phloridzin	Genetic	56	8.2686	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	42.8310	4.377e-10 ***
	Genetic x Year	56	1.7611	0.002252 **
	Residuals	213		
procyanidin B1	Genetic	56	28.6164	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	7.8119	0.005664 **
	Genetic x Year	56	3.9667	2.077e-13 ***
	Residuals	213		
quercitrin	Genetic	56	7.1330	< 2.2e-16 ***
	Harvest year	1	133.1353	< 2.2e-16 ***
	Genetic x Year	56	2.0002	0.0002274 ***
	Residuals	213		

Table S2.

Analyses of variance for phenolic compounds quantified in 57 juices prepared in 2009 and 2010.

^a: *, P = 0.1; **, P = 0.05; ***, P = 0.01.

Chapitre III :

Détection de QTL pour la teneur en composés phénoliques des jus et des fruits et mise en évidence *in silico* de gènes candidats.

Contexte

La sélection assistée par marqueurs permet d'évaluer très précocement les potentialités d'un individu sur la base des marqueurs moléculaires. Pour cela, des études préliminaires sont nécessaires pour associer le plus finement possible les marqueurs avec les caractères agronomiques d'intérêt. La détection de QTL (Quantitative Trait Loci) est la première étape qui permet de mettre en évidence les régions génomiques associées aux caractères complexes. Des analyses supplémentaires sont généralement nécessaires pour affiner la position des QTL et vérifier leur stabilité dans différents fonds génétique et environnements.

Jusqu'à présent, aucune étude QTL n'a encore été publiée à notre connaissance pour la teneur en composés phénoliques des pommes à cidre. Cette analyse a donc été réalisée avec les polyphénols quantifiés dans les fruits et les jus préparés deux années successives. Les cartes génétiques parentales et la carte intégrée ont été réalisées à l'aide de marqueurs SSR et SNP. La détection de QTL a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel MapQTL et seuls les résultats obtenus pour la carte intégrée seront présentés dans ce chapitre. Une cinquantaine de QTL a été obtenue pour les flavanols, les acides hydroxycinnamiques, les flavonols et les dihydrochalcones dosés dans les fruits et les jus. Une méta-analyse de QTL a ensuite été réalisée sur les régions chromosomiques portant plusieurs QTL d'un même composé ou d'un même groupe de composés, afin de réduire significativement les intervalles de confiance. Il a ensuite été possible d'extraire les séquences géniques présentes sous les méta-QTL pour réaliser la recherche de gènes candidats grâce au logiciel BLAST2GO. Plusieurs gènes identifiés codant pour des enzymes de biosynthèse ou des facteurs de transcription ont ainsi été mis en évidence pour six régions d'intérêt.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication encore en cours de rédaction. Des expérimentations complémentaires ont été entreprises pour cartographier les principaux gènes candidats et vérifier leurs positions par rapport aux QTL détectés. Ces travaux sont toujours en cours au laboratoire et ne seront pas présentés dans ce chapitre. Brièvement, des amorces spécifiques ont été dessinées *in silico* à partir des séquences des contigs disponibles dans le GDR portant les gènes candidats. Le polymorphisme mis en évidence par ces amorces a été vérifié en testant les parents de la descendance et une dizaine de descendants. L'ensemble de la population a ensuite été génotypée pour les couples d'amorces sélectionnés. Les analyses sur séquenceur et le travail de cartographie devraient se terminer cet été. Ces résultats seront rajoutés à l'article avant sa soumission prévue dans

« Journal of Experimental Botany ». Un poster reprenant une partie de ces résultats a été présenté lors du Sixth Rosaceous Genomics Conference (Annexe V).

Les cartes génétiques parentales et intégrée sont présentées en Annexe VI.

QTL MAPPING AND CANDIDATE GENE IDENTIFICATION FOR THE PHENOLIC CONTENT OF FRUITS AND JUICES PREPARED FROM A CIDER APPLE PROGENY

Cindy F. Verdu^{a,b,c,d,*}, Sylvain Guyot^e, Nicolas Childebrand^{b,c,d}, Muriel Bahut^{b,c,d}, Jean-Marc Celton^{b,c,d}, Sylvain Gaillard^{b,c,d}, Laurence Hibrand-Saint Oyant^{b,c,d}, Pauline Lasserre-Zuber^f, Michela Troggio^g, David Guilet^a, François Laurens^{b,c,d}

aUniversité d'Angers, EA 921Laboratoire de Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux, SFR 4207 Quasav, PRES L'UNAM, F49045 Angers, France.

bUniversité d'Angers, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F49045 Angers, France.

cAgroCampus-Ouest, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F49045 Angers, France.

dINRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture and Semences, F49071 Beaucozé, France.

eINRA, UR117 Cidricoles et Biotransformation des Fruits et Légumes, F35650, Le Rheu, France.

fINRA-UBP, UMR1095 Genetics, Diversity and Ecophysiology of Cereals, 63039 Clermont-Ferrand, France.

gIASMA Research and Innovation Centre, S. Michele all'Adige, TN, Italy.

*Corresponding author: cindyverdu@gmail.com; Tel.: +33 (0)2 41 22 57 83; Fax: +33 (0)2 41 22 66 34.

Abstract

Polyphenols have favorable antioxidant potential on human health suggesting that their high content is responsible for the beneficial effects of apple consumption. They are also related to the quality of ciders as they predominantly account for astringency, bitterness, color and aroma. This study presents for the first time the QTL mapping of phenolic compound concentrations and the polymerization degree of flavanols for a cider apple progeny.

Fruits were harvested and analyzed during three years on both fruit extracts and juices. Thirty two compounds belonging to five groups of phenolic compounds were identified and quantified by liquid chromatography. The total content of procyanidins and their polymerization degree were also estimated in fruits by phloroglucinolysis. Identification of candidate genes was then performed *in silico* targeting 18 enzymes of the polyphenol pathway and six transcription factors involved in the apple anthocyanin regulation.

Fourty height QTLs were detected at the genome wide threshold on nine linkage groups of the integrated map. QTLs for polymerization degree were also detected for the first time on parental maps. Some of these QTLs seemed specific to our progeny, especially QTL detected for flavanols and dihydrochalcones. Several enzymes and transcription factors were identified under major QTL, supporting a complex regulation of the pathway. The potential use of these QTL in breeding programs was then discussed.

Keywords: *Malus x domestica*; phenolic compounds; Quantitative Trait Loci; candidate genes mapping.

1. Introduction

Varieties of apple grown in Europe for fresh consumption or cider production were derived from the wild central Asian species *Malus sieversii*. Other wild species present along the silk route and in Europe (*M. orientalis* and *M. sylvestris*) have also contributed to the current domesticated apple (Cornille, Gladieux et al. 2012). Common origins of cider and dessert apples partially explain the low genomic differentiation of these two groups (Lassois et al., in preparation). However, cider apples are clearly defined as a subset from the domesticated apples, with different qualities determined by their use. They are generally more bitter and astringent, more rustic and more resistant to the major pathogens of apple.

Phenolic compounds are responsible for bitterness, astringency, color and aroma of cider. The polymeric degree of procyanidins influence either the bitterness or the astringency (Lea and Arnold 1978). The color is linked to the enzymatic oxidation of phenolic compounds, mainly chlorogenic acid, procyanidins, (+)-catechin and phloridzin, by the polyphenoloxidase (Oszmianski and Lee 1990; Song, Yao et al. 2007). Some hydroxycinnamic acids are also precursors of certain volatile compounds responsible of cider aroma (Herrero, Cuesta et al. 1999). Apple consumption is inversely correlated with the development of diseases such as asthma, diabetes, cancer or cardiovascular diseases (Boyer and Liu 2004; Crozier, Jaganath et al. 2009). Their high phenolic content and antioxidant potential are hold responsible for these protective effects. However, it is still not understood how these compounds can transfer their antioxidant potential to the human body (Lotito and Frei 2006) and what role interactions with other protective constituents such as fibers play in the protection against these diseases (McDougall, Morrison et al. 1996).

Due to their importance in apple quality, phenolic compounds have been investigated in a very large number of studies that have characterized both qualitatively and quantitatively polyphenols in apple, apple juice and other derivatives (Lu and Foo 1997; Alonso-Salces, Korta et al. 2001; Guyot, Marnet et al. 2003; Tsao, Yang et al. 2003; Alonso-Salces, Guyot et al. 2004; Kahle, Krauss et al. 2005). Globally, cider varieties are richer in total polyphenols than dessert varieties with hydroxycinnamic acids, monomeric and polymeric flavanols, dihydrochalcones and flavonols as main phenolic groups.

Polyphenol pathway is also well known and several studies have highlighted the main involved enzymes (Hoffmann, Besseau et al. 2004; Winkel 2006; Li, Flachowsky et al. 2007; He, Pan et al. 2008; Fowler and Koffas 2009; Gosch, Halbwirth et al. 2009) as well as their localization in the cell (Jorgensen, Vinther Rasmussen et al. 2005). Transcription factors of this pathway such as MYC, MYB, WD40-like protein, WRKY, MADS and TFIIIA-like protein, activated by some environmental stresses such as light, wound or temperature, have also been identified in other species (Li, Flachowsky et al. 2007; He, Pan et al. 2008; Mellway, Tran et al. 2009; Pang, Wenger et al. 2009; Hichri, Heppel et al. 2010; Lovdal, Olsen et al. 2010; Zhang, Yan et al. 2010; Koyama, Ikeda et al. 2012). So far in apple, three MYB (MdMYB1/MdMYBA/MdMYB10, MYB110a and MYB110b), two bHLH (MdbHLH3 and MdbHLH33) and one WD40 (MdTTG1) transcription factors were

identified for their involvement in the anthocyanin pathway regulation (Takos, Jaffe et al. 2006; Ban, Honda et al. 2007; Espley, Hellens et al. 2007; An, Tian et al. 2012; Xie, Li et al. 2012; Chagne, Lin-Wang et al. 2013).

QTL detection is a first step to detect genomic regions implied in agronomic trait variation. Then, the results obtained can be used for Marker Assisted Selection (MAS), which is a mean to improve breeding efficiency by reducing the time of the selection process while decreasing its cost and/or improving the average value of the breeding populations. QTL mapping has been successfully used to know in depth the mechanisms involved in durable resistance against scab, fire blight or powdery mildew on apple as well as complex fruit texture (Calenge, Faure et al. 2004; Calenge, Drouet et al. 2005; Calenge and Durel 2006; Longhi, Moretto et al. 2012). Although widely studied, phenolic compounds have been the subject of very few genetic studies. Some have been published on raspberry, blackcurrant, lily, rapeseed, rice, beans or maize but most of them included only one or few classes of phenolic compounds (Abe, Nakano et al. 2002; Barriere, Thomas et al. 2008; Caldas and Blair 2009; Jin, Xiao et al. 2009; Kassim, Poette et al. 2009; Hackett, Russell et al. 2010; Rezaeizad, Wittkop et al. 2011; Shao, Jin et al. 2011; Dobson, Graham et al. 2012; Lipsa, Snowdon et al. 2012). Only two studies were recently published on the genetic basis of phenolic compound content of apple (Chagne, Krieger et al. 2012; Khan, Chibon et al. 2012). Both were realized on dessert apple progenies, separating skin and flesh, with two different approaches to quantify and map phenolic compounds. Chagne et al. (2012) reported the quantification of 16 and 23 phenolic compounds in two different harvest years using an ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to a UV-PDA detector. Seven clusters on linkage group (LG) 1, LG14 and LG15 for *p*-coumaroylquinic acids, LG9 for anthocyanins, LG16 for flavanols and LG17 for rutin and 5-caffeoylquinic acid were particularly highlighted in this study. Khan et al. (2012) reported the quantification of 81 phenolic compounds belonging to the two groups of phenylpropanoids and polyphenols in the skin and the flesh, using a high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a mass spectrometer associated with MSClust software. Five mQTL hotspot on LG1 for quercetin and kaempferol glycosides, LG8 for quercitrin, LG13 for isorhamnetin glycosides, LG16 for kaempferol glycosides and flavanols and LG17 for 5-caffeoylquinic acid were identified. In both studies, the top of LG16 was identified as the region affecting the most the flavanol content variation. A candidate gene research identified the presence of a leucoanthocyanidin reductase (LAR) gene, involved in flavanol biosynthesis, within the confidence interval of the LG16 QTL detected both in flesh and skin (Chagne, Krieger et al. 2012).

Since the publication of the apple genome sequence by Velasco et al. (2010) (available on the Genome Database for Rosaceae (GDR) website), millions of SNP markers had been identified all along the 'Golden Delicious' genome and different SNP chips have been built for genotyping purposes. *In silico* identification and mapping of candidate genes responsible of QTL was also facilitated.

The aim of this study was to identify for the first time genomic regions controlling phenolic content in cider apples. To achieve this goal, 32 phenolic compounds were quantified by liquid chromatography in fruits and juices prepared from a cider apple progeny, for three harvest years. A previous paper describing the phenotypic variability within this progeny showed that fruits were more concentrated in phenolic compounds than juices (Verdu et al. submitted in Journal of the Science of Food and Agriculture). The less extractable groups during

juice processing were flavonols and anthocyanins: isoquercitrin, reynoutrin and ideain were not quantifiable in juices. Individual broad sense heritability calculated for these compounds showed a high heritability in fruit extracts, lower in juices. This paper presents the QTL mapping performed with these phenotypic data. Candidate genes were identified *in silico* using the apple sequence and some of them mapped on the integrated map.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The 285 progenies used in this study are derived from a cross between two hybrids from the INRA cider apple breeding program: X5210 and X8402. X5210 is derived from ‘Kermerrien’, a well known French cider apple variety, while X8402 is a dessert apple hybrid derived from a cross between the two varieties ‘Florina’ and ‘Prima’ (Figure 1). In the selection process, early selection tests for scab and powdery mildew resistance were performed in greenhouse and nursery respectively; in 2003, trees were planted on their own roots in the orchard of the “Horticulture Experimental Unit” at INRA Angers-Nantes.

This study was performed both on fruit extracts and apple juices. Fruit extracts were prepared from 92 hybrids harvested in 2008 and 137 harvested in 2009 (called F08 and F09 respectively in the paper). Apple juices were prepared from 209 and 120 hybrids harvested in 2009 and 2010, respectively (J09 and J10 respectively in the paper). Fruits were harvested at the mature stage “50% of fallen fruits”, which is the harvest stage in commercial cider orchards.

2.2. Sample preparation and phenolic quantification

Sample preparation, analytic methods and statistical analyses are described in Verdu et al. (submitted in Journal of the Science of Food and Agriculture). Briefly, fruit extracts were prepared in triplicate from 30 fruits. They were cut, frozen in liquid nitrogen and reduced in fine homogenous powder. Simple phenolic compounds were then extracted with acidified methanol. An acidolysis was also realized on apple powder to depolymerize procyanidins and to determine the total procyanidin content as well as the polymerization degree of procyanidins. Apple juices were also prepared in triplicate from 1kg of fruits. Fruits were cored and crushed with sodium fluoride and the clear apple juice was then collected. One volume of acidified methanol was added to stabilize phenolic content during the liquid chromatography (LC) analysis.

Phenolic compounds were separated by HPLC for fruit extracts and by UHPLC for apple juices. Quantification was then performed in UV for F08, F09 and J10 and by SRM for J09. (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidins B1 and B2, avicularin, hyperin, quercitrin, 5-caffeoylquinic acid, 4-p-coumaroylquinic acid and phloridzin were quantified each year and in both materials. Other compounds (procyanidins B5 and C1, 4-caffeoylquinic acid, isoquercitrin, reynoutrin, ideain, rutin and phloretin xyloglucoside) were only quantified in some experiments. Fourteen other compounds were quantified in J10 relatively to the most closest standard: ten procyanidins (annotated according to their degree of polymerization and their order of elution: trimer Ca, Cb, Cc and Cd; tetramer Da and Db, pentamer: Ea and Eb; heptamer: G and another procyanidin with unknown polymerization degree: UP), two unknown flavanols (annotated according to their m/z ratio: 245 and 518), the 5-p-

coumaroylquinic acid and another phloretin xylohexoside. The phloroglucynolise reaction performed in fruit extracts allowed us to quantify globally procyanidins and estimate the mean polymerization degree (DPn) of flavanols and procyanidins. The term “other procyanidins” (OP) includes all procyanidins of the extracts beside procyanidins B1 and B2 quantified individually.

2.3. DNA extraction and molecular marker genotyping

DNA extractions were performed from leaves using the CTAB extraction protocol described by Aldrich and Cullis (1993) with some modifications.

Genotyping has been performed both with SSR and SNP markers. A hundred and fifty three SSR markers designed in the HiDRAS project (HiDRAS website, 2012) and mapped by Silfverberg et al. (2006) were tested on ten genotypes and both parents of the progeny to select polymorphic markers for one or both parents. PCR amplifications were performed in 11 μ L volume containing 1.1x mix multiplex (Qiagen), 0.22 μ M of each primer, 2 ng of genomic DNA. SSR amplifications were performed under the following conditions: initial denaturation at 94°C for 15 min followed by 34 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 1 min 30 s, 72°C for 1 min. A final elongation step at 55°C for 15 min was included. PCR products were denaturated in 11.9 μ L volume containing 0.3 μ L of PCR products, 9.5 μ L of formamide and 0.15 μ L of ROX. Polymorphism tests were performed with a capillary sequencer ABI 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Results were analyzed with the GeneMapper software version 4.0 (Applied Biosystems). Polymorphic SSR markers were amplified as described above on the entire progeny and sent to the GENTYANE platform, INRA station of Clermont-Ferrand to analyze on a capillary sequencer 3730xl (Applied Biosystems).

The 285 progenies were genotyped with 384 SNP markers which were identified in the ‘Golden Delicious’ genome sequence. Markers were selected for their good distribution along the apple LG and their good transferability on six other apple progenies (Troggio, personal communication_GDR, 2012). The 384 SNPlex was analyzed on the entire progeny on the GENTYANE platform, INRA station of Clermont-Ferrand with the Illumina® technology manufacturer’s instructions.

2.4. Genetic linkage map construction

A genetic linkage map was built for both parents as well as the integrated map with all polymorphic markers with JoinMap 4 software (Van Ooijen 2006). Eighty and 64 SSR markers as well as 127 and 86 SNP markers were used to build the female and male genetic maps, respectively. A logarithm of the odds (LOD) score threshold of five was used for grouping and genetic distances between markers were calculated using Kosambi mapping function.

2.5. QTL analysis

QTL analyses were performed with the MapQTL 5 software (Van Ooijen, Boer et al. 2002) with the phenolic compound quantification performed each year in fruits and juices. The DPn of flavanols and procyanidins estimated in fruit extracts were also used in the analysis. Interval Mapping (IM) and multiple QTL mapping

(MQM) functions were used to identify QTLs. Significance threshold was computed using a 1000 permutation tests, at the 95% genome-wide (GW) LOD threshold. Kruskal-Wallis (KW) results were used to confirm QTL detected in MQM for not normally distributed traits. The phenotypic distribution was estimated for each genotypic class of the marker at the LOD peak by Shapiro-Francia test as described by Broman and Sen (2009). QTL were characterized by their LOD score and their percentage of explained phenotypic variation (R^2). The confidence intervals were defined as LOD-1 and LOD-2 around the maximum likelihood of QTL. They were represented as solid bars near the corresponding LG using the MapChart software version 2.2 (Voorrips 2002).

2.6. Broad sense heritability, allelic and epistatic effects calculation

The individual broad sense heritability (h^2) was calculated as follow: $h^2 = \sigma^2g/(\sigma^2g+\sigma^2r)$ where σ^2g and σ^2r were the individual genetic and residual variances, respectively.

Allelic effects were calculated for each QTL detected in MQM analyses as followed: female additivity: $A_f=[(\mu_{ac}+\mu_{ad})-(\mu_{bc}+\mu_{bd})]/4$, male additivity: $A_m=[(\mu_{ac}+\mu_{bc})-(\mu_{ad}+\mu_{bd})]/4$ and dominance: $D=[(\mu_{ac}+\mu_{bd})-(\mu_{ad}+\mu_{bc})]/4$ with a and b being the female parent alleles, and c and d, the male parent alleles and μ_{ac} , μ_{ad} , μ_{bc} and μ_{bd} the estimated phenotypic means associated with each of the four possible genotypic classes.

Epistatic effects were calculated for each trait using R software version 2.13.1 (R Development Core Team 2008) as described by Celton et al. (2011). Briefly, interactions between QTL detected for a same trait were estimated using a global model including all cofactors.

2.7. Putative candidate genes identification with the BLAST2GO software

The recent publication of the apple genome combined to the use of BLAST2GO software version 2.5.0 (Conesa, Gotz et al. 2005), allowed us to quickly identify putative genes responsible for quantitative trait variation. This software allows the identification of putative function of genes by homology of sequence using sequences annotated in the NCBI database.

All predicted gene sequences under the confidence interval of major QTL were extracted from the apple genome. A blastx analyze was realized for each sequence on the no redundant NCBI database with a minimum Blast Expected Value of 1.10^{-3} . With the annotation results, identified enzymes were positioned on KEGG pathways. Polyphenolic pathway enzymes (4-coumarate:CoA ligase (4CL), anthocyanidin reductase (ANR), anthocyanidin synthase (ANS), p-coumarate 3'-hydroxylase (C3'H), cinnamate 4-hydroxylase (C4H), chalcone isomerase (CHI), chalcone synthase (CHS), dihydrochalcone 2-O-glucosyltransferase (D2'GT), dihydroflavanol 4-reductase (DFR), flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H), flavanone 3- β -hydroxylase (FHT), flavonol synthase (FLS), shikimate/quinic acid O-hydroxycinnamoyltransferase (HCT/HQT), leucoanthocyanidin reductase (LAR), phenylalanine ammonia lyase (PAL), tyrosine ammonia lyase (TAL), UDP-glucose 3-glucosyltransferase (UGT)) and the six transcription factors identified in apple (MdMYB1/MdMYBA/MdMYB10, MYB110a, MYB110b, MdbHLH3, MdbHLH33, MdTTG1) were selected as candidate genes .

3. Results

3.1. Construction of genetic maps

Among the 153 SSR markers tested, 97 were polymorphic for one or both parents of the studied progeny and were used for the integrated linkage map construction. The Ch-Vf1 SSR marker was removed from the analysis because it created too many false double crossing-over in the map. Its relative position was between GD_SNP00252 and GD_SNP01772 markers, on the LG1. Of the 384 SNP markers, 170 (44.3%) were monomorphic, 30 (7.8%) did not amplify or were unreadable and 184 (47.9%) were polymorphic (98 abxaa, 57 aaxab, 29 abxab). This repartition is similar results from Micheletti et al. (2011) with a transferability mean of 40.9% in different apple cultivars with a range from 25.7% to 67.8%. Among the 184 polymorphic SNP markers, only 88 were kept for the map construction to reduce the number of problems with SSR markers.

The integrated linkage map construction covered 1306.6 cM over 17 LG, i.e. 91.5% of cover comparing to the Silfverberg-Dilworth et al. (2006) 'Discovery' map (1428.3 cM). The maximum interval between two markers was 25 cM. Eighty SSR and 54 SNP markers were mapped on the female map, which spanned 1191.6 cM over 16 LG. No polymorphic marker was identified for the female LG7. The male map was constructed with 64 SSR and 45 SNP markers spanning 1005.3 cM over 17 LG.

Distortions were observed on LG1, LG11 and LG17. These positions were known to have major genes and QTL of scab or powdery mildew resistance (Liebhard, Koller et al. 2003; Calenge, Faure et al. 2004). Distortions observed can be explained by the early selection performed to select for scab and powdery mildew resistance. The use of permutation test to determine the QTL threshold allows to reduce significantly the map distortion effects on QTL detection (Churchill and Doerge 1994).

3.2. QTL detection

Globally, the individual broad sense heritability was higher for compounds quantified in fruit extracts than those quantified in apple juices (Table 1). Broad sense heritability values ranged from 0.13 and 0.98. Only avicularin and hyperin were less than 0.5 0.13 for avicularin in J09 and 0.39 for hyperin in J10).

48 QTL were detected at GW threshold on nine linkage groups of integrated map for the majority of compounds phenotyped in both fruits and juices (Figure 2; Table 2). 69 and 72 QTL were detected at GW threshold on female and male map, respectively (Figure 3).

3.2.1. Hydroxycinnamic acid

A first region was specifically detected for hydroxycinnamic acids esterified in fourth position (4-caffeoylquinic and 4-p-coumaroylquinic acids) at the top of LG14. QTL were obtained for 4-p-coumaroylquinic acid quantified in F08, F09 and J10 at GW threshold and for 4-caffeoylquinic acid quantified in J10. Another QTL for 4-p-coumaroylquinic acid was detected in J09 at LG threshold. The percentage of variability explained by these QTL was greater than 40% for QTL at GW threshold and greater than 15% for that at LG threshold (Figure 2). This region was detected on the female map (cider parent), with six QTL for 4-p-coumaroylquinic and 4-caffeoylquinic acids quantified in fruits and juices each harvest years (Figure 3).

A second important region was obtained for 5-caffeoylquinic acid on the LG17 detected for each year and material, with a percentage of explained variability comprised between 33 and 43.6%. Additive effects were found for both parents. This region was detected on both parental maps, with QTL detected at the GW threshold, with a percentage of explained phenotypic variability ranging from 16.2 to 25.7% and from 19 to 26.8% for female and male maps, respectively. QTL for 5-p-coumaroylquinic acid, detected slightly upstream of this region on the integrated map, was only detected on the female map, at the same position of that for 5-caffeoylquinic acid (Figure 3).

Other QTL for 5-caffeoylquinic and 5-p-coumaroylquinic acids were identified on the LG1 in J10 and explained 13.7 and 15.4% of the variability. These two QTL were close (around 15 cM) but did not cluster. Three QTL were detected at GW threshold on the male map for 4-caffeoylquinic, 4-p-coumaroylquinic and 5-p-coumaroylquinic acids quantified in J10, at the same position of that for 5-p-coumaroylquinic detected on the integrated map (Figure 3).

The global variability explained by QTL for 5-caffeoylquinic and 5-p-coumaroylquinic acids of the integrated map were respectively 40 and 25%. No epistatic effects were found (Table 2).

3.2.2. Flavanols

The cluster identified on LG1 included 11 QTL detected for procyanidins B2, B5, C1, Db and Eb, the unknown procyanidin (UP), the unknown flavanol (245) and the “other procyanidins” (OP) quantified globally in fruits (Figure 2). All QTL were detected either above or below the suspected position of the Vf gene (46 cM). The percentage of phenotypic variability explained by these QTL was comprised between 9 and 33.3%. This region was highly detected on the male map, with 23 QTL detected at GW threshold for different flavanols quantified each year in fruits and juices. On female map, only two QTL for procyanidin B2 and one for OP quantified in F08 and F09 were mapped on LG1 (Figure 3).

The cluster detected at the top of LG4 included four QTL detected for procyanidins Ca, Cc, Da and Ea, only quantified in J10, with a percentage of explained phenotypic variability ranging from 10.2 to 41.4% (Figure 2). This cluster was detected on the male map, with five QTL detected at GW threshold for catechin, procyanidins B1, Ca, Cc and Da, quantified in J10 (Figure 3).

The cluster on LG12 grouped QTL controlling OP in F08, epicatechin quantified in J09 and the procyanidin G quantified in J10 explaining 8.1, 8.6 and 12.7% of the variation, respectively. Five additional QTL detected at the LG threshold were obtained for epicatechin and procyanidin B1 quantified in F09, for procyanidin C1 quantified in J09 and for the two other trimers of procyanidins (Ca and Cb) quantified in J10 in the same interval (Figure 2). This cluster was detected on the female map, with four procyanidins quantified in J09 and J10. Four other QTL were also detected at the GW threshold but slightly upstream of this position for epicatechin, catechin and procyanidin B1 quantified in F09 and J09 (Figure 3).

The cluster at the bottom of LG15 included six QTL detected in J10 for four procyanidins, the unknown flavanol 245 and catechin, with a percentage of variability ranging from 10.7 to 41.9% (Figure 2). This cluster was detected on the male map, with flavanols quantified in J09 and J10 at GW threshold (Figure 3).

The QTL detected for procyanidin B5 quantified in J09 on the LG3 explained 10% of the variability. Five other QTL were detected at LG threshold in the same interval for procyanidins B1, B2, C1 and Eb quantified in F09, J09 and J10 (Figure 2). This cluster was only detected on the female map with five QTL detected at GW threshold for flavanols quantified in J09 and J10 (Figure 3).

Epistatic effects were only significant for QTL of the unknown flavanol named 245 detected on LG1 and LG15. The global variability explained by QTL detected for procyanidins B5, Ca, Cc, Da, Ea, OP and UP ranged from 27 to 42% (Figure 2).

Several QTL were obtained for the degree of polymerization of flavanols on parental maps, either considering all flavanols (including monomers), DPnFlav, or considering only procyanidins, DPnProc (Figure 3). Five QTL were detected in F08 on female map on LG5, LG12, LG14 and LG16, explaining between 12.7 and 23.6% of the variability. Two other QTL were detected on the male map in F08 on LG1 and LG15, explaining 16% of the variability (Figure 3).

3.2.3. Dihydrochalcones

QTL for phloretin xyloglucoside (XPL) quantified in F09, F08 and J10 were detected on the integrated map, on LG5, LG10 and LG15 respectively. They explained respectively 16.3, 20.6 and 22.8% of the phenotypic variability (Figure 2). QTL on LG15 had female additive effect whereas other ones had no such significant effect (Table 2). Three QTL were detected on the male map at the same position on LG5 for phloretin xyloglucoside quantified in F08 and F09 and for phloridzin (PLZ) quantified in J09 (Figure 3). Two QTL were detected on the LG15 of the male map at LG threshold for phloridzine quantified in F08 and J10 but no QTL were found for phloretin xyloglucoside. This result is probably due to the absence of polymorphic markers in this region for the male map compared to the integrated map. No QTL were detected for dihydrochalcones on the LG10 of parental maps.

On LG12, a QTL was detected for phloretin xyloglucoside quantified in F08 at GW threshold, explaining 23.9% of the phenotypic variability. Two other QTL were detected at LG threshold for phloridzine and phloretin xyloglucoside quantified in J10, explaining respectively 10.5 and 5% of the phenotypic variability (Figure 2). Only a QTL for phloretin xyloglucoside quantified in F08 was detected at this position on male map at GW threshold (Figure 3).

A QTL for phloridzine was detected on LG1, explaining 28.5% of the phenotypic variability (Figure 2). This QTL was also detected on the male map, clustering with another QTL for phloridzine quantified in F08 (Figure 3).

3.2.4. Flavonols

The major region controlling flavonols concentration was localized at the bottom of LG15 at the same position as the flavanol cluster described previously. Four QTL were detected for avicularin, hyperin and reynoutrin compounds at LG or GW threshold, explaining between 15.7 and 50.9% of the phenotypic variability in fruits. Only reynoutrin had QTL for both harvest years (F08 and F09; Figure 2). This region was also detected on the

female map with seven QTL detected at GW threshold for avicularin, hyperin, isoquercitrin and reynoutrin (Figure 3).

In addition, three QTL were detected for quercitrin, two on LG1 for F08 and J10 and another for F08 on the bottom of LG17, with a percentage of explained phenotypic variability of 28.2, 31.7 and 18.7% respectively (Figure 2).

3.2.5. Anthocyanins

No QTL for ideain was obtained at GW or LG threshold on the integrated map. A QTL was obtained on the LG1 of the female map and on the LG5 of the male map, explaining 19.2 and 12.4% of the phenotypic variability, respectively (Figure 3).

3.3. Putative candidate genes identification

Clusters on LG1, LG3, LG12, LG14, LG15 and LG17 for flavanols, dihydrochalcones, flavonols and hydroxycinnamic acids were selected based on their high explanation of phenotypic variability and the high number of QTL clustering. As the NZ05g08 marker of the LG4 could not be blasted, no candidate gene identification could be performed for this cluster.

For hydroxycinnamic acids, three genes annotated as F3'H and two F3'5'H were identified on LG14 and four annotated as HCT/HQT and one DFR were identified on LG17 (Figure 4; Table 3). The MYB110a and MYB110b genes were also identified in the interval on LG17. For flavanols, one UFGT, three FHT and one FLS were identified on LG1. The MdTTG1, a WD40 transcription factor was also present in the interval. Four genes annotated as DFR, two F3'5'H and one FLS were found on LG3. On LG12, two FLS were identified. The bHLH33 transcription factor involved in the regulation of anthocyanin pathway was localized under the cluster of flavanols and flavonols on the LG15. One F3'H and one F3'5'H were identified for flavonols on LG1. For dihydrochalcones, six genes annotated as UFGT, F3'H, FHT, DFR and FLS were identified on LG5, one CHI was identified on LG12 and one CHS and one FLS were identified on LG15. No candidate gene was found on LG10.

4. Discussion

48 QTL were detected for hydroxycinnamic acids, flavanols, dihydrochalcones and flavonols quantified in fruits and juices at GW threshold on the X5210 x X8402 integrated map. They are mainly grouped into ten major clusters on seven linkage groups and summarized in Figure 2. As the content of phenolic compounds is highly dependent on environmental conditions, QTL detected a year for a specific compound are generally not stable over all harvest years. However, some regions such as those on LG1, LG3, LG12 and LG15 are considered stable for a chemical class as several QTL were detected for several compounds of the same class.

4.1. Comparisons between cider and dessert apple progenies

Cider apples are commonly more astringent and bitter than dessert apple. It has been shown that bitter apple varieties were richer in flavanols and/or dihydrochalcones than non-bitter varieties (Alonso-Salces, Barranco et al. 2004). With their tanning properties, procyanidins can form complexes with salivary proteins for astringency or receptors for bitterness, depending on their polymerization degree (Lea and Arnold 1978). However, the involvement in bitterness of dihydrochalcones has not yet been clearly demonstrated.

At the beginning of this study, we thought that bitterness and astringency are positively selected for cider apples and very depreciated for dessert apples. Compared to previous studies, several regions for these two classes of phenolic compounds were different, supporting this first hypothesis of a differential selection between cider and dessert apple. Five main regions were detected for the flavanol content on LG1, LG3, LG4, LG12 and LG15 which were not detected in previous studies in dessert apple (Chagne, Krieger et al. 2012; Khan, Chibon et al. 2012). In these previous studies, the most important QTL for the flavanol content was detected at the top of the LG16. In addition, a leucoanthocyanidin reductase (LAR) gene was identified in the confidence interval. In our study, this region was not detected (QTL detected on the LG16 of the female map were below this cluster). For dihydrochalcones, several QTL were detected specifically in our progeny on the LG1, LG5, LG10, LG12 and LG15. In previous works, no QTL was presented by Chagne et al. (2012) for this phenolic group and only two QTL were obtained by Khan et al. (2012) for phloridzin quantified in skin (on LG16) and flesh (on LG15). That on LG15 may be the same that QTL detected in our progeny for phloretin xyloglucoside.

As regard to these results and considering the implication of these phenolic compounds in the astringency and bitterness of apple, we thought that these major differences were linked to the cider type of our progeny. However, the study of parental maps has shown that these QTL are derived from both parents, independently of the cider origin, challenging this hypothesis. We can only assume that the crossing of a dessert and a cider hybrid has maximized the genetic variability in the studied progeny and thus allow us to detect different QTL as those detected in previous studies.

Moreover, our study has shown for the first time genetic regions controlling the mean polymerization degree of flavanols. These QTL were detected on the LG12, LG14 and LG16 on the female map and on the LG1 and LG15 on the male map. Only those on LG15 and LG16 colocalize with other QTL for the flavanols content, supporting an independent regulation for the flavanol concentration and the flavanol polymerization.

In addition to these specific regions, we confirm the location of QTL already detected in former studies. QTL on LG1 for quercetin glycosides seemed common with the QTL controlling flavonols (quercetin and kampferol glycosides) obtained by Khan et al. (2012) study but to a lesser extent since only quercitrin quantified in F08 and J10 had QTL at GW threshold on LG1 in our progeny. Many other QTL detected with KW test have been found between GD_SNP01470 and GD_SNP01772 markers for avicularin, reynoutrin and rutin (data not shown).

QTL explaining a high phenotypic variability (up to 59.9%) were detected at the top of LG14. This region had also been detected by Chagne et al. (2012) for p-coumaric acid but with lower percentages of explained variation (between 7.1 and 19.3%). In addition to the QTL for 4-p-coumaroylquinic acid detected annually in fruits and

juices, a strong QTL was detected for 4-caffeoylquinic acid quantified in J10 in the same interval. Although no QTL was obtained for this compound quantified in J09 with IM, result in KW was very strong (<0.0001). This suggests therefore an important region for the content of hydroxycinnamic acids esterified specifically at the fourth position, supported by the absence of QTL for 5-caffeoylquinic and 5-p-coumaroylquinic acid in this region.

The most stable and conserved region identified among the three studies was the one controlling 5-caffeoylquinic acid concentration on LG17. The percentage of explained phenotypic variability was high in the three progenies (19% in Khan et al. (2012) study, ranging from 10 to 46.5% in Chagne et al. (2012) study, and from 33 and 43.6% in this study). As Chagne et al. (2012), we detected in this region four shikimate/quinate O-hydroxycinnamoyltransferase (HCT/HQT) genes, including two with a zero min e.Value score. As this region was detected both in female and male maps, we can supposed the presence of a major gene controlling the synthesis of this compound.

The LG17 was also described previously to have QTL for quercetin glycosides. In our study, one QTL for quercitrin detected at GW threshold in F08 and one for rutin detected at the LG threshold in J09 were mapped on this LG. This region was confirmed for both compounds with KW results each year and for both materials at a significance threshold ranging from 0.01 to 0.0005. Moreover, a DFR was found in the interval, supposing a conserved region for flavonol content in apple.

This QTL study was the first performed with a cider apple progeny, considering major phenolic compounds as well as the total procyanidin content and their main polymerization degree. A high phenotypic variability, representative of major cider apple varieties was observed in this progeny (Verdu et al. submitted in Journal of the Science of Food and Agriculture). However, generalization to cider apple must be taken with caution since we are limited to the genetic background of this progeny. Further genetic studies based on a wider genetic diversity would have to be planned to confirm and precise the cider origin of some QTL.

4.2. Putative candidate genes identification to understand the genetic architecture of the phenolic compounds regulation

Enzymes of the polyphenol pathway have been widely described and the colocalization with QTL was therefore easy to determine with the sequence of apple genome. HCT/HQT genes identified under the QTL for the caffeoylquinic acid on the LG17 were described to catalyze the formation of p-coumaroylquinic acid from the 4-coumaroyl-CoA. This compound is the precursor of caffeoylquinic acid via the p-coumarate 3'-hydroxylase (C3'H) gene. Then, caffeoylquinic acid may be used as a substrate by HCT to form caffeic acid. Conversely, caffeic acid can be used by HQT to form caffeoylquinic acid (Figure 5). HCT/HQT genes identified on the QTL for 5-caffeoylquinic acid on LG17 are good candidates because they are directly related to this compound (Hoffmann, Besseau et al. 2004). Similarly, flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) gene identified for quercetin and kaempferol glycosides cluster on LG1 can directly regulate their content. This enzyme is responsible for the hydroxylation on the third position of the B ring of flavonols, dihydroflavonols or flavanones (Figure 5). If this enzyme is up-regulated, the formation of quercetin could be favored compared to kaempferol. Inversely, if it is

down-regulated, the degradation of kaempferol is lower and this class of compounds could be favored compared to quercetin.

Inversely, the UDP-glucose 3-glucosyltransferase (UGT) gene found under the QTL for flavanols on LG1, is described to catalyze the formation of anthocyanidins-3-O- β -D-glucoside from anthocyanidins and UDP-D-glucose (Figure 5). This colocalization with flavanol QTL may be explained by the competition of this enzyme with anthocyanidin reductase (ANR) for anthocyanidins as a substrate to form either cyanidin glycosides (with UGT) or flavanol monomers (catechin and epicatechin). Indeed, ectopic expression of apple MdANR genes in tobacco increases the procyanidins content and decreases the anthocyanin content in flowers (Han, Vimolmangkang et al. 2012). In the same way, the silencing of the anthocyanidin synthase (ANS) in apple has shown a drastic reduction in the anthocyanin content (Szankowski, Flachowsky et al. 2009). However, in this study, the epicatechin content was increased whereas this compound is also dependent of the ANS activity. Authors supposed a residual ANS activity associated with kinetic competition between ANR and UGT. An alternative biosynthetic pathway to epicatechin from catechin or procyanidins was also suggested (Szankowski, Flachowsky et al. 2009). Both studies have also shown a modification in the transcriptional level and/or in the enzymatic activities of almost all structural enzymes of the polyphenolic pathway, as well as the MYB transcription factor in tobacco (Szankowski, Flachowsky et al. 2009; Han, Vimolmangkang et al. 2012). These results suggest a complex feedback of biosynthetic enzymes that remain to be clarified to evaluate clearly the impact of each enzyme on the polyphenol pathway.

Transcription factors involved in the regulation of phenolic compounds in apple have been much less studied. A MYB gene located on LG9 (with three alleles MYBA/MYB1/MYB10), two other MYB genes called MYB110a and MYB110b located on LG17, two bHLH (MdbHLH3 on LG11 and MdbHLH33 on LG15) and a WD40 (MdTTG1 on LG1) transcription factors involved in the anthocyanin pathway have been previously identified (Talos, Jaffe et al. 2006; Ban, Honda et al. 2007; Espley, Hellens et al. 2007; An, Tian et al. 2012; Xie, Li et al. 2012). The clustering of QTL for hydroxycinnamic acids and flavanols with the MdTTG1 gene and QTL for flavanols and flavonols with the bHLH33 genes suggests the involvement of these transcription factors in the regulation of several phenolic groups, other than that of anthocyanins for which they were previously identified (Espley, Hellens et al. 2007; An, Tian et al. 2012).

These results are based solely on *in silico* identification of gene potentially involved in the polyphenol pathway. The study was focused on a limited number of genes. So, we certainly missed some like other transcription factors, small regulatory RNA (miRNA) and all other genes which could affect the catalytic activity of enzymes or phenolic compounds stability. However, this study has already highlighted a large number of candidate genes for most of the major QTL. This large number of candidates is rather surprising and it will require some validation later on. Sequencing methods, QRT-PCR, or in the best case, transgenesis could validate them. QTL detection based on the level of expression of these enzymes (eQTL) could also be an interesting approach.

4.3. Use in marker-assisted selection

This study highlighted few major QTL significantly responsible for the variability of major phenolic compounds involved in cider organoleptic characteristics. Among them, one on LG12 detected for flavanols and two for the

hydroxycinnamic acids on LG14 and LG17, showed high stability between years, both in fruits and juices, significant additive effects and high percentage of explained variability (between 16 and 60%): so they are good candidates to be used in cider apple breeding programs. Flavanols are mainly involved in the bitterness and astringency of the fruit, depending on the procyanidins polymerization degree (Lea and Arnold 1978) ; hydroxycinnamic acids, more particularly 5-caffeoylquinic acid, have impact on color (Oszmianski and Lee 1990) and aromatic potential of ciders (Herrero, Cuesta et al. 1999). Moreover, different candidate genes were identified in these regions. Further fine mapping studies should allow us to precise the position of these QTL to be able to use them in marker-assisted selection. The 20K SNP chip recently developed in the European project FruitBreedomics could be used to densify map in these regions. For minor QTL, genome wide selection could be developed. This method, which is successfully performed in dairy cattle selection, has been more recently tested in apple (Kumar, Chagne et al. 2012).

Conclusion

Our study allowed to map several QTL controlling the content of major phenolic compounds in cider apple. Some QTL seemed specific to our progeny since they were not detected in previous works based on dessert apple progenies. Many candidate genes have been identified in several clusters of QTL detected for compounds belonging to a same chemical class. Our results showed that marker-assisted selection could be developed on the three QTL detected on LG12, LG14 and LG17 for flavanols and hydroxycinnamic acids. So far, only three QTL studies have been undertaken: they are all based on single progenies. So, it is worthwhile to confirm these results on a wider diversity. Genotypic tools currently developed from the apple genome sequence allow to develop new fine mapping approaches as pedigree based analysis and genome wide association. Genome wide selection, well developed on dairy cattle selection and currently tested in apple, could be a complementary way to select for the other traits.

Acknowledgments

The authors would like to thank Michel Boucourt, Elise Lepautremat and Bernard Petit of the IRHS of INRA Angers-Nantes for their technical assistance in sample harvesting and preparation and the team of the Horticulture Experimental Unit of INRA, Angers-Nantes that took care of the trees. We thank H el ene Muranty and Charles-Eric Durel of the IRHS for their precious advices and Charles Poncet and Lydia Jaffrelo from Gentyane platform of the INRA Clermont-Ferrand (France) for their help with SSR and SNP analyses. This work was cofounded by the SFR 149 QUASAV through a PhD grant and the transregional INNOVACIDRE project for the consumables and travel expenses.

References

Abe, H., M. Nakano, et al. (2002). "Genetic analysis of floral anthocyanin pigmentation traits in Asiatic hybrid lily using molecular linkage maps." *Theoretical and Applied Genetics* **105**: 1175-1182.

-
- Aldrich, J. and C. A. Cullis (1993). "RAPD Analysis in Flax: Optimization of Yield and Reproducibility using KlenTaq 1 DNA Polymerase, Chelex 100, and Gel Purification of Genomic DNA." Plant Molecular Biology Reporter **11**(2): 128-141.
- Alonso-Salces, R. M., A. Barranco, et al. (2004). "Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Cultivars and Their Technological Properties." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**: 2938-2952.
- Alonso-Salces, R. M., S. Guyot, et al. (2004). "Chemometric characterisation of Basque and French ciders according to their polyphenolic profiles." Analytical and Bioanalytical Chemistry **379**: 464-475.
- Alonso-Salces, R. M., E. Korta, et al. (2001). "Determination of Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Varieties Using Accelerated Solvent Extraction." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**: 3761-3767.
- An, X.-H., Y. Tian, et al. (2012). "The apple WD40 protein MdTTG1 interacts with bHLH but not MYB proteins to regulate anthocyanin accumulation." Journal of Plant Physiology **169**: 710-717.
- Ban, Y., C. Honda, et al. (2007). "Isolation and Functional Analysis of a MYB Transcription Factor Gene that is a Key Regulator for the Development of Red Coloration in Apple Skin." Plant Cell Physiology **48**(7): 958-970.
- Barriere, Y., J. Thomas, et al. (2008). "QTL mapping for lignin content, lignin monomeric composition, p-hydroxycinnamate content, and cell wall digestibility in the maize recombinant inbred line progeny F838 x F286." Plant Science **175**(4): 585-595.
- Boyer, J. and R. H. Liu (2004). "Apple phytochemicals and their health benefits." Nutrition Journal **3**(1): 5.
- Broman, K. W. and S. Sen (2009). Single-QTL analysis. A guide to QTL mapping with R/qtI, Springer: 400.
- Caldas, G. V. and M. W. Blair (2009). "Inheritance of seed condensed tannins and their relationship with seed-coat color and pattern genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)." Theoretical and Applied Genetics **119**: 131-142.
- Calenge, F., D. Drouet, et al. (2005). "Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies." Theoretical and Applied Genetics **111**: 128-135.
- Calenge, F. and C.-E. Durel (2006). "Both stable and unstable QTLs for resistance to powdery mildew are detected in apple after four years of field assessments." Molecular Breeding **17**(4): 329-339.
-

- Calenge, F., A. Faure, et al. (2004). "Quantitative Trait Loci (QTL) Analysis Reveals Both Broad-Spectrum and Isolate-Specific QTL for Scab Resistance in an Apple Progeny Challenged with Eight Isolates of *Venturia inaequalis*." Genetics and Resistance **94**(4): 370-379.
- Celton, J.-M., S. Martinez, et al. (2011). "Deciphering the genetic determinism of bud phenology in apple progenies: a new insight into chilling and heat requirement effects on flowering dates and positional candidate genes." New Phytologist **192**(2): 378-392.
- Chagne, D., C. Krieger, et al. (2012). "QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit." BMC Plant Biology **12**: 12.
- Chagne, D., K. Lin-Wang, et al. (2013). "An Ancient Duplication of Apple MYB Transcription Factors Is Responsible for Novel Red Fruit-Flesh Phenotypes." Plant Physiology **161**: 225-239.
- Churchill, G. A. and R. W. Doerge (1994). "Empirical threshold values for quantitative trait mapping." Genetics **138**: 963-971.
- Conesa, A., S. Gotz, et al. (2005). "Blast2GO : a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research." Bioinformatics **21**(18): 3674-3676.
- Cornille, A., P. Gladieux, et al. (2012). "New Insight into the History of Domesticated Apple: Secondary Contribution of the European Wild Apple to the Genome of Cultivated Varieties." Plos Genetics **8**(5): e1002703.
- Crozier, A., I. B. Jaganath, et al. (2009). "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." Royal Society of Chemistry **26**: 1001-1043.
- Dobson, P., J. Graham, et al. (2012). "Over-seasons Analysis of Quantitative Trait Loci Affecting Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Raspberry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**: 5360-5366.
- Espley, R. V., R. P. Hellens, et al. (2007). "Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10." The Plant Journal **49**: 414-427.
- Fowler, Z. L. and M. A. G. Koffas (2009). "Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives." Applied Microbiology and Biotechnology **83**: 799-808.
- Gargouri, M., C. Manigand, et al. (2009). "Structure and epimerase activity of anthocyanidin reductase from *Vitis vinifera*." Acta Crystallographica Section D **65**(9): 989-1000.

-
- Gosch, C., H. Halbwirth, et al. (2009). "Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.)." Plant Science **176**: 223-231.
- Guyot, S., N. Marnet, et al. (2003). "Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(21): 6240-6247.
- Hackett, C. A., J. Russell, et al. (2010). "Multi-environment QTL mapping in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) using mixed models." Theoretical and Applied Genetics **121**: 1483-1488.
- Han, Y., S. Vimolmangkang, et al. (2012). "Introduction of apple ANR genes into tobacco inhibits expression of both CHI and DFR genes in flowers, leading to loss of anthocyanin." Journal of Experimental Botany **63**(7): 2437-2447.
- He, F., Q.-H. Pan, et al. (2008). "Biosynthesis and Genetic Regulation of Proanthocyanidins in Plants." Molecules **13**: 2674-2703.
- He, F., Q.-H. Pan, et al. (2008). "Chemical Synthesis of Proanthocyanidins in Vitro and Their Reactions in Aging Wines." Molecules **13**: 3007-3032.
- Herrero, M., I. Cuesta, et al. (1999). "Changes in Organic Acids During Malolactic Fermentation at Different Temperatures in Yeast-Fermented Apple Juice." Journal of the Institute of Brewing **105**(3): 191-195.
- Hichri, I., S. C. Heppel, et al. (2010). "The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor MYC1 Is Involved in the Regulation of the Flavonoid Biosynthesis Pathway in Grapevine." Molecular Plant **3**(3): 509-523.
- Hoffmann, L., S. Besseau, et al. (2004). "Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis." Plant Cell **16**: 1446-1465.
- Jin, L., P. Xiao, et al. (2009). "Quantitative Trait Loci for Brown Rice Color, Phenolics, Flavonoid Contents, and Antioxidant Capacity in Rice Grain." Cereal Chemistry **86**(6): 609-615.
- Jorgensen, K., A. Vinther Rasmussen, et al. (2005). "Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products." Current Opinion in Plant Biology **8**: 280-291.
- Kahle, K., M. Krauss, et al. (2005). "Polyphenol profiles of apple juices." Molecular Nutrition and Food Research **49**: 797-806.

- Kassim, A., J. Poette, et al. (2009). "Environmental and seasonal influences on red raspberry anthocyanin antioxidant contents and identification of quantitative traits loci (QTL)." Molecular Nutrition and Food Research **53**: 625-634.
- Khan, S. A., P.-Y. Chibon, et al. (2012). "Genetic analysis of metabolites in apple fruits indicates an mQTL hotspot for phenolic compounds on linkage group 16." Journal of Experimental Botany **63**(8): 2895-2908.
- Koyama, K., H. Ikeda, et al. (2012). "Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape." Phytochemistry **78**: 54-64.
- Kumar, S., D. Chagne, et al. (2012). "Genomic Selection for Fruit Quality Traits in Apple (*Malus domestica* Borkh.)." Plos One **7**(5): e36674.
- Lea, A. G. H. and G. M. Arnold (1978). "The phenolics of ciders: Bitterness and astringency." Journal of the Science of Food and Agriculture **29**(5): 478-483.
- Li, H., H. Flachowsky, et al. (2007). "Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.)." Planta **226**: 1243-1254.
- Liebhart, R., B. Koller, et al. (2003). "Mapping Quantitative Field Resistance Against Apple Scab in a 'Fiesta' × 'Discovery' Progeny." Genetics and Resistance **93**(4): 493-501.
- Lipsa, F. D., R. Snowdon, et al. (2012). "Quantitative genetic analysis of condensed tannins in oilseed rape meal." Euphytica **184**: 195-205.
- Longhi, S., M. Moretto, et al. (2012). "Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh.)." Journal of Experimental Botany **63**(3): 1107-1121.
- Lotito, S. B. and B. Frei (2006). "Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?" Free Radical Biology and Medicine **41**: 1727-1746.
- Lovdal, T., K. M. Olsen, et al. (2010). "Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato." Phytochemistry **71**: 605-613.
- Lu, Y. and L. Y. Foo (1997). "Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace." Food Chemistry **59**(2): 187-194.

-
- Macheix, J. J., A. Fleuriet, et al. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Lausanne.
- McDougall, G. J., I. M. Morrison, et al. (1996). "Plant Cell Walls as Dietary Fibre: Range, Structure, Processing and Function." Journal of the Science of Food and Agriculture **70**(2): 133-150.
- Mellway, R. D., L. T. Tran, et al. (2009). "The Wound-, Pathogen-, and Ultraviolet B-Responsive MYB134 Gene Encodes an R2R3 MYB Transcription Factor That Regulates Proanthocyanidin Synthesis in Poplar." Plant Physiology **150**: 924-941.
- Micheletti, D., M. Troggio, et al. (2011). "Genetic diversity of the genus *Malus* and implications for linkage mapping with SNPs." Tree Genetics and Genomes **7**: 857-868.
- Oszmianski, J. and C. Y. Lee (1990). "Enzymic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system." Journal of Agricultural and Food Chemistry **38**(5): 1202-1204.
- Pang, Y., J. P. Wenger, et al. (2009). "A WD40 Repeat Protein from *Medicago truncatula* Is Necessary for Tissue-Specific Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis But Not for Trichome Development." Plant Physiology **151**: 1114-1129.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rezaeizad, A., B. Wittkop, et al. (2011). "Identification of QTLs for phenolic compounds in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by association mapping using SSR markers." Euphytica **177**: 335-342.
- Shao, Y., L. Jin, et al. (2011). "Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice." Theoretical and Applied Genetics **122**: 1005-1016.
- Silfverberg-Dilworth, E., C. L. Matasci, et al. (2006). "Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome." Tree Genetics and Genomes **2**: 202-224.
- Song, Y., Y.-X. Yao, et al. (2007). "Polyphenolic Compound and the Degree of Browning in Processing Apple Varieties." Agricultural Sciences in China **6**(5): 607-612.
- Szankowski, I., H. Flachowsky, et al. (2009). "Shift in polyphenol profile and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple (*Malus* sp.)." Planta **229**: 681-692.
- Takos, A. M., F. W. Jaffe, et al. (2006). "Light-Induced Expression of a MYB Gene Regulates Anthocyanin Biosynthesis in Red Apples." Plant Physiology **142**: 1216-1232.
-

- Tsao, R., R. Yang, et al. (2003). "Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(21): 6347-6353.
- Van Ooijen, J. W. (2006). JoinMap 4: software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. P. R. I. B. V. a. K. B.V. Wageningen, Netherlands: 63.
- Van Ooijen, J. W., M. P. Boer, et al. (2002). MapQTL 4.0: software for the calculation of QTL positions on genetic maps. . P. R. I. B.V. Wageningen, Netherlands.
- Velasco, R., A. Zharkikh, et al. (2010). "The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.)." Nature Genetics **42**(10): 833-839.
- Voorrips, R. E. (2002). "MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs." The Journal of Heredity **93**(1): 77-78.
- Winkel, B. S. J. (2006). The Biosynthesis of Flavonoids. The Science of Flavonoids. E. Grotewold. Columbus: 26.
- Xie, X.-B., S. Li, et al. (2012). "The bHLH transcription factor MdbHLH3 promotes anthocyanin 1 accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples." Plant, Cell and Environment **35**(11): 1884-1897.
- Zhang, Y., Y.-P. Yan, et al. (2010). "The Arabidopsis PAP1 Transcription Factor Plays an Important Role in the Enrichment of Phenolic Acids in *Salvia miltiorrhiza*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**: 12168-12175.

HiDRAS website, 2012: <http://www.hidras.unimi.it>

KEGG website, 2012: <http://www.genome.jp/kegg/>

Figures

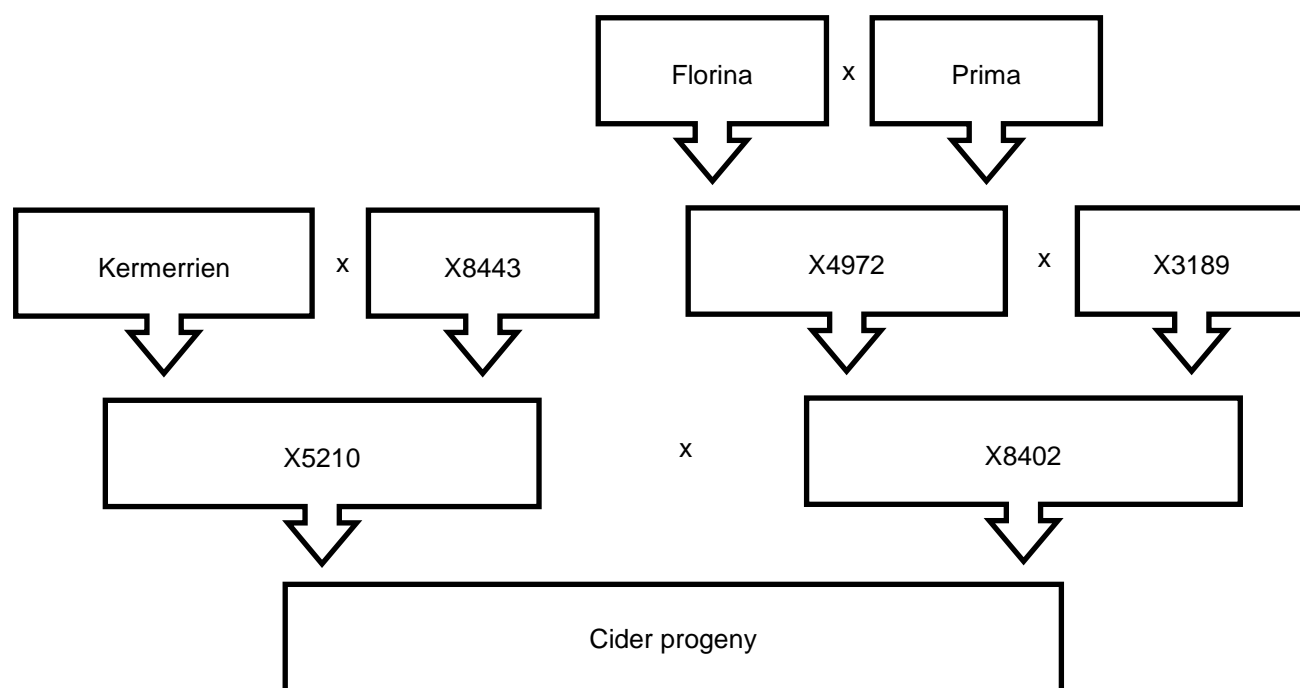
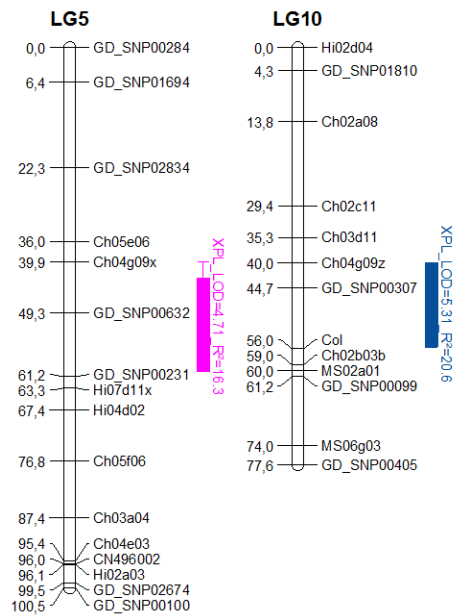
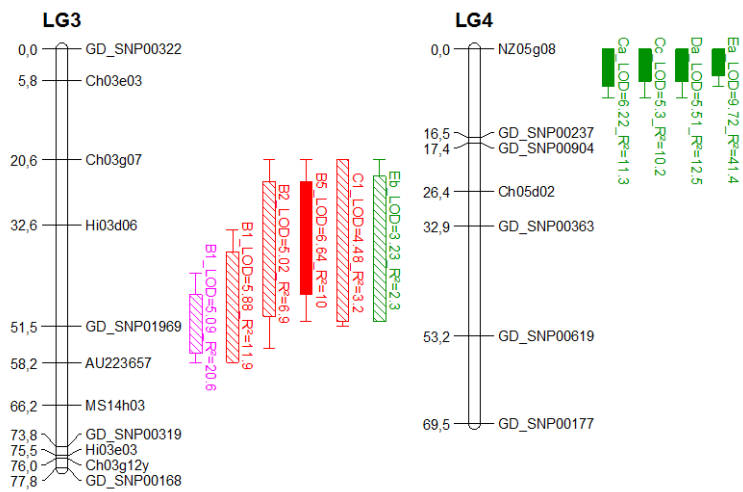
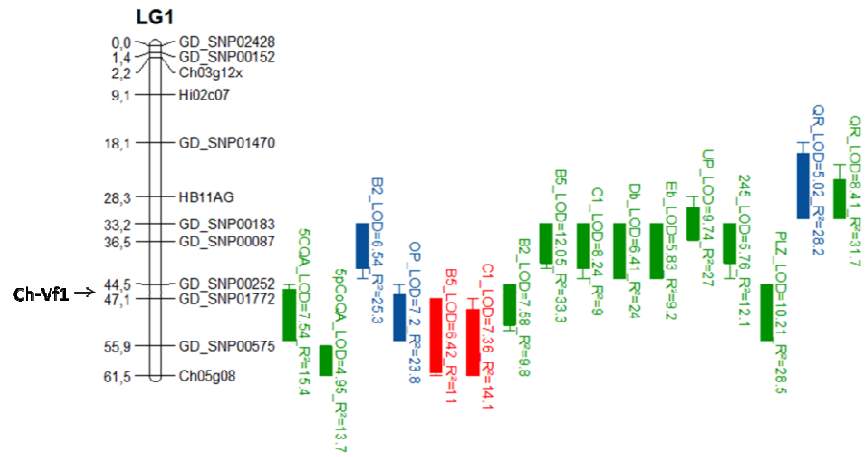


Figure 1. Pedigree of the studied progeny with ‘Kermerrien’ the cider ancestor, and X5100, X4972 and X3189, three dessert apple hybrids.



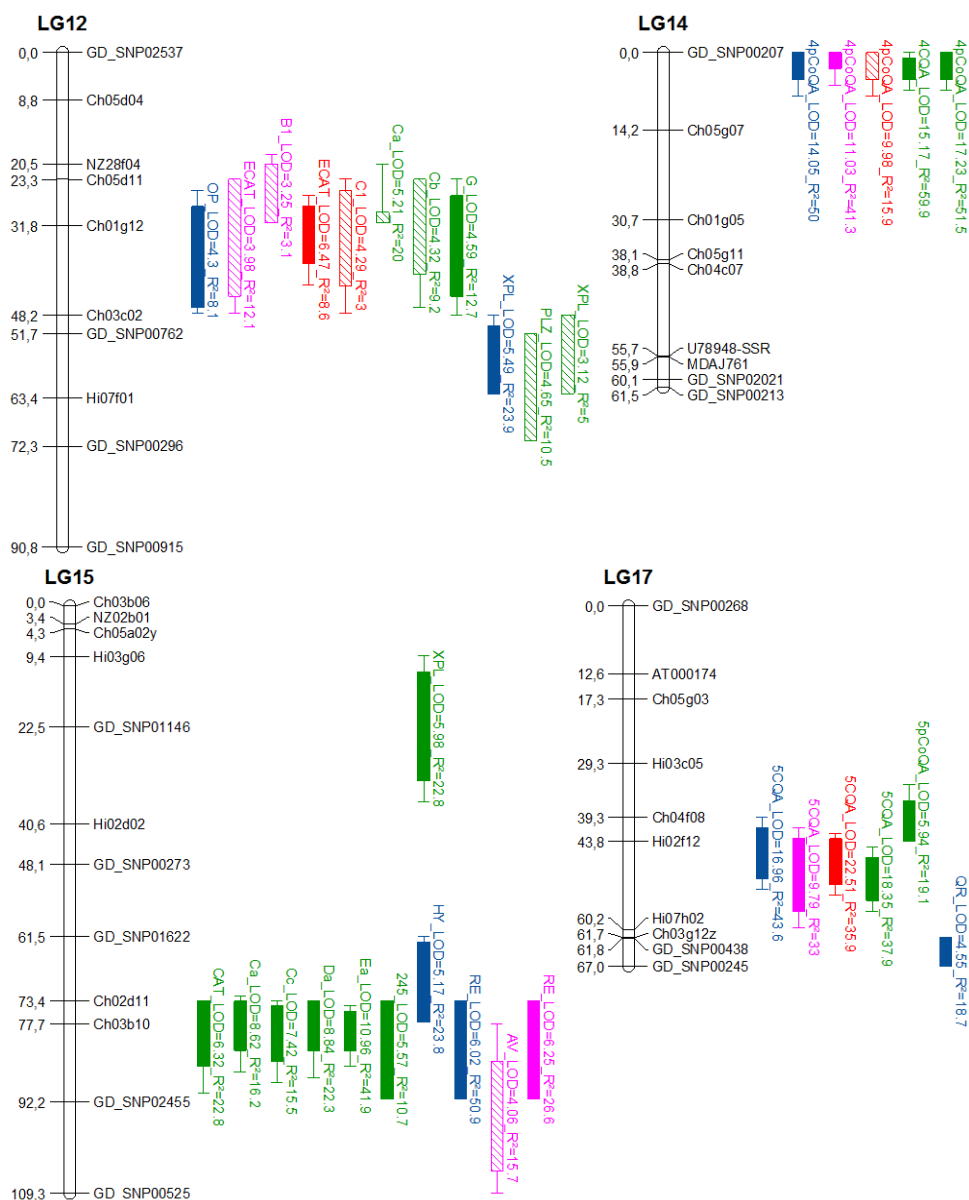
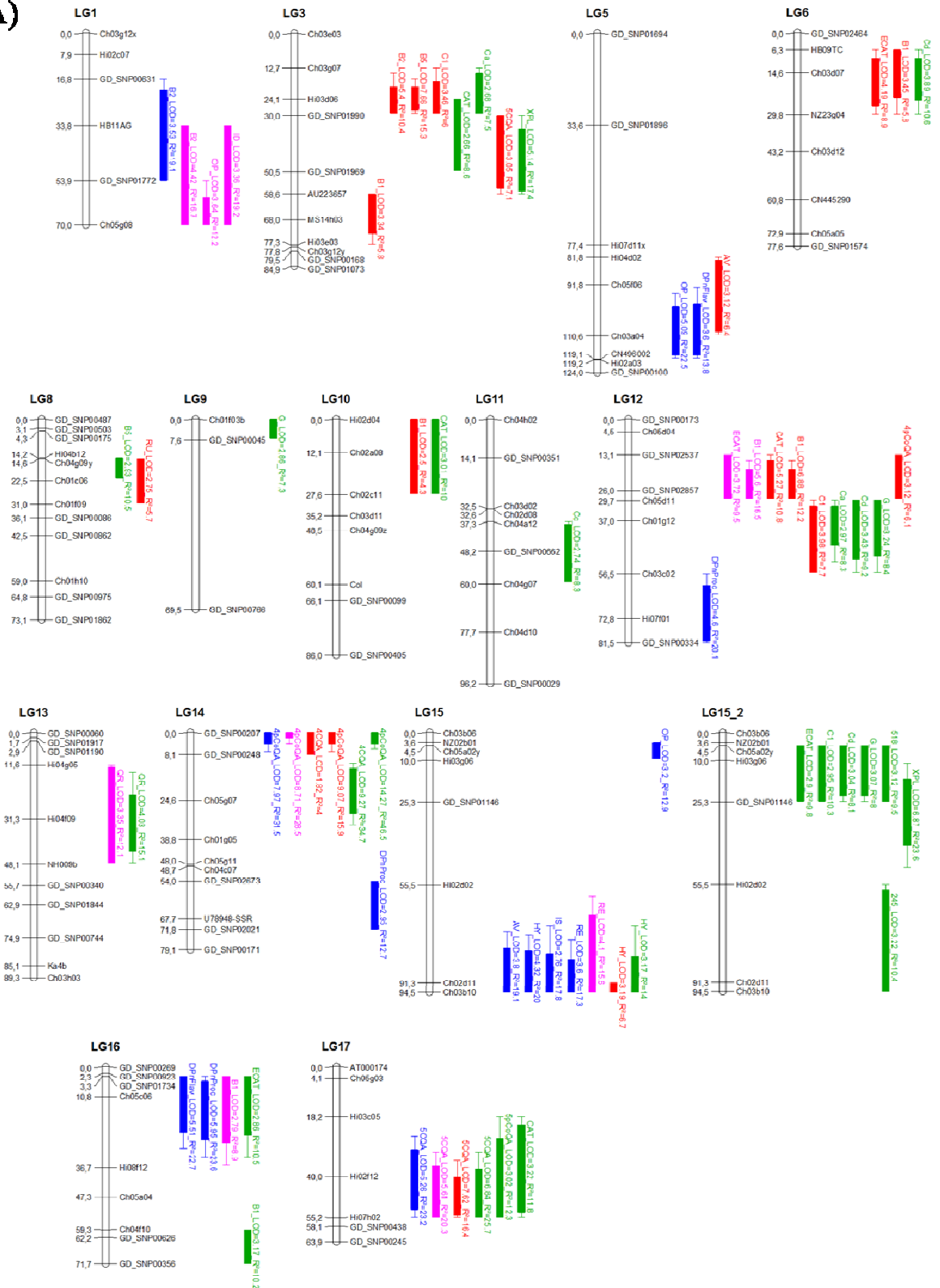


Figure 2. Quantitative Trait Loci (QTL) detected on the integrated map for phenolic compounds in apple fruits harvested in 2008 (blue) and 2009 (pink) and juices prepared in 2009 (red) and 2010 (green) from the X5210 x X8402 progeny. QTL detected at GW and LG threshold were respectively represented with solid and hatched boxes extended by lines representing the logarithm of the odds (LOD)-1 and LOD-2 confidence intervals. 245: unknown flavanol with a 245 m/z; 4CQA: 4-caffeoylquinic acid; 4pCoQA: 4-p-coumaroylquinic acid; 5CQA: 5-caffeoylquinic acid; 5pCoQA: 5-p-coumaroylquinic acid; B1: procyanidin B1; B2: procyanidin B2; B5: procyanidin B5; C1: procyanidin C1; Ca: trimer of procyanidin; CAT: catechin; Cc: trimer of procyanidin; Da: tetramer of procyanidin; Db: tetramer of procyanidins; Ea: pentamer of procyanidin; ECAT: epicatechin; Eb: pentamer of procyanidins; G: heptamer of procyanidin; HY: hyperin; OP: other procyanidins; PLZ: phloridzin; QR: quercitrin; RE: reynoutrin; UP: procyanidin with unknow polymerization degree; XPL: phloretin xyloglucoside.

A)



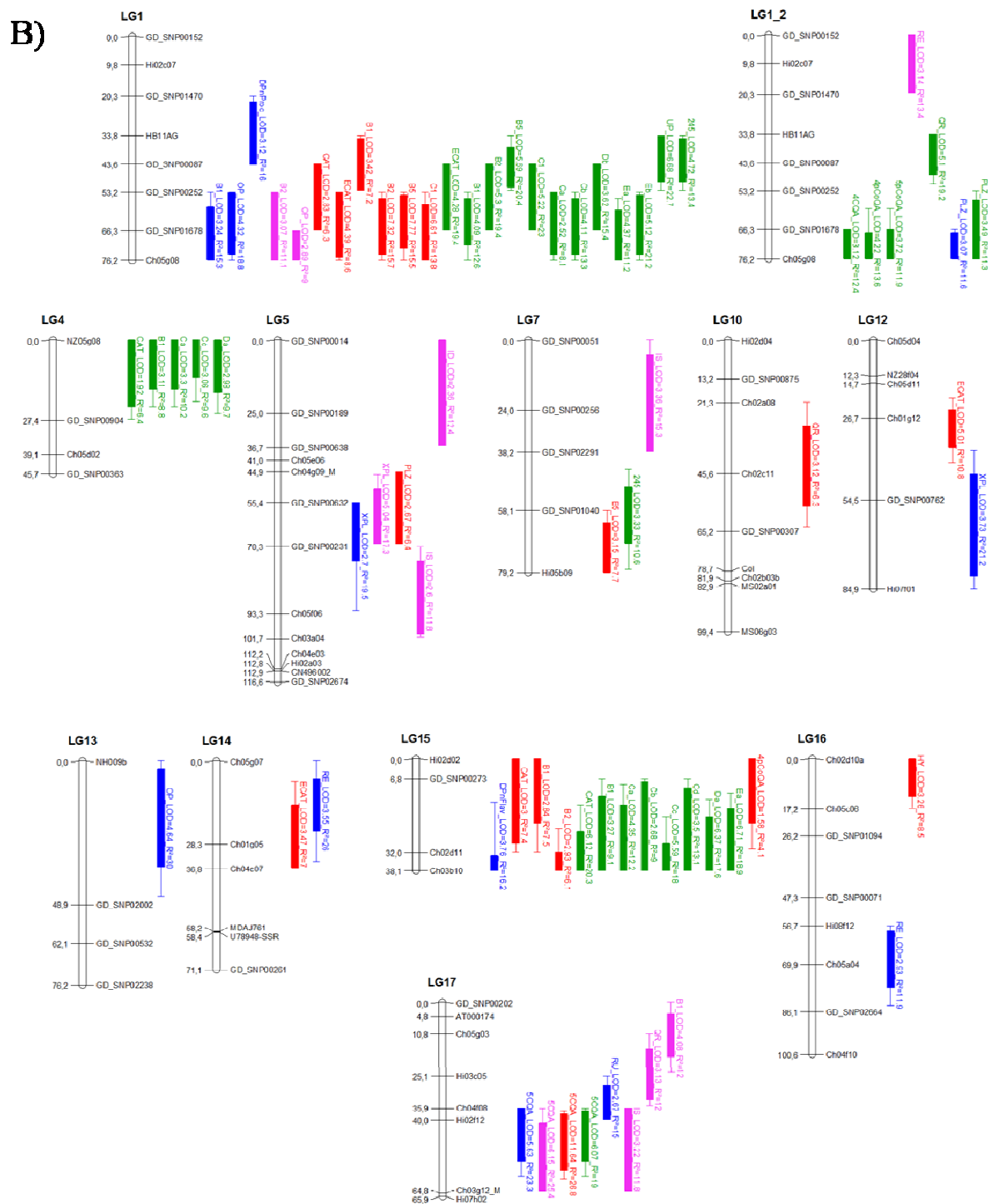


Figure 3. Quantitative Trait Loci (QTL) detected on the female X5210 (A) and male X8402 (B) maps. Legend: see Fig. 2.

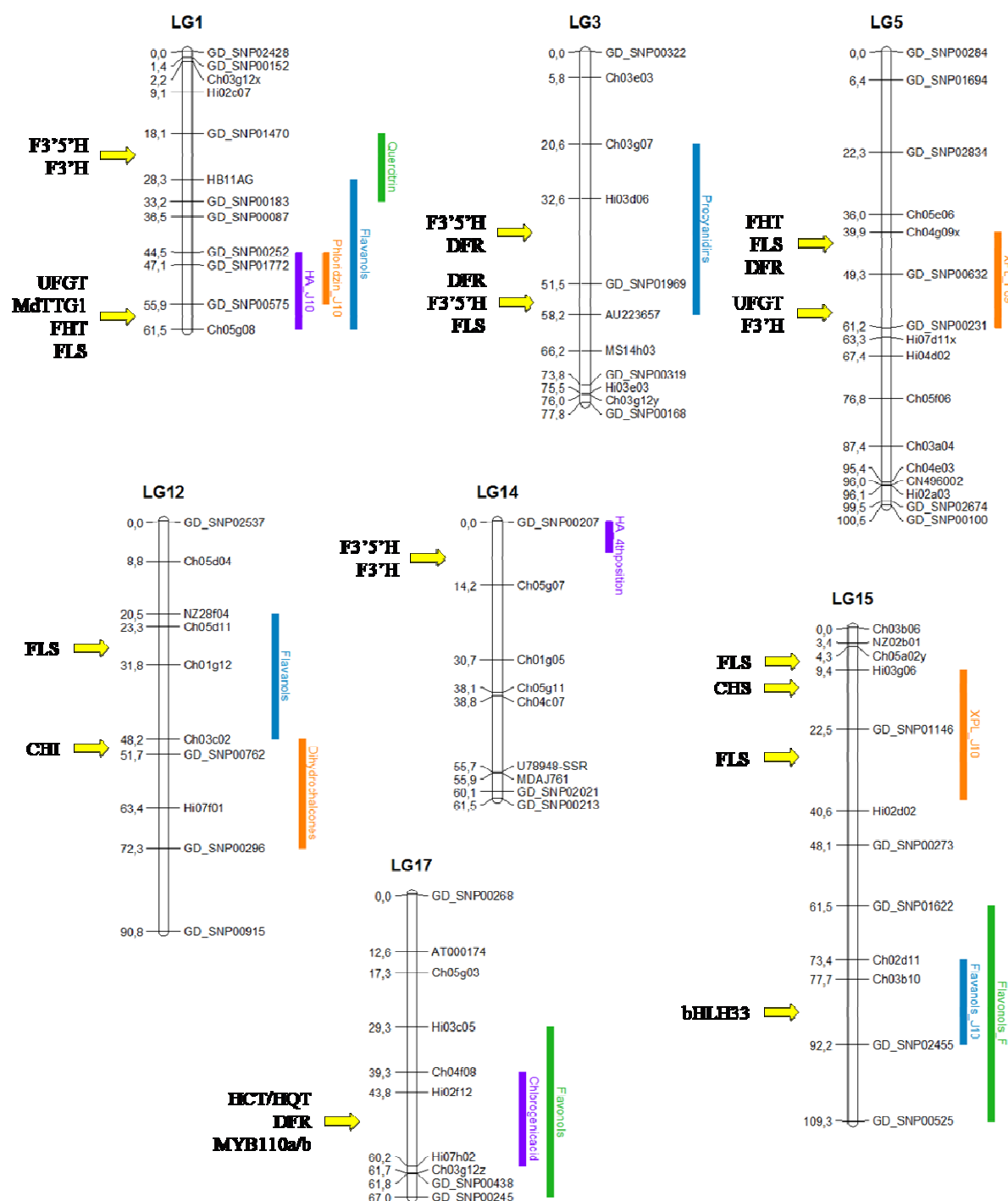


Figure 4. Summary of the quantitative trait loci (QTL) for phenolic compounds in fruit and juice determined in the X5210 x X8402 progeny for the integrated map. QTL obtained for hydroxycinnamic acids (HA), dihydrochalcones, flavanols and flavonols were respectively represented with purple, orange, blue and green bars on the right of the linkage groups (LG). The accuracy of the name of the compound, the material studied and the year means that the QTL was obtained in these specific conditions. Putative candidate genes and their relative position on the map were specified on the left of the LG.

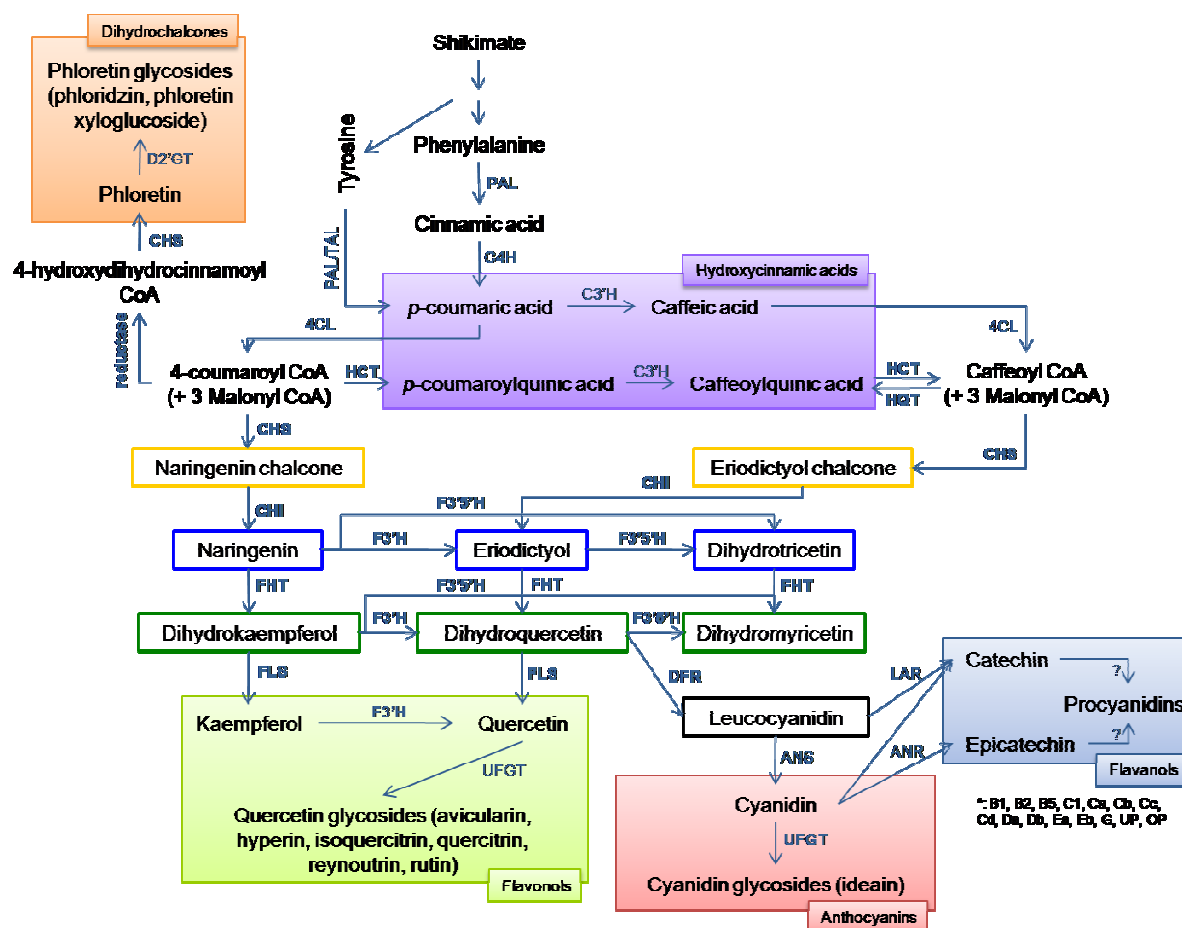


Figure 5. Phenolic compounds biosynthesis (Hoffmann, Besseau et al. 2004; Macheix, Fleuriet et al. 2005; Winkel 2006; Li, Flachowsky et al. 2007; He, Pan et al. 2008; Fowler and Koffas 2009; Gargouri, Manigand et al. 2009; Gosch, Halbwirth et al. 2009) (KEGG, 2012). Chalcones, flavanones and dihydroflavanols were respectively represented with yellow, blue and green frame. In bold, enzymes identified in the confidence interval of QTL. 4CL: 4-coumarate:CoA ligase; ANR: anthocyanidin reductase; ANS: anthocyanidin synthase; C3'H: *p*-coumarate 3'-hydroxylase; C4H: cinnamate 4-hydroxylase; CHI: chalcone isomerase; CHS: chalcone synthase; D2'GT: dihydrochalcone 2-*O*-glucosyltransferase; DFR: dihydroflavanol 4-reductase; F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H: flavonoid 3',5'-hydroxylase; FHT: flavanone 3- β -hydroxylase; FLS: flavonol synthase; HCT: shikimate *O*-hydroxycinnamoyltransferase; HQT: quinate *O*-hydroxycinnamoyltransferase; LAR: leucoanthocyanidin reductase; PAL: phenylalanine ammonia lyase; TAL: tyrosine ammonia lyase; UFGT: UDP-glucose 3-glucosyltransferase.

Tables

Table 1. Broad sense genetic heritability of phenolic compounds quantified in fruit and juice for two harvest years

Heritability	F08^b	F09^b	J09^b	J10^b
(-)-epicatechin	0.96	0.94	0.80	0.61
(+)-catechin	0.97	0.77	0.79	0.79
procyanidin B1	0.98	0.96	0.78	0.79
procyanidin B2	0.95	0.89	0.84	0.93
other procyanidins	0.96	0.92	nd	nd
DP flavanols ^a	0.89	0.96	nd	nd
5-caffeoylquinic acid	0.92	0.95	0.87	0.77
4-caffeoylquinic acid	nd	nd	0.80	0.87
4-p-coumaroylquinic acid	0.96	0.93	0.88	0.80
avicularin	0.58	0.57	0.13	0.59
hyperin	0.60	0.62	0.57	0.39
isoquercitrin	0.80	0.65	nd	nd
quercitrin	0.88	0.74	0.70	0.68
reynoutrin	0.71	0.68	nd	nd
rutin	0.72	nd	0.52	0.56
phloridzin	0.90	0.89	0.83	0.79
phloretin xyloglucoside	0.88	0.92	nd	0.75
ideain	nd	0.77	nd	nd

^a: DP: polymerization degree of flavanols.

^b: nd: not determined.

Table 2. Parameters associated with the quantitative trait loci (QTL) detected in the apple X5210 x X8402 progeny by multiple QTL mapping (MQM) for phenolic compounds in fruits harvested in 2008 (F08) and 2009 (F09) and in juices prepared in 2009 (J09) and 2010 (J10).

Trait ^a	LG	Locus	Position (cM)	LOD ^b	R ^{2c}	Allelic effects ^d	R ² global ^e	A _m ^f	A _f ^g	D ^h	Parent ⁱ
FLAVANOLS											
CAT_J10	15	Ch03b10	77,7	6,32	22,8	ad*;bd*		10,82	1,34	0,52	X8402 X5210
ECAT_J09	12	Ch01g12	31,8	6,47	8,6	ad**		17,45	-15,48	5,38	- X8402 X5210
B2_F08	1	GD_SNP00087	36,5	6,54	25,3	ab**		-0,14	0,08	-0,11	- X8402
B2_J10	1	GD_SNP01772	47,1	7,58	9,8			-51,12	-10,87	-1,26	X8402 X5210
B5_J09	1	GD_SNP00575	55,9	6,42	11	ab***	0.2752	-12,32	1,4	5,92	- X8402 X5210
	3	Hi03d06	32,6	6,64	10	bc***; bd***		6,24	12,18	-0,3	- X8402
B5_J10	1	GD_SNP00087	36,5	12,05	33,3			-2,01	-1,01	1,47	X8402
C1_J09	1	GD_SNP00575	55,9	7,36	14,1	ab***		-9,91	4,6	7,66	X8402
C1_J10	1	GD_SNP00087	36,5	8,24	9	aa*		-12,52	3,29	8,26	X8402
Ca_J10	4	NZ05g08	0	6,22	11,3	ad**	0.3654	-2,83	0,42	-2,85	X8402
	15	Ch03b10	77,7	8,62	16,2	ad*; bc*		4,45	-1	1,12	X8402
Cc_J10	4	NZ05g08	0	5,3	10,2	ad**; bd*	0.3424	-0,95	0,07	-0,76	X8402
	15	Ch03b10	77,7	7,42	15,5	ad*		1,56	-0,07	-0,07	X8402
Da_J10	4	NZ05g08	0	5,51	12,5	ad***; bc*; bd*	0.4134	-1,59	0,05	-2,49	X8402
	15	Ch03b10	77,7	8,84	22,3	ad*; bc**		3,83	-0,72	0,22	X8402
Db_J10	1	GD_SNP00087	36,5	6,41	24			-9,31	-1,15	7,57	X8402
Ea_J10	4	NZ05g08	0	9,72	41,4	ac*; ad***; bc**; bd***	0.4228	-2,46	0,37	-2,98	X8402
	15	Ch03b10	77,7	10,96	41,9	ad**; bc**		2,97	-1,95	0,15	X8402
Eb_J10	1	GD_SNP00087	36,5	5,83	9,2			-1,77	-0,61	1,62	X8402

G_J10	12	Ch01g12	31,8	4,59	12,7	bc*; bd*		-0,48	-3,39	1,61	X5210
UP_J10	1	GD_SNP00183	33,2	9,74	27			-2,51	-0,42	1,07	X8402
245_J10	1	GD_SNP00087	36,5	5,76	12,1	aa***; ab***	0.3829	-5,26	-1,43	1,26	X8402
	15	Ch03b10	77,7	5,57	10,7	ac***; ad***; bc***; bd**		3,81	4,41	1,14	X8402
		GD_SNP00087: Ch03b10				aa:ac***; ab:ac***; aa:ad*; ab:ad*; aa:bc***; ab:bc***; aa:bd**; ab:bd***					
OP_F08	1	GD_SNP01772	47,1	7,2	23,8			-0,81	0,08	0,52	X8402
	12	Ch01g12	31,8	4,3	8,1	ad**		0,54	-0,51	0,14	X8402

HYDROXYCINNAMIC ACIDS

5CQA_F08	17	Hi02f12	43,8	16,96	43,6	ad***; bc***; bd***		0,79	0,8	-0,01	X5210 -
											X8402
5CQA_F09	17	Hi02f12	43,8	9,79	33	ad*; bc**; bd***		0,53	0,52	-0,04	X5210 -
											X8402
5CQA_J09	17	Hi02f12	43,8	22,51	35,9	ad*; bd**		128,41	107,08	-20,42	X5210 -
											X8402
5CQA_J10	1	GD_SNP01772	47,1	7,54	15,4	ab*	0.4073	-86,8	-33,39	95,05	X8402
	17	Hi02f12	43,8	18,35	49,7	ad***; bc***; bd***		193,99	195,36	-10,04	X5210 -
											X8402
4CQA_J10	14	GD_SNP00207	0	15,17	59,9	ab***		-1,26	-2,24	1,41	X5210
4pCoQA_F08	14	GD_SNP00207	0	14,05	50	ab***		-0,17	-0,15	0,18	X5210
4pCoQA_F09	14	GD_SNP00207	0	11,03	41,3	ab***		-0,09	-0,24	0,1	X5210
4pCoQA_J10	14	GD_SNP00207	0	17,23	51,5	aa*; ab***		-20,32	-46,53	20,26	X5210
5pCoQA_J10	1	Ch05g08	61,5	4,95	13,7	ad*; bd**	0.2504	-5,72	-2,01	0,25	X8402
	17	Ch04f08	39,3	5,94	19,1			1,88	6,34	-2,91	X5210 -
											X8402

FLAVONOLS

HY_F08	15	Ch02d11	73,4	5,17	23,8	ab*		-0,01	-0,02	0,01	X5210
QR_F08	1	HB11AG	28,2	5,02	28,2	nd	nd	-0,05	-0,02	-0,03	X8402
	17	GD_SNP00245	67	4,55	18,7			0,03	0,01	0,03	-

QR_J10	1	HB11AG	28,3	8,41	31,7			-5,33	-3,92	1,6	X8402
RE_F08	15	Ch03b10	77,7	6,02	50,9	ad*; bc**;		-0,01	-0,01	0,01	X5210
RE_F09	15	Ch03b10	77,7	6,25	26,6	bd***		0	-0,01	0	X8402
						bc*					X5210
DIHYDROCHALCONES											
PLZ_J10	1	GD_SNP01772	47,1	10,21	28,5			-3,7	-3,61	2,91	X8402
XPL_F08	10	GD_SNP00307	44,7	5,31	20,6	ab*	0.2575	-0,03	0	-0,05	X8402
	12	GD_SNP00762	51,7	5,49	23,9	ab***		0,06	-0,01	0,01	X8402
XPL_F09	5	GD_SNP00632	49,3	4,71	16,3	ab***		-0,07	0	0,01	X8402
XPL_J10	15	GD_SNP01146	22,5	5,98	22,8	ab*		-3,88	9,29	-2,79	-

^a: Abbreviations: see figure 1; F08: fruits harvested in 2008; F09: fruits harvested in 2009; J09: juices prepared in 2009; J10: juices prepared in 2010; nd: not determined value.

^bMaximum logarithm of the odds (LOD) scores value of the QTL.

^cPercentage of the phenotypic variation explained by the QTL.

^dSignificance of the allelic combinations estimated by the global model based on genotypic information from the locus used as co-factor: *, P = 0.1; **, P = 0.05; ***, P = 0.01.

^eVariation explained by all QTLs estimated by the global model.

^fMale additive effect computed as $[(\mu_{ac} + \mu_{bc}) - (\mu_{ad} + \mu_{bd})]/4$, where μ_{ac} , μ_{ad} , μ_{bc} and μ_{bd} are the estimated phenotypic means associated with each of the four possible genotypic classes ac, ad, bc and bd, deriving from an <abxcd> cross.

^gFemale additive effect computed as $[(\mu_{ac} + \mu_{ad}) - (\mu_{bc} + \mu_{bd})]/4$, where μ_{ac} , μ_{ad} , μ_{bc} and μ_{bd} are the estimated phenotypic means associated with each of the four possible genotypic classes ac, ad, bc and bd, deriving from an <abxcd> cross.

^hDominance effect computed as $[(\mu_{ac} + \mu_{bd}) - (\mu_{ad} + \mu_{bc})]/4$, where μ_{ac} , μ_{ad} , μ_{bc} and μ_{bd} are the estimated phenotypic means associated with each of the four possible genotypic classes ac, ad, bc and bd, deriving from an <abxcd> cross.

ⁱ in bolt, parent for which the QTL was obtained at the GW threshold.

Table 3. Candidate genes identified in the interval of 12 clusters of quantitative trait loci (QTL) or meta-QTL using the BLAST2GO software.

Phenolic group	LG	Top marker	Down marker	Number of sequences	Putative gene functions ^a	MDP ^b	Length (bp) ^c	# hits ^d	Min e.Value ^e	sim. Mean (%) ^f	
Hydroxycinnamic acid	14	GD_SNP00207	Ch05g07	1066	F3'H	MDP0000261732	714	20	4.10e ⁻⁷³	82.85	
						MDP0000443803	177	20	7.10e ⁻¹⁴	86.25	
						MDP0000848416	381	20	2.40e ⁻⁴³	89.55	
					F3'5'H	MDP0000285273	1590	20	0	77.5	
						MDP0000308262	1770	20	0	77.05	
						MDP0000153269	197	20	1.5e ⁻¹²	82.25	
	17	Ch04f08	Hi07h02	1438	HCT/HQT	MDP0000261618	348	20	6.5e ⁻²⁶	72.5	
						MDP0000307780	1538	20	0	89.35	
						MDP0000371737	1326	20	0	83.2	
						DFR	MDP0000648997	1515	20	4.80e ⁻¹²⁷	78.9
						MYB110a	MDP0000295218	GenBank accession number EB710109			
						MYB110b	MDP0000317257	GenBank accession number CN993940			
Flavanols	1	GD_SNP00183	Ch05g08	2501	UFGT	MDP0000478252	1452	20	0	79.4	
						MdTTG1	GenBank accession number GU173813				
							F3'H	MDP0000214162	999	20	1.5e ⁻¹⁷⁸
							MDP0000416305	1026	20	0	84.75
						MDP0000657536	453	20	3.7e ⁻⁸⁴	87.35	
					3	Hi03d06	GD_SNP01969	2000	FLS	MDP0000155229	990
	DFR	MDP0000204525	1572	20						0	92.15
		MDP0000265073	1626	20						0	92.3
		MDP0000268045	1020	20					0	92	
		MDP0000729984	978	20					0	92.2	
	F3'5'H	MDP0000630030	1383	20					0	78.05	
		MDP0000780878	408	20					3.4e ⁻²⁴	80.15	
		FLS	MDP0000703138	270					20	2.7e ⁻²⁵	78.4

	12	Ch05d11	Ch01g12	963	FLS	MDP0000390769	270	20	2.7e ⁻²⁵	78.4
						MDP0000041421	1116	20	0	76.65
	15	Ch02d11	GD_SNP02455	1021	MdbHLH33	GenBank accession number DQ266451				
Dihydrochalcones	5	Ch04g09x	GD_SNP00231	1296	UFGT	MDP0000708060	369	20	1.20e ⁻⁶³	83.85
					F3'H	MDP0000692178	1866	20	0	70.55
					FHT	MDP0000515855	1089	20	0	65.1
					DFR	MDP0000414002	921	20	4.40e ⁻¹⁴⁸	77.15
					FLS	MDP0000222546	1500	20	1.50e ⁻²⁹	77.25
						MDP0000515855	1089	20	0	65.1
	12	Ch03c02	Hi07f01	1132	CHI	MDP0000252589	732	20	1.30e ⁻⁹³	88.5
	15	Hi03g06	Hi02d02		CHS	MDP0000287919	1167	20	0	83.7
					FLS	MDP0000159118	258	20	1.90e ⁻¹⁵	81.1
Flavonols	1	GD_SNP01470	GD_SNP00183	658	F3'H	MDP0000140803	1611	20	0	80.35
					F3'5'H	MDP0000675937	2556	20	0	86.85
	15	Ch02d11	GD_SNP02455	1021	MdbHLH33	GenBank accession number DQ266451				

^a: CHI: chalcone isomerase; CHS: chalcone synthase; DFR: dihydroflavanol 4-reductase; F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H: flavonoids 3',5'-hydroxylase; FLS: flavonols synthase; HCT/HQT: shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase; UFGT: UDP-glucose 3-glucosyltransferase.

^b: putative gene annotated on the apple genome browser

^c: longest hits which aligned with the sequence

^d: numbered of alignment achieved

^e: estimator of the quality of the alignment

^f: average percentage of sequence similarity

Discussion générale

Ce chapitre reprend les principaux points de discussion abordés dans les trois chapitres précédents. Une première discussion portera sur l'utilisation à haut débit des méthodes de chromatographie liquide pour le phénotypage d'un grand nombre d'individus. Les différents aspects à prendre en compte lors de l'élaboration de la méthode de dosage seront abordés et une méthode type sera proposée. Un second point portera sur l'influence des méthodes de préparation des jus sur leur teneur en composés phénoliques. Les résultats concernant la variabilité et l'héritabilité de ces composés dans notre descendance de type cidre seront par la suite discutés. Une quatrième partie mettra l'accent sur les principaux QTL obtenus dans notre descendance, en relativisant nos résultats par rapport aux précédents travaux menés sur les descendances de pommes à couteau. Le point suivant portera sur l'identification des gènes candidats réalisée à la suite de la détection de QTL. Cette discussion générale se finira par une ouverture sur l'utilisation potentielle de ces résultats dans le cadre de programmes d'amélioration variétale.

I. Les méthodes de chromatographie liquide pour le phénotypage à haut débit des composés phénoliques

Les méthodes de chromatographie liquide sont les plus adaptées au dosage des composés phénoliques. Elles sont simples à mettre en œuvre et permettent une quantification très précise des composés. En revanche, la plupart des méthodes décrites dans la littérature pour l'analyse des composés phénoliques sont trop longues pour une utilisation à très haut débit. Le temps d'analyse peut toutefois être considérablement réduit, tout en conservant une très bonne résolution, grâce au développement des technologies UHPLC (Ortega, Romero et al. 2010). Les analyses réalisées avec le mode SRM de certains spectromètres de masse permettent également d'augmenter très fortement la résolution des chromatogrammes et ainsi réduire encore davantage les temps d'analyse. Nous avons pu clairement le montrer dans ce travail de thèse. Nos résultats ont cependant montré des surestimations dans les dosages réalisés avec l'un ou l'autre des détecteurs. Nous avons supposé des effets de matrices liés à la co-élution de nos analytes avec d'autres composés du jus de pomme. En LC-UV cela se traduit par le cumul de l'intensité de fluorescence des composés co-élus. L'utilisation du mode SRM en LC-MS permet de limiter au maximum les co-élutions et les effets de matrice associés au niveau du détecteur. En revanche, les composés co-élus au niveau de la source d'ionisation, avant la sélection des ions, peuvent augmenter ou diminuer l'ionisation de l'analyte et modifier sa réponse par rapport à l'analyte pur (Modhave 2012). Il faut donc faire un compromis entre temps d'analyse et risques de co-élutions.

Le choix du détecteur associé à la méthode chromatographique dépend en grande partie du nombre de composés à doser. Si l'objectif est de doser l'ensemble des composés d'un échantillon, il est nécessaire d'avoir une méthode qui permette leur identification. Les méthodes couplées LC-UV-MS/MS sont les plus adaptées. Les spectres UV obtenus avec les détecteurs UV-PDA renseignent sur la nature chimique du composé et constituent une première étape de l'identification. Les détecteurs de masse apportent des informations complémentaires sur la taille des composés, leurs fragments voire même leur formule brute dans le cas des analyseurs très haute résolution (e.g. analyseur à temps de vol, TOF). L'identification formelle peut ensuite se faire par comparaison avec un standard purifié. Cependant, ceux-ci sont généralement chers à l'achat et les composés les plus complexes, comme les procyanidines, ne sont pas disponibles en tant que standards de quantification.

Le mode de quantification désiré (absolu ou relatif) est également déterminant dans le choix du détecteur. Pour une quantification absolue en masse, il est nécessaire d'avoir à disposition tous les standards purifiés correspondant à l'ensemble des composés à doser pour l'élaboration des gammes étalons. En UV, la quantification d'un groupe de composés proches structurellement (λ et ε voisins) peut se faire à l'aide d'un seul standard. Les méthodes de quantification relatives comme celle utilisée par Khan et al. (2012) permet de s'affranchir de l'utilisation des gammes d'étalonnage et donc des standards purifiés. Cela permet de diminuer les temps d'analyse, le temps consacré au traitement des données brutes et le coût de l'analyse tout en augmentant le nombre de composés dosables en masse. En revanche, cette quantification est relative et ne renseigne donc pas directement sur la teneur du composé contenu dans l'échantillon. De plus, l'utilisation de la valeur du TIC (Total Ion Current) ne permet pas de comparer la teneur des différents composés d'un échantillon entre eux puisqu'un composé s'ionisant bien dans les conditions fixées de l'analyse aura une valeur de TIC élevée tandis qu'un composé avec un taux d'ionisation plus faible, même s'il est plus concentré en valeur absolue, pourra avoir une réponse sur le TIC inférieure.

Si l'objectif est de doser seulement les principaux composés présents dans l'échantillon, alors le choix du détecteur associé pour la quantification dépend principalement du nombre d'individus considéré pour la cartographie. Au vu des fortes valeurs d'héritabilité et le QTL obtenus, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont montré que les méthodes de dosage en UV et en masse étaient toutes deux adaptées à la cartographie QTL. Il est à noter toutefois que sur les analyses réalisées sur les jus en 2010, nous observons plus de QTL avec les dosages UV qu'avec ceux réalisés en SRM. Ce plus faible nombre est à mettre en lien avec un plus faible LOD score, n'atteignant pas toujours le LOD seuil LG ou GW. Nous attribuons ces résultats à la moins bonne répétabilité des dosages effectués en SRM par

rapport à ceux en UV. En 2009, le plus grand nombre de QTL obtenus avec cette même technique peut être expliqué par le plus grand nombre d'individus analysés : 224 individus analysés en 2009 et 120 en 2010.

Finalement, le choix d'une méthode de chromatographie liquide pour la quantification des composés phénoliques dépend essentiellement du temps maximum que l'on peut consacrer au phénotypage, du nombre d'individus à phénotyper, du nombre de composés à doser et du type de quantification désiré. Ces choix sont généralement accompagnés d'un certain nombre de compromis et restent en général à l'appréciation du chercheur qui doit également tenir compte du matériel, des moyens financiers et humains qu'il a à disposition.

Les méthodes de quantification développées au cours de cette thèse ont des temps d'analyse beaucoup trop longs pour envisager de les utiliser pour le phénotypage d'un très grand nombre d'échantillons (>1200). En s'appuyant sur l'ensemble des remarques faites précédemment, on pourrait envisager une méthode de dosage des principaux composés phénoliques en UHPLC-MS/MS, avec un temps d'analyse inférieur à 10 min en suivant les conditions chromatographiques décrites dans l'article de Chagné et al. (2012) et en faisant une quantification relative comme celle utilisée par Khan et al. (2012). Les limites de cette méthode seraient alors principalement liées aux effets de matrice pouvant affecter la quantification des composés.

II. Influence des méthodes de préparation sur la teneur en composés phénoliques des jus de pomme

Les pommes à cidre sont généralement plus riches en composés phénoliques que les pommes de table. Leur nature et leur teneur influencent directement la qualité organoleptique des cidres. L'étude d'une descendance de type cidre semblait donc constituer un bon choix pour la cartographie génétique des composés phénoliques. Pour des raisons pratiques et techniques, il n'était pas envisageable de phénotyper directement le produit final (le cidre). Nous nous sommes donc focalisés sur l'analyse des fruits et des jus de pomme. Les conditions de stockage, de broyage/pressage et d'oxydation sont les principales sources de variabilité pouvant affecter la teneur en composés phénoliques des cidres. Nous avons donc essayé de choisir des conditions de préparation des jus proches de celles développées en industrie cidrière (Guyot, Marnet et al. 2003; Nogueira, Guyot et al. 2008).

Les pommes à cidre subissent une période de maturation après récolte avant d'être pressées. Cette période permet généralement le développement des arômes importants pour la qualité des cidres. Le stockage des pommes au froid (1 à 4°C) n'affecte pas leur teneur en composés phénoliques, même s'il dure plusieurs mois (Burda, Oleszek et al. 1990). En revanche, un stockage à température ambiante de quelques jours après cette phase de froid entraîne une modification des profils phénoliques (Perez-Illarbe, Hernandez et al. 1997; Awad and de Jager 2000; MacLean, Murr et al. 2006). Dans le cadre de cette thèse, les fruits ont été conservés en chambre froide entre deux et sept jours puis sont restés à température ambiante entre 2 et 9h avant d'être broyés.

Traditionnellement les pommes à cidre sont râpées puis pressées pour obtenir le jus. Une étape de traitement enzymatique peut également avoir lieu avant le pressage pour hydrolyser les parois cellulaires (Grimi, Mamouni et al. 2011). Des essais ont été réalisés au cours de ma thèse avec un broyeur mécanique et une presse semblables à ceux utilisés en industrie (mais de tailles plus réduites) disponibles à l'Unité de Recherches Cidricoles (URC) de l'INRA du Rheu. Cependant, ces appareils n'étaient pas adaptés à la faible quantité de fruits que nous avons à disposition. Le temps de traitement d'un échantillon était également relativement long et le risque d'oxydation des composés phénoliques plus difficile à contrôler. Nous avons donc choisi de préparer nos échantillons de jus avec une centrifugeuse, plus adaptée à nos échantillons. Cependant, des essais antérieurs réalisés à l'URC ont montré qu'il pouvait y avoir une meilleure extractabilité des flavonols de la peau avec une centrifugeuse qu'avec les méthodes de pressage (communication personnelle_S. Guyot). Les résultats obtenus dans notre étude pour les flavonols semblent confirmer ces observations. En effet, les taux d'extraction calculés dans notre étude sont plus élevés (18%) que ceux estimés précédemment pour des jus préparés par pressage (environ 10%) (Price, Prosser et al. 1999). Ils restent toutefois faibles et l'isoquercitrine et la reynoutrine n'ont pas pu être dosées dans les jus. Les dihydrochalcones ont un rendement d'extraction beaucoup plus faible dans notre étude que celui déterminé précédemment (Guyot, Marnet et al. 2003) : 80% au lieu de 30% dans notre étude. Cependant, l'étude de Guyot et al. (2003) n'a considéré que la chair du fruit alors que la peau, prise en compte dans notre étude, est très riche en dihydrochalcones (Guyot, Marnet et al. 1998; Alonso-Salces, Barranco et al. 2004; Khanizadeh, Tsao et al. 2008). Les rendements d'extraction calculés précédemment ont donc été probablement surestimés. Pour les acides hydroxycinnamiques et les flavanols, les rendements d'extraction calculés dans notre étude sont comparables avec les données de la littérature (Guyot, Marnet et al. 2003). Les acides hydroxycinnamiques ont les rendements d'extraction les plus élevés, suivis des monomères de flavanols et des procyanidines. La rétention des procyanidines dans le moût est liée à leur propriété tannante qui les associe

fortement aux composants de la paroi cellulaire (Renard, Baron et al. 2001). Cependant, la procyanidine B2 a un rendement d'extraction significativement supérieur à celui des deux monomères, catéchine et épicatechine. Ce résultat peut s'expliquer par la plus grande hydrophobicité des deux monomères par rapport à la procyanidine B2 (Zanchi, Konarev et al. 2009) et de sa faible capacité tannante, compte tenu de son faible degré de polymérisation (De Freitas and Mateus 2002). Pour les deux composés faiblement concentrés, avicularine et procyanidine B1, les rendements d'extraction moyens sont particulièrement élevés (respectivement 89,9% et 67,1%). Les études présentées dans le premier chapitre de cette thèse ont mis en évidence une surestimation de l'avicularine avec la méthode de dosage en UHPLC-MS/MS qui pourrait expliquer ce résultat. Il sera donc nécessaire de mesurer précisément cette surestimation afin de pouvoir appliquer un facteur correctif sur nos données.

L'oxydation des composés phénoliques au moment du broyage est une étape qui détermine leur teneur finale dans les jus (Guyot, Marnet et al. 2003; Renard, Le Quere et al. 2011). Elle est généralement associée à l'activité de la polyphénoloxydase (PPO) qui en présence d'oxygène transforme principalement les acides hydroxycinnamiques en O-quinones. Les O-quinones peuvent à leur tour oxyder les autres composés phénoliques (Vaughn, Lax et al. 1988; Kim, Seo et al. 2001). En industrie, la très grande quantité de fruits pressés limite l'oxydation des polyphénols en limitant le contact avec l'air. Des méthodes peuvent également être employées pour réduire encore davantage cette oxydation comme la pasteurisation (Spanos, Wrolstad et al. 1990), les micro-ondes (Matsui, Granado et al. 2007) ou la PEF (Schilling, Schmid et al. 2008). Pour limiter l'oxydation des composés phénoliques des jus préparés au cours de cette thèse, du fluorure de sodium a été ajouté pour inactiver la PPO (Ding, Chachin et al. 1998).

III. Variabilité et héritabilité des composés phénoliques au sein de la descendance cidre

La variabilité observée dans notre descendance est importante et représentative d'un grand nombre de variétés de pommes à cidre cultivées en Europe. Que ce soit pour les fruits ou les jus, le groupe ayant la plus grande variabilité dans la descendance est celui des acides hydroxycinnamiques avec un rapport de 23 dans les fruits et de 13 dans les jus. Cette variabilité peut s'expliquer par l'origine des parents utilisés pour ce croisement, l'un issu de la variété à cidre 'Kermerrien' et l'autre étant un hybride de type pomme à couteau. Le parent mâle analysé en 2010 se situe dans la moyenne de la population pour les acides hydroxycinnamiques et les monomères de flavanols (Annexes IV). Il est en revanche peu

concentré en procyanidines et dihydrochalcones et se place plutôt dans la moitié haute de la descendance pour les flavonols. Le parent femelle issu de la variété 'Kermerrien' n'a pas pu être analysé à cause de l'absence de fructification.

La variabilité observée dans notre descendance est comparable à celle obtenue dans la descendance de pommes de table étudiée par l'équipe de Chagné (2012) pour l'acide 4-p-coumaroylquinique et la reynoutrine et est supérieure pour l'isoquercitrine et la quercitrine. En revanche, la variabilité observée dans notre descendance semble plus faible pour les autres composés, notamment les flavanols. Les valeurs maximales observées dans notre descendance sont plus élevées que celles de la descendance de pommes de table mais leurs valeurs minimales sont en revanche beaucoup plus basses, aussi bien dans la peau que dans la chair.

Les héritabilités calculées dans cette étude reflètent plus la répétabilité des analyses qu'une héritabilité au sens propre du terme puisque les arbres de la descendance ne sont présents qu'en une seule copie sur la parcelle. « L'héritabilité/répétabilité » est en fait calculée à partir de trois échantillons pris sur le même arbre. Il convient donc de ne pas interpréter directement les valeurs absolues ; ces données permettent toutefois d'avoir une idée de la part des effets génétiques sur l'expression des caractères et permettent la comparaison entre conditions et composés. Globalement, les valeurs d'héritabilité sont fortes avec quelques exceptions pour certains flavonols (avicularine, hypérine et rutine). On note également des valeurs plus fortes pour les composés du fruit par rapport au jus. Ces résultats peuvent s'expliquer par les modifications subies par le jus par rapport au fruit entier, notamment liés à la rétention d'une partie d'entre eux dans le moût. Les flavonols ont les héritabilités les plus faibles, aussi bien dans les fruits que dans les jus. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Volz et McGhie (2011) qui ont montré un fort impact de l'environnement (notamment la lumière et la température) sur la teneur en flavonols des pommes.

IV. Spécificité des pommes à cidre

Les pommes à couteau et à cidre se distinguent par de nombreux critères, dont la saveur des fruits. Pour certaines variétés à cidre, l'amertume et l'astringence des fruits peuvent être particulièrement marquées. Ces caractères organoleptiques sont directement influencés par la teneur en tanins, qui selon leur degré de polymérisation affecte plutôt l'amertume ou l'astringence des fruits (Lea and Arnold 1978). L'implication des dihydrochalcones dans

l'amertume n'a pas été clairement établi à ma connaissance mais plusieurs études ont mis en évidence une plus forte teneur en dihydrochalcones dans les variétés amères ou douces-amères, notamment la variété 'Kermerrien' (Sanoner, Guyot et al. 1999; Alonso-Salces, Barranco et al. 2004). D'autres paramètres comme la couleur ou les arômes des cidres sont également liés à la teneur en composés phénoliques des pommes.

Les parents de la descendance étudiée ont été sélectionnés pour les caractéristiques cidrières du parent femelle (X5210) et pour la résistance aux maladies du parent mâle (X8402). L'un des parents de X5210 est la variété cidre 'Kermerrien', très utilisée dans les programmes d'amélioration des variétés à cidre menées par l'INRA et l'IFPC. Les autres grands-parents sont des hybrides de type pommes à couteau. Cette descendance a été étudiée dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique réalisé conjointement par l'INRA et l'IFPC, financé pendant cinq ans par le projet interrégional INNOVACIDRE. Les études ont montré une ségrégation des principaux caractères d'intérêt pour la sélection des variétés de pommes à cidre et certains individus seront utilisés comme géniteurs dans les prochains cycles du programme d'amélioration variétale.

La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus dans les études précédentes sur pommes de table a montré des différences importantes en terme de localisation des QTL détectés pour certains composés phénoliques (Chagne, Krieger et al. 2012; Khan, Chibon et al. 2012). Cinq régions majeures ont été détectées pour les flavanols sur les groupes de liaison (GL)1, GL3, GL4, GL12 et GL15 et cinq autres pour les dihydrochalcones sur les GL1, GL5, GL10, GL12 et GL15 spécifiquement dans la descendance cidre pour les fruits et/ou les jus de pomme. Dans les deux descendances de pommes de table, un QTL majeur a été détecté pour les flavanols sur le GL16. Pour les dihydrochalcones, l'équipe de Khan et al. (2012) reporte la détection de deux QTL pour la phloridzine dosée dans la peau (GL16) et dans la chair (GL15). Ce dernier QTL pourrait correspondre à celui que nous avons détecté pour la phlorétine xyloglucoside dans les jus. Aucun QTL n'a été présenté dans l'étude de Chagné et al. (2012) pour les dihydrochalcones.

L'hypothèse que nous avons faite au départ pour expliquer les différences observées entre ces descendances étaient l'implication de ces composés dans les caractères d'amertume et d'astreingence, recherchés pour les variétés à cidre mais contre sélectionnés pour les variétés de table. Cependant, l'étude des cartes parentales a montré que les QTL pour la teneur en flavanols étaient répartis également entre les deux parents, tandis que ceux pour les dihydrochalcones étaient principalement détectés sur la carte mâle, parent de type pomme à couteau. Cette hypothèse est donc en partie remise en question. Il est en effet difficile de généraliser nos résultats à l'ensemble des variétés à cidres puisque nous n'avons étudié ici qu'une descendance, représentative d'une faible part de la variabilité génétique

existante au sein des pommes à cidre. Il serait donc intéressant de poursuivre notre étude par des méthodes de génétique d'association sur un ensemble de variétés de pommes à cidre et à couteau pour le caractère de teneur en composés phénoliques. La core collection de pommes de table développée dans le cadre du projet FruitBreedomics et les collections de variétés à cidre disponibles à l'INRA d'Angers pourraient être utilisées pour déterminer précisément les QTL associés aux variétés de pommes à cidre et ceux associés aux variétés de pommes de table.

V. Identification des gènes candidats

L'identification des gènes candidats sous-jacents aux QTL détectés pour la teneur des différents composés phénoliques a été réalisée *in silico*, en ciblant les enzymes de la voie de biosynthèse des composés phénoliques (Figure 14) et les quatre facteurs de transcription (MdMYB1/MdMYBA/MdMYB10, bHLH3, bHLH33 et MdTTG1) caractérisés chez le pommier pour leur rôle régulateur dans la voie de biosynthèse des anthocyanes (Takos, Jaffe et al. 2006; Ban, Honda et al. 2007; Espley, Hellens et al. 2007; An, Tian et al. 2012). Concernant la colocalisation gènes candidats-QTL, trois situations sont rencontrées : i) colocalisation avec les facteurs de transcription, ii) avec les enzymes directement liées à la synthèse du composé considéré et ayant un effet positif ou négatif sur sa synthèse et enfin iii) avec des enzymes beaucoup plus en amont de la voie de biosynthèse du composé considéré.

Les deux facteurs de transcription MdTTG1 et bHLH33 ont été localisés au niveau des deux régions portant le plus grand nombre de QTL, détectés pour des composés de classes chimiques différentes (respectivement sur le GL1 et GL15). Ces facteurs de transcription pourraient donc être impliqués plus largement dans la régulation de plusieurs enzymes de biosynthèse en plus de la régulation des anthocyanes. Nous pouvons noter le très grand nombre de QTL obtenus pour tous les caractères étudiés dans la région du gène de résistance majeur à la tavelure : *Vf*. Ces résultats doivent être considérés avec précaution puisque cette région est connue pour être très souvent détectée lors des détections de QTL réalisées sur des caractères très différents comme la résistance à la tavelure (Calenge, Faure et al. 2004), la texture du fruit (Longhi, Moretto et al. 2012), l'alternance de production (Guitton, Kelner et al. 2012), le débourrement végétatif (Celton, Martinez et al. 2011) ou l'architecture de l'arbre (Segura, Durel et al. 2009). Dans notre cas, la descendance étudiée a été sélectionnée au stade juvénile pour la résistance à la tavelure, (gène majeur *Vf*). Cette sélection entraîne d'importantes distorsions dans les cartes génétiques utilisées pour la détection de QTL au niveau de la région de *Vf*, qui peuvent biaiser les détections.

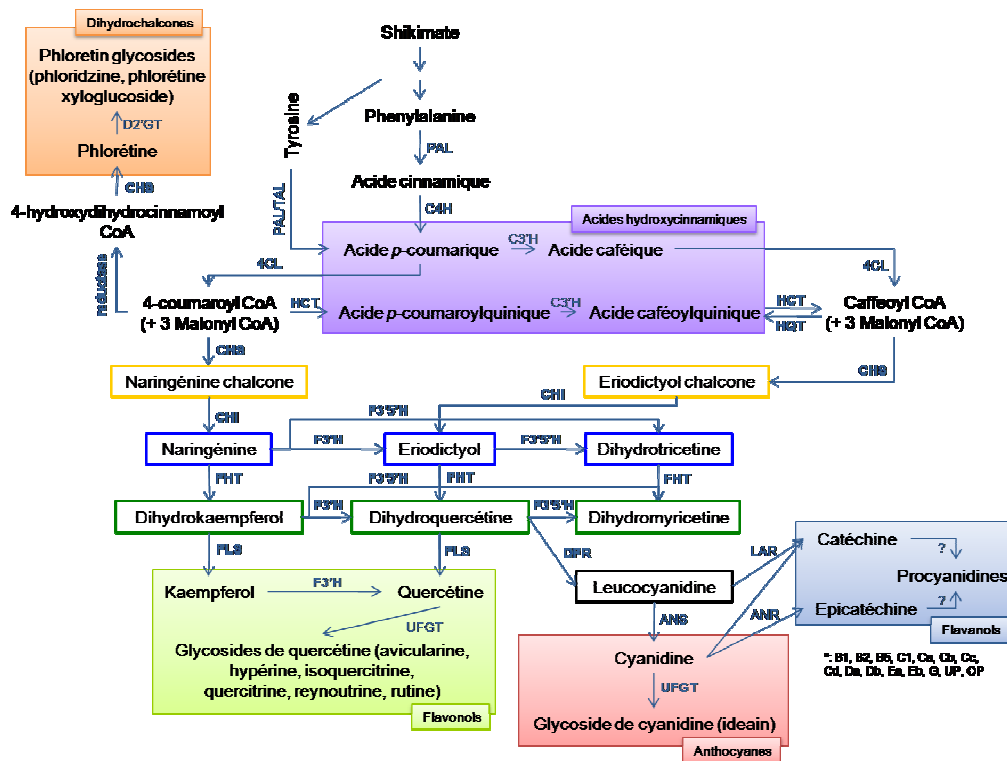


Figure 28. Voie de biosynthèse des principaux composés phénoliques dosés dans la pomme et le jus de pomme (Hoffmann, Besseau et al. 2004; Macheix, Fleuriet et al. 2005; Winkel 2006; Li, Flachowsky et al. 2007; He, Pan et al. 2008; Fowler and Koffas 2009; Gargouri, Manigand et al. 2009; Gosch, Halbwirth et al. 2009) (KEGG, 2012). Les chalcones, flavanones et dihydroflavanols sont respectivement encadrées en jaune, bleu et vert foncé. Les enzymes indiquées en gras ont été identifiées dans les intervalles de confiance des QTL. 4CL: 4-coumarate:CoA ligase; ANR: anthocyanidin reductase; ANS: anthocyanidin synthase; C3'H: p-coumarate 3'-hydroxylase; C4H: cinnamate 4-hydroxylase; CHI: chalcone isomerase; CHS: chalcone synthase; D2'GT: dihydrochalcone 2-O-glucosyltransferase; DFR: dihydroflavanol 4-reductase; F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H: flavonoids 3',5'-hydroxylase; FHT: flavanone 3- β -hydroxylase; FLS: flavonol synthase; HCT: shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase; HQT: quinate O-hydroxycinnamoyltransferase; LAR: leucoanthocyanidin reductase; PAL: phenylalanine ammonia-lyase; TAL: tyrosin ammonia-lyase; UFGT: UDP-glucose 3-glucosyltransferase.

Des enzymes directement et positivement impliqués dans la synthèse des composés phénoliques ont été identifiés pour plusieurs QTL. C'est le cas notamment des F3'H et F3'5'H identifiées pour la quercitrine du GL1, la CHS pour la phloretin xyloglucoside du LG15 et les HCT/HQT pour l'acide 5-caféoylquinique du GL17 (Figure 14). A l'inverse, le gène codant pour l'UFGT identifié sur le bas du GL1 pour les flavanols aurait un effet négatif puisque cette enzyme catalyse la formation des glycosides de cyanidines à partir des cyanidines, également substrat de l'enzyme ANR qui catalyse la formation des monomères de flavanols (Figure 14). Le lien étroit entre ces deux groupes de composés (flavanols et anthocyanes) a, par ailleurs, été mis en évidence dans les études de transgénèse visant à

sur exprimer l'enzyme ANR ou « silencer » l'ANS (Szankowski, Flachowsky et al. 2009; Han, Vimolmangkang et al. 2012).

Pour les autres QTL, les gènes codant des DFR, F3'H, F3'5'H, FHT et FLS ont été identifiés dans les intervalles de confiance. Ces enzymes interviennent beaucoup plus en amont dans la biosynthèse des composés phénoliques et on s'attendait à la colocalisation de QTL détectés pour tous les composés positionnés en aval de ces enzymes. Cependant, les enzymes de biosynthèse peuvent avoir des spécificités de substrat plus ou moins importantes, qui leur permettent de synthétiser certains composés en particulier (Li, Qiu et al. 2012). Par ailleurs, les études de transgénèse menées par les équipes de Han (2012), Flachowsky (2012) et Szankowski (2009) ont mis en évidence un système de régulation beaucoup plus complexe que celui généralement supposé pour cette voie de biosynthèse avec une auto-régulation des niveaux de transcription et/ou de l'activité enzymatique des autres enzymes de biosynthèse lors de la surexpression ou du silencing des enzymes ANR, F3'H et ANS.

Les conclusions présentées dans cette partie sont basées uniquement sur l'identification *in silico* de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse des composés phénoliques. L'étude a été ciblée sur un nombre restreint de gènes, en réduisant les intervalles de confiance par méta-analyse. Nous avons donc très certainement laissé échapper des gènes d'intérêt comme les autres facteurs de transcription impliqués dans la régulation des enzymes de biosynthèse, les gènes codant les petits ARN régulateurs (miARN) et tout autre gène pouvant affecter l'activité catalytique des enzymes de biosynthèse (régulation du pH cellulaire...) ou la stabilité des composés phénoliques dans la cellule (transporteur membranaire...). Cependant, cette première étude a déjà permis de mettre en évidence un grand nombre de gènes candidats pour la plupart des QTL majeurs. Ce grand nombre de candidats est d'ailleurs assez surprenant et il serait nécessaire de les valider ultérieurement. Les approches de séquençage, de PCR quantitative ou, dans le meilleur des cas, de transgénèse pourraient déterminer/confirmer leur implication dans la synthèse de ces composés. La détection de QTL basée sur le niveau d'expression de ces enzymes (eQTL) pourrait également être une approche intéressante pour les valider.

VI. Utilisation en sélection variétale

Cette étude a permis de détecter des QTL intéressants pour la synthèse des acides hydroxycinnamiques (GL14 et GL17) et des flavanols (GL12) en vue d'une utilisation en sélection. Les acides hydroxycinnamiques sont décrits pour avoir une part importante dans le brunissement des jus de pomme et le potentiel aromatique des cidres, tandis que les

flavanols sont principalement impliqués dans les sensations d'amertume et d'astringence. Nous avons choisi les QTL des GL12, GL14 et GL17 car ils expliquaient une grande part de la variabilité phénotypique (notamment pour les acides hydroxycinnamiques), pour leur stabilité quelque soit le support (fruit/jus) ou l'année de récolte mais également pour leur effet additif qui les rend particulièrement intéressant en sélection. Pour pouvoir les utiliser dans le programme de sélection, il serait toutefois nécessaire de réaliser une cartographie plus fine de ces régions d'intérêt en densifiant le nombre de marqueurs.

Le développement récent des méthodes de génotypage très haut débit liées au séquençage du génome du pommier laisse entrevoir de nouvelles méthodes d'analyse génétique applicables à la sélection. Les approches de sélection génomique largement utilisées chez les animaux sont actuellement en cours de développement chez le pommier (Kumar, Chagne et al. 2012). Les méthodes de sélection assistée par marqueurs pourraient être utilisées pour la sélection des gènes et QTL majeurs (comme les QTL détectés sur les GL12, GL14 et GL17 cités précédemment) et les méthodes de sélection génomique pourraient être développés pour les autres caractères. Ces approches pourraient être développées pour la sélection de nouvelles variétés de pomme à cidre, plus résistantes aux principaux agents pathogènes, plus régulières dans leur production et avec de bonnes qualités cidrières, après avoir vérifié leur efficacité et évalué leur coût.

Conclusion générale

Ce travail de thèse mené en collaboration entre le laboratoire SONAS de l'Université d'Angers et l'IRHS de l'INRA d'Angers-Nantes a eu pour objectif principal d'appréhender les fondements génétiques impliqués dans la teneur des composés phénoliques de la pomme à partir d'une descendance de pommiers à cidre. Ces composés, très concentrés dans le fruit, ont un rôle déterminant dans la qualité organoleptique des cidres et dans la protection contre certaines maladies cardiovasculaires et certains cancers. L'évolution des technologies de séquençage et de génotypage permettent aujourd'hui de développer des études génétiques sur un très grand nombre d'individus et de prendre en compte une très grande variabilité. En revanche le phénotypage des individus reste le point critique de ces études et reste souvent long, laborieux et coûteux.

Les méthodes de chromatographie en UHPLC permettent de réduire considérablement les temps d'analyse et d'améliorer la résolution des chromatogrammes par rapport aux méthodes d'HPLC. Les deux méthodes développées en UHPLC-UV et UHPLC-MS/MS au cours de cette thèse ont notamment permis de diviser les temps d'analyse par quatre. Elles ont été validées séparément en estimant les limites de détection et de quantification, la linéarité, le recouvrement et la précision. Les 120 échantillons de jus de pomme analysés en triplicata ont montré une très bonne corrélation entre ces deux méthodes pour la majorité des composés. Malgré la bonne résolution des chromatogrammes, cinq composés sont toutefois surestimés avec l'une ou l'autre. Ces surestimations n'affectent cependant pas leur utilisation pour la cartographie génétique.

Les échantillons analysés au cours de cette thèse ont été récoltés dans les vergers plantés à l'INRA d'Angers. Les analyses sur fruit entier ont été réalisées à l'URC de l'INRA de Rennes et celles sur le jus ont été réalisées à Angers (laboratoire SONAS et UMR IRHS). La variabilité observée dans notre descendance est représentative de celle des principales variétés cultivées en Europe, aussi bien pour les fruits que pour les jus. Les profils observés dans les fruits et les jus sont similaires. Le composé le plus concentré est l'acide chlorogénique et le moins concentré, la rutine. Le rendement d'extraction des composés phénoliques dans nos conditions de préparation des jus est très élevé pour les acides hydroxycinnamiques et relativement faible pour les flavonols et les anthocyanes. L'héritabilité au sens large calculée pour ces composés est très élevée dans les fruits et globalement plus faible dans les jus.

La cartographie de QTL réalisée pour cette descendance a mis en évidence plusieurs régions localisées principalement sur neuf groupes de liaison (GL). Certaines régions ont été détectées pour plusieurs groupes de composés (GL1 et GL15) tandis que d'autres sont beaucoup plus spécifiques (GL5, GL10 et GL15 pour la phlorétine xyloglucoside). Des régions spécifiques ont été mises en évidence entre pommes à cidre et pommes de table, principalement pour les flavanols et les dihydrochalcones. L'implication de ces composés dans les caractères d'amertume et d'astringence, appréciés pour les pommes à cidre et dépréciés pour les pommes de table, pourrait expliquer ces différences.

Ces résultats ne tiennent compte que d'une part limitée de la variabilité génétique existante et il serait intéressant de poursuivre ces études sur une plus large variabilité pour confirmer ces hypothèses. L'expertise acquise à l'IRHS en matière de structuration de la diversité génétique et de génétique d'association ainsi que les données de génotypage acquises sur les collections de pommes à cidre et à couteau pourraient servir à l'étude des composés phénoliques.

La connaissance de la séquence du génome du pommier nous a permis de reporter les intervalles de confiance de nos QTL majeurs sur la carte physique afin d'extraire l'ensemble des gènes sous-jacents. Leur fonction potentielle a été estimée *in silico* et la recherche a été ciblée sur les enzymes de biosynthèse et les facteurs de transcription identifiés chez le pommier. Les deux régions généralistes (GL1 et GL15) colocalisent avec les facteurs de transcription tandis que les autres régions ont dans leur intervalle de confiance des gènes directement liés à la synthèse du composé ou plus en amont dans la biosynthèse.

Ces gènes devront par la suite être validés par QRT-PCR, séquençage et transgénèse.

Les QTL mis en évidence sur les GL12, GL14 et GL17 pour les flavanols et les acides hydroxycinnamiques pourraient servir à la sélection assistée par marqueurs. Pour les caractères plus complexes, la sélection génomique pourrait également être développée pour la sélection de nouvelles variétés de pommes à cidre durablement résistantes, moins alternantes et avec de bonnes qualités cidrières.

Annexes

Table des Annexes

Annexe I. Phenolic compounds in apple juices – Method of quantification by UHPLC-UV and by UHPLC-MS/MS. Poster présenté lors du XXVIth International Conference on Polyphenols qui s'est tenu à Florence (Italie) du 22 au 26 juillet 2012.

Annexe II. Méthode UHPLC-MS/MS développées pour le dosage des composés phénoliques dans les jus préparés en 2009.

Annexe III. Identification des composés phénoliques du jus de pomme.

Annexe IV. Distribution des données phénotypiques.

Annexe V. QTL mapping and candidate gene research for the phenolic content of fruits and juices prepared from a cider apple progeny. Poster présenté lors du Sixth Rosaceous Genomics Conference qui s'est tenu à San Michele all'Adige (Italie) du 30 septembre au 4 octobre 2012.

Annexe VI. Cartes génétiques mâle, femelle et intégrée développées pour la descendance X5210 x 8402 à l'aide de marqueurs SSR et SNP.

Phenolic compounds in apple juices – Method of quantification by UHPLC-UV and by UHPLC-MS/MS

Cindy F. Verdu^{1,2*}, Julia Gatto¹, Ingrid Freuze³, Pascal Richomme¹, François Laurens² and David Guilet¹

¹Université d'Angers, SONAS EA 921, SFR 149 Quasav, Angers, France; ²INRA, UMR1345 IRHS, SFR 149 Quasav, Beaucouzé, France; ³Université d'Angers, PIAM, Angers, France.

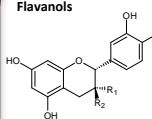
*Corresponding author: verdu@angers.inra.fr



Introduction: Cider is produced and consumed essentially in Europe and Canada. Astringency, bitterness, color and aroma of cider are traits related to the nature and the content in phenolic compounds [1-3]. The beneficial properties associated with apple and cider consumption is generally linked to the high antioxidant potential of these compounds. For this reason, a great number of studies are focused on identification and quantification of phenolic compounds in apple, apple juice or cider. However, no genetic study was available for phenolic contents in cider apple, only two teams having published their work about QTL detection in two dessert apple progenies [4-5]. The first one used a UHPLC-UV method and the second one a HPLC-MS method to separate and quantify phenolic compounds. The UHPLC system allows a reduced analysis time and an increased resolution when compared with the HPLC system [6]. The UV detector allows a good repeatability whereas the mass spectrometer allows a higher sensibility and selectivity, particularly when used in the selected reaction monitoring (SRM) mode. Generally, both spectrometers are equivalent but significant differences have already been reported when comparing the phenolic compound quantifications obtained with the HPLC-UV or HPLC-MS methods. Co-elution and matrix effects are often described to be responsible for them. The aim of this work was to develop two methods in UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS to separate and quantify major phenolic compounds in apple juice and usable for a further genetic study on cider apple. The content of each phenolic compounds obtained for 120 cider progenies with both methods were then compared.

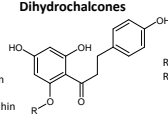
Phenolic compounds quantified in apple juice

Flavanols



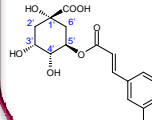
Monomers:
R₁=OH; R₂=H: (-)-epicatechin
R₁=H; R₂=OH: (+)-catechin
Procyanidins:
B1: epicatechin-(4β→8)-catechin
B2: epicatechin-(4β→8)-epicatechin
B5: epicatechin-(4β→6)-catechin
C1: [epicatechin-(4β→8)]₂-epicatechin

Dihydrochalcones



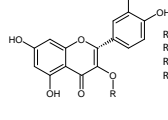
R=glucose: Phloridzin
R=glucose-xylose: Phloretin xyloglucoside

Hydroxycinnamic acids



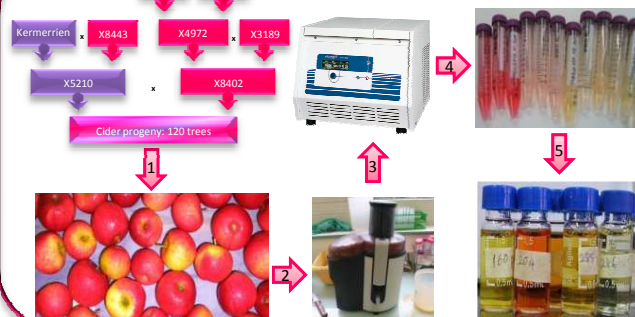
5' position:
R=OH: 5-caffeoylquinic acid
4' position:
R=H: 4-p-coumaroylquinic acid
R=OH: 4-caffeoylquinic acid

Flavonols



R=arabinose: Avicularin
R=galactose: Hyperoside
R=rhamnose: Quercitrin
R=rutinoside: Rutin

Plant material: Florina x Prima Apple juice preparation



1. Harvest of 1 Kg of fruits per tree at the mature stage "50% of fallen fruit" and division into 3 batches
 2. Coring and grinding apples with skin and addition of sodium fluoride in juice
 3. Centrifugation
 4. Recovery of clear apple juice
 5. Addition of 1 volume of acidified methanol
- Storage of juices at -80°C before chromatographic analyses

Validation tests for both methods:

Limits of Detection (LOD) and Quantification (LOQ): determined by the signal to noise ratio of 3 and 10 respectively

Linearity: determined by the injection of 10 volumes of the standard working solution (SWS) in 5 replicates taking into account the residual distributions

Recovery: determined by the recovery percent between an apple juice and the same apple juice added with 100µL of the SWS

$$\text{Rec.} = \frac{(\text{amount}_{\text{juice}} + \text{amount}_{\text{added}}) - \text{amount}_{\text{measured}}}{\text{amount}_{\text{added}}} * 100$$

Precision: expressed by RSD% for intra- (5 replicates one day) and inter-day (3 replicates in 3 different days) variations

UHPLC-UV method

The UV experiments were performed with a Thermo Accela PDA Detector. Hydroxycinnamic acids were detected at 320 nm and dihydrochalcones, flavonols and flavanols were detected at 280 nm.

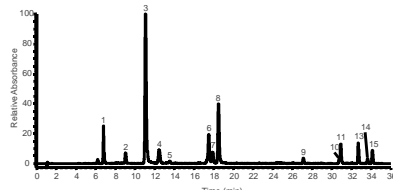


Figure 1. Total Ion Current (TIC) chromatogram at 280 nm.

	LOD (ng)	LOQ (ng)	Linearity (r ²)	Recovery %	Intra-day RSD %	Inter-day RSD %
Min	0.3	0.5	0.99	94.3	1.3	2.6
Max	1	6.7	0.9999	110.4	5.3	11.6

Table 1. Validation test results for the UHPLC-UV method for all compounds except the rutin which could not be detected in UV.

UHPLC-MS/MS method

The MS experiments were performed with a Thermo TSQ quantum access max equipped with an electrospray interface (ESI) operating in negative ionization mode. The Selective Reaction Monitoring (SRM) mode was used to quantify phenolic compounds.

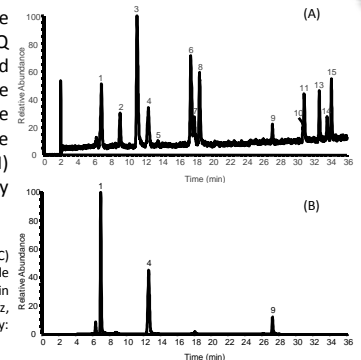


Figure 2. Total Ion Current (TIC) chromatogram in ESI(-) (A) and Single Reaction Monitoring (SRM) chromatogram in ESI(-) for procyanidin B. Parent ion: 577 m/z, fragment ion: 289 m/z and collision energy: 16 V (B).

	LOD (ng)	LOQ (ng)	Linearity (r ²)	Recovery %	Intra-day RSD %	Inter-day RSD %
Min	0.003	0.007	0.9893	91.2	2.3	3
Max	2	6.7	0.9991	113.3	6.8	10.7

Table 2. Validation test results for the UHPLC-MS/MS method for all compounds.

Analyze of 120 different apple juices and comparison between the two methods

120 hybrids were used to prepare apple juices which were analyzed in triplicate with the two methods.

The major compound of apple juice is chlorogenic acid with concentrations comprised between 97.23 and 741.1 µg/mL of apple juice. Procyanidin B2 is the second major compound with concentrations comprised between 76.2 and 355.7 µg/mL. The less concentrated compound is rutin with a concentration comprised between 0.16 and 1.75 µg/mL.

The 2 quantification results were then compared for 12 phenolic compounds quantified with the 2 methods (example for procyanidin B1 and phloretin xyloglucoside on the Figure 3).

All compounds have shown a high correlation coefficient comprised between 0.86 and 0.99.

The slopes of the linear regression obtained were comprised between 0.47 and 1.32.

For the chlorogenic acid (slope value 1.34) a co-elution with another compound could explain the overestimation of its quantification with the UV detector as suggested by Caporossi and collaborators (2010, [7]).

For the epicatechin, 4-p-coumaroylquinic acid, quercitrin and avicularin, the low slop values (0.63, 0.65, 0.78, 0.47 respectively) show an overestimation with the mass detector (or an underestimation with the UV detector). This has already been reported by another team, but no satisfactory explanation was found [8-9]. It could be a matrix effect that reduce the masse response in apple juice compared to standards. Further studies are needed to validate this hypothesis.

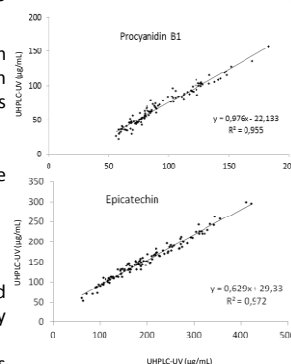


Figure 3. Comparison between UHPLC-MS/MS and UHPLC-UV quantification with the mean of quantification of 120 apple juices for procyanidin B1 and phloretin xyloglucoside compounds.

Conclusion: Two new UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS methods were developed to separate and quantify phenolic compounds in apple juice. Both were validated separately with the estimation of limits of detection and quantification, linearity, recovery and precision for the 15 major compounds of apple juice, except for the rutin which could not be detected with the UV detector.

These two methods were then used to quantify phenolic compounds in juices prepared from 120 hybrids of a cider apple progeny. The comparison of quantities obtained with both spectrometers showed an overestimation with the mass analyzer for four compounds. The possible matrix effect that affect the mass quantification shows that this type of analyzer should not be necessarily the reference for the phenolic compound quantification in complex matrices as apple juice.

References:

[1] Lea, A.G.H. & Arnold, G.M. (1978) J. Sci. Fd Agric., 29: 478-483
[2] Song, Y. et al. (2007) Agricultural Sciences in China, 6: 607-612
[3] Herrero, M. et al. (1999) Journal of the Institute of Brewing, 18: 9-13
[4] Chagné, D. et al. (2012) BMC Plant Biology, 12: 12
[5] Khan, S.A. et al. (2012) J. Exp. Bot., 63: 2895-2908

[6] Ortega, N. et al. (2010) J. of Food Composition and Analysis, 23: 298-305
[7] Caporossi L. et al. (2010) Chromatographia, 72: 281-287
[8] Sallustio B.C. et al. (2011) Clinical Biochemistry, 44: 231-236
[9] Weingerl V. et al. (2009) Acta Chim. Slov., 56: 698-703

Acknowledgment:

This work was financially supported by a PhD grant funding from the SFR 149 QUASAV (Structure Fédérative de Recherche: Qualité et Santé du Végétal), Angers, France. The authors would like to thank the team of "Horticulture Experimentale Unit" of INRA Angers-Nantes who takes care of the trees of the studied progeny.

Annexe II. Méthode UHPLC-MS/MS développées pour le dosage des composés phénoliques dans les jus préparés en 2009.

Solvant A : Eau-acide formique 0,1%

Solvant B : Méthanol

Débit de solvant : 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

Colonne chromatographique : Zorbax Eclipse Plus C18 Phenomenex 2,1 x 50 mm \varnothing 1,8 μm chauffée à 30°C

Gradient de solvant T (min)/%B : 0/10 ; 1,5/18 ; 9/18 ; 16/25 ; 17/35 ; 25/50

Paramètres de la source d'ionisation : Spray Voltage : 3000 V ; Vaporizer temperature : 350°C ; Sheath Gas Pressure : 48 ; Ion Sweep Gas Pressure : 1 ; Auxilliary Gas Pressure : 13 ; Capillary Temperature : 200°C ; Tube Lens Offset : -155 ; Skimmer Offset : 0 ; Collision Pressure : 1,5 mTorr.

Full scan : en Q3 entre 150 et 1160 m/z ; scan time 0,289 s ; mode négatif.

Transition SRM : (+)-catéchine et (-)-épicatéchine : 289 \rightarrow 245 ; procyanidines B1, B2, B5 : 577 \rightarrow 289 ; procyanidine C1 : 865 \rightarrow 289 ; acide 4-caféoylquinique : 353 \rightarrow 173 ; acide 5-caféoylquinique : 353 \rightarrow 191 ; acide 4-*p*-coumaroylquinique : 337 \rightarrow 173 ; phloridzine : 435 \rightarrow 167 ; phlorétine xyloglucoside : 567 \rightarrow 273 ; avicularine : 433 \rightarrow 300 ; hypérine : 463 \rightarrow 300 ; quercitrine : 609 \rightarrow 300 ; rutine : 447 \rightarrow 300.

Annexe III. Identification des composés phénoliques du jus de pomme P12R3A28 selon la méthode décrite en Annexe I.

Composé	m/z ^a	MS ^{2b}	Rt ^c	Intensité ^d
Procyanidine B1	577,0	424,7 ; 406,7	3,50	1,07 ^{e7}
Tétramère de procyanidine bichargé	576,2		3,79	8,75 ^{e5}
Trimère de procyanidine	865,2	694,8 ; 576,8	3,84	3,38 ^{e6}
Non identifié	307,1		3,96	7,27 ^{e5}
Pentamère de procyanidine bichargé	720,6	862,9 ; 1150,9	4,07	5,25 ^{e5}
Coumaroylquinique acide ?	336,9		4,12	1,31 ^{e6}
Trimère de procyanidine	865,3	694,8 ; 574,7	4,28	9,57 ^{e5}
Coumaroylquinique acide ?	337,0		4,41	5,47 ^{e5}
Pentamère de procyanidine bichargé	720,4		4,49	9,98 ^{e5}
Catéchine	288,9	244,5 ; 204,4	4,67	6,23 ^{e6}
Non identifié	326,9		4,83	9,26 ^{e5}
Non identifié	387,0		4,90	6,03 ^{e5}
Trimère de procyanidine	865,2	694,8 ; 576,8	5,03	8,76 ^{e5}
Non identifié	457,1		5,08	4,5 ^{e5}
Non identifié	308,9		5,27	1,73 ^{e6}
Pentamère de procyanidine bichargé	720,2	862,9 ; 1151,0	5,40	2,6 ^{e5}
Acide 5-caféoylquinique	352,9	190,5	5,54	1,29 ^{e7}
Non identifié	293,0		5,97	3,97 ^{e5}
Tétramère de procyanidine bichargé	576,4	862,9 ; 424,7	6,20	4,73 ^{e5}
Procyanidine B2	577,0	424,7 ; 406,7	6,50	1,02 ^{e7}
Non identifié	324,9		6,82	1,53 ^{e6}
Tétramère de procyanidine bichargé	576,5	862,9 ; 424,7	6,85	9,29 ^{e5}
Acide 4-caféoylquinique	353,0	172,4	6,99	1,18 ^{e6}
Trimère de procyanidine	864,5	694,8 ; 576,8	7,10	2,48 ^{e5}
Non identifié	357,0		7,33	2,74 ^{e6}
Trimère de procyanidine	865,3	694,8 ; 576,8	8,49	4,13 ^{e5}
Non identifié	351,0		8,93	2,32 ^{e6}
Non identifié	325,0		9,21	9,48 ^{e5}
Pentamère de procyanidine bichargé	720,6	862,9 ; 1151,0	9,37	4,38 ^{e5}
Acide 5- <i>p</i> -coumaroylquinique	336,9	190,4	9,73	6,5 ^{e5}
Non identifié	354,9		9,83	8,11 ^{e5}
Acide caféoylquinique ?	353,0		10,05	8,14 ^{e5}
Epicatechine	288,9	244,5	10,35	8,52 ^{e6}
Acide 4- <i>p</i> -coumaroylquinique	336,9	172,4	11,13	7,82 ^{e6}
Non identifié	675,1		11,15	1,17 ^{e6}
Dimère de procyanidine	577,0		11,70	6,08 ^{e5}

Procyanidine C1	865,2		11,93	3,68 ^{e6}
Non identifié	354,9		12,93	6,45 ^{e5}
Tétramère de procyanidine	1153,6		13,23	6,54 ^{e5}
Pentamère de procyanidine bichargé	720,2		13,42	6,04 ^{e5}
Non identifié	351,0		14,12	3,06 ^{e5}
Tétramère de procyanidine bichargé	576,0		14,20	4,37 ^{e5}
Non identifié	563,2		14,36	2,67 ^{e6}
Fragment de procyanidine ?	245,0		14,68	1,27 ^{e6}
Non identifié	483,2		15,16	5,9 ^{e5}
Pentamère de procyanidine bichargé	720,2		15,39	1,05 ^{e6}
Trimère de procyanidine	864,5		15,98	5,42 ^{e5}
Non identifié	483,0		16,10	3,39 ^{e5}
Procyanidine B5	577,0	424,7 ; 406,7	18,75	2,02 ^{e6}
Trimère de procyanidine	865,2		19,42	3,81 ^{e5}
Acide caféoylquinique ?	353,0		19,60	5,25 ^{e5}
Hypérine	463,0	300,6 ; 178,4	20,32	3,6 ^{e6}
Phlorétine xyloglucoside	567,1	272,6 ; 166,4	20,52	1,16 ^{e7}
Isoquercitrine	463,0		20,64	1,21 ^{e6}
Rutine	609,0	300,6 ; 254,6	20,77	1,09 ^{e5}
Reynoutrine	432,9	300,6 ; 178,4	20,96	1,66 ^{e6}
Phlorétine xylohexoside	567,1	272,6 ; 166,5	21,16	7,82 ^{e5}
Quercétine arabinopyranoside	433,0		21,26	3,04 ^{e5}
Phloridzine	435,0	272,6 ; 166,4	21,51	4,72 ^{e6}
Non identifié	547,2		21,92	1,5 ^{e6}
Avicularine	433,0	300,6 ; 178,4	22,03	2,68 ^{e6}
Quercitrine	447,0	300,6 ; 178,4	22,38	2,99 ^{e6}
Non identifié	549,1		22,98	2,94 ^{e5}
Non identifié	429,0		23,32	2,93 ^{e5}
Non identifié	414,9		23,57	2,63 ^{e5}
Non identifié	421,0		23,73	5,42 ^{e5}
Non identifié	429,0		24,00	1,03 ^{e6}

^a : valeur du rapport masse sur charge (m/z) obtenu en négatif.

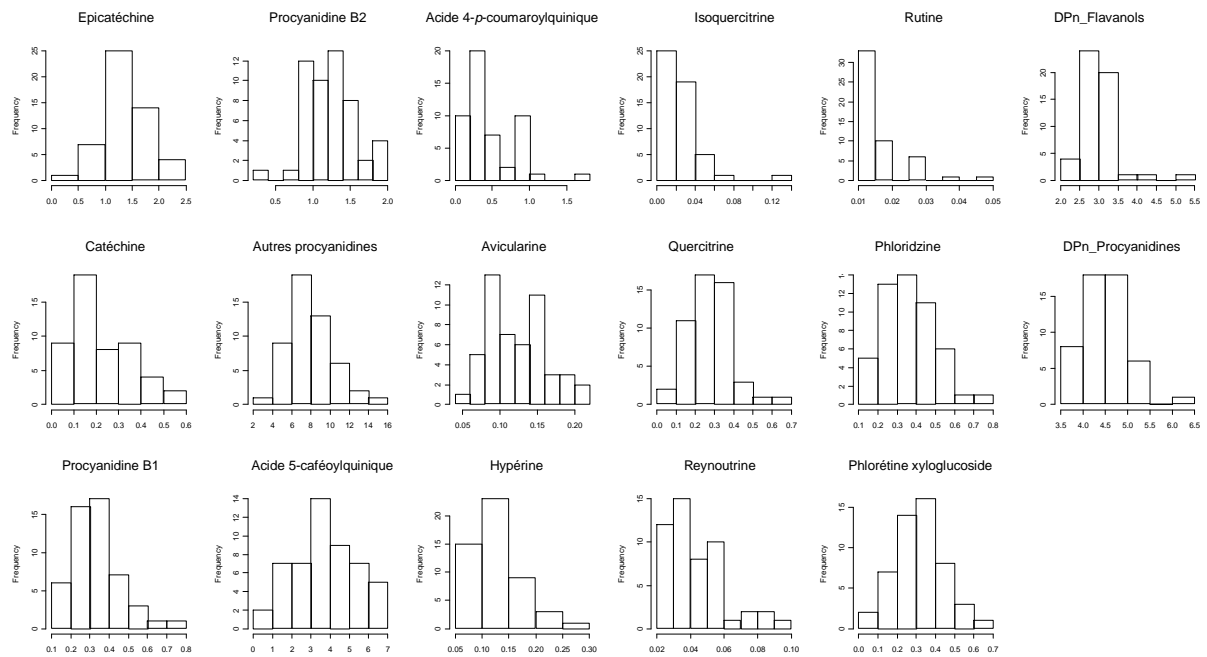
^b : rapports m/z obtenues après fragmentation. La première valeur indique le pic majoritaire.

^c : Temps de rétention (Rt) observés pour le jus P12R3A28 selon la méthode décrite en Annexe I.

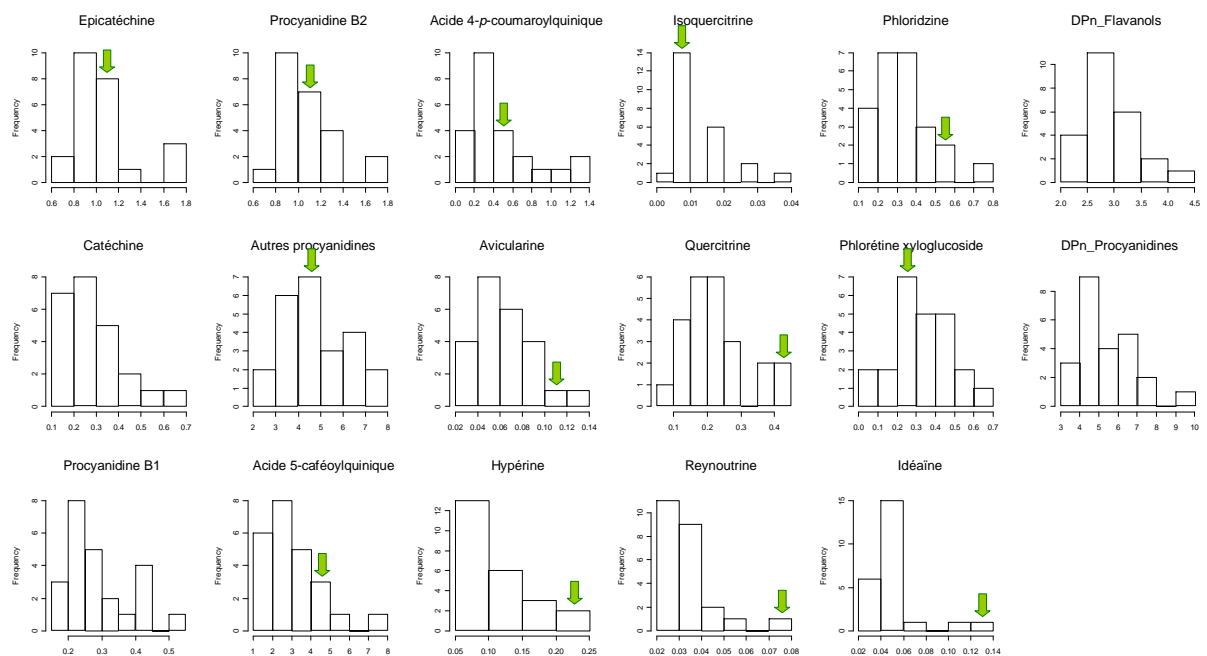
^d : intensité du pic sur le chromatogramme en fonction du TIC (Total Ion Current).

Annexe IV. Distribution des données phénotypiques.

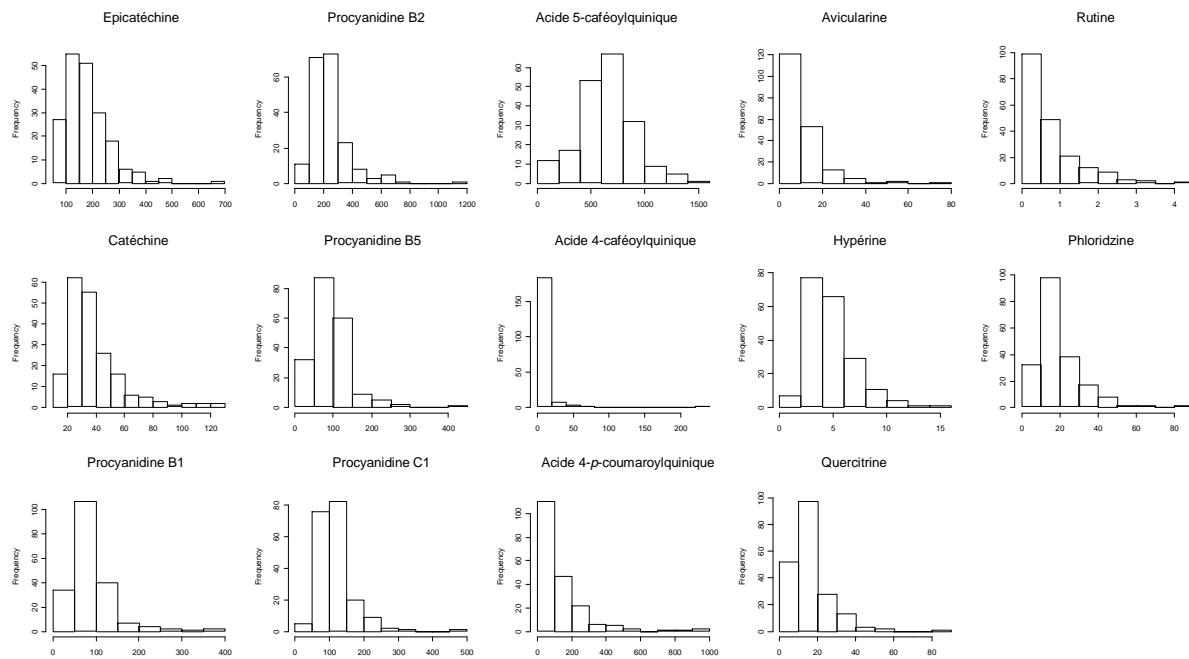
Données fruits 2008 en mg/10 g de MF :



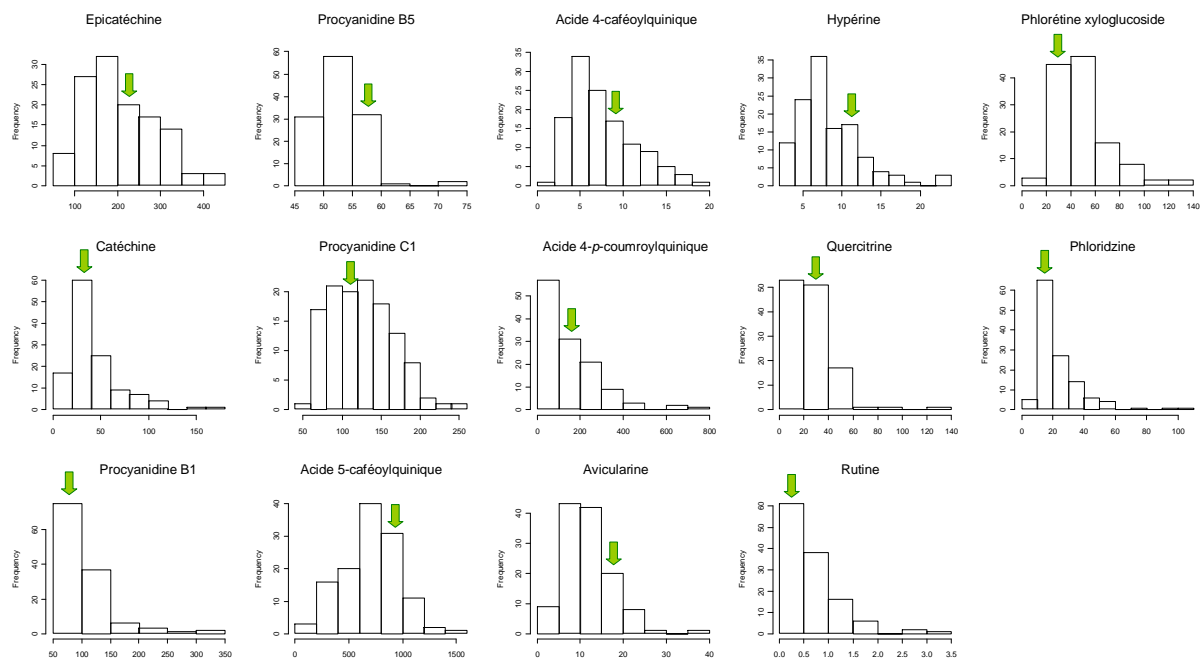
Données fruits 2009 en mg/10 g de MF :



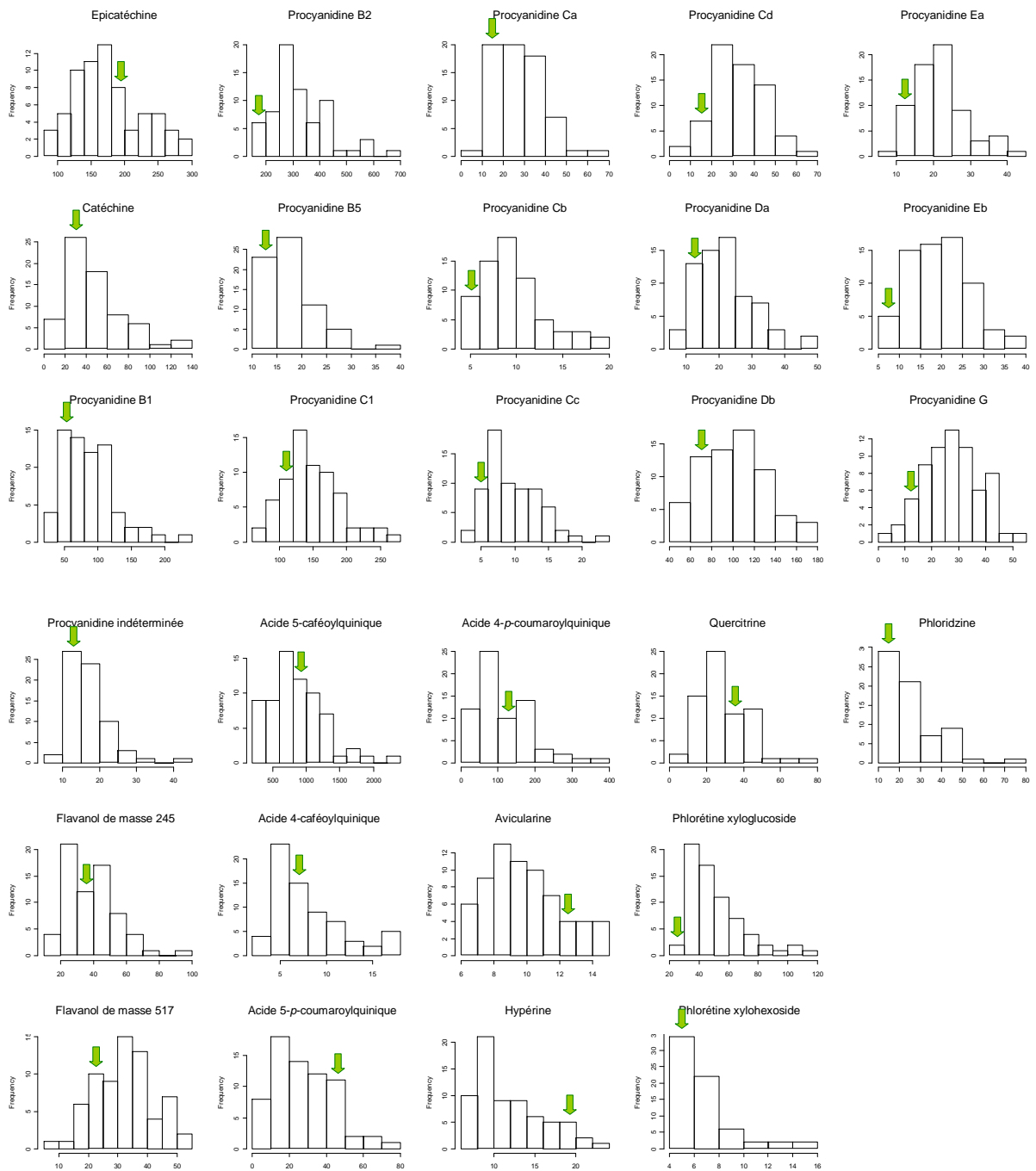
Données Jus 2009 en mg/L:



Données Jus 2010 SRM en mg /L : (la flèche correspond à la position du parent mâle X8402)



Données Jus 2010 UV en mg/L : (la flèche correspond à la position du parent mâle X8402)



QTL MAPPING AND CANDIDATE GENE RESEARCH FOR THE PHENOLIC CONTENT OF FRUITS AND JUICES PREPARED FROM A CIDER APPLE PROGENY

VERDU C.F.^{1,2}, Guyot S.³, Childebrand N.¹, Lasserre-Zuber P.¹, Gaillard S.¹, Celton J.-M.¹, Troggio M.⁴, Guilet D.² and Laurens F.¹

¹INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045 Angers, France, ²Université d'Angers, EA 921 laboratoire Substance d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux, SFR 4207 QUASAV, 49045 Angers, France, ³INRA, UR117 Recherches Cidricoles et Biotransformation des Fruits et Légumes, 35653 Le Rheu, France, ⁴IASMA Research and Innovation Centre, S. Michele all'Adige, TN, Italy.
Corresponding author: cindyverdu@gmail.com

Introduction

Cider quality is dependant on polyphenol content : they affect astringency, bitterness, color and aroma. Five main groups of phenolic compounds are present in the apple fruit: flavanols, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones, flavanols and anthocyanins. Their regulation by transcription factors is well known as well as their biosynthesis. Furthermore, the apple genome has been sequenced and annotated, which facilitate candidate gene identification.

Variability of phenolic compounds has been widely studied in apple germplasm. But until now, only two QTL studies have been performed, both on dessert apple progenies.

> The aim of this work is to perform a QTL analysis and a candidate gene research on the phenolic compounds present in fruit extracts and juices prepared from a cider apple progeny.

Results

- 48 QTL identified at genome wide (GW) threshold on nine linkage groups (LG) of the integrated map for flavanols, flavanols, dihydrochalcones and hydroxycinnamic acids.
- 11 main clusters located on six LG including QTL obtained at GW and LG threshold.
- Confidence interval for clusters on LG 1, 3, 12, 15 and 17 significantly reduced with Meta-QTL analysis.
- Several enzymes and transcription factors implicated in the phenolic pathway identified by *in silico* candidate gene research.

Material and Methods

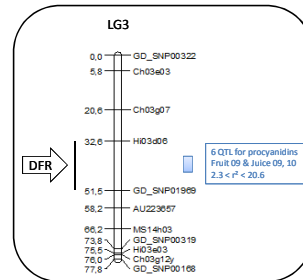
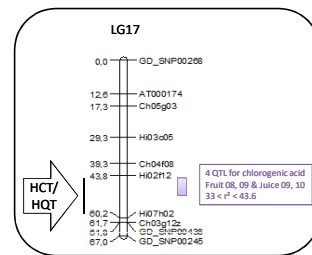
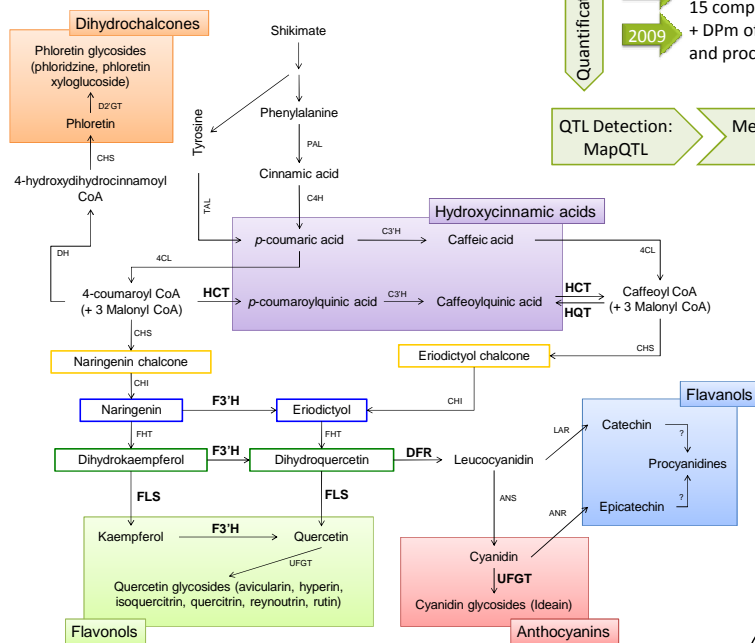
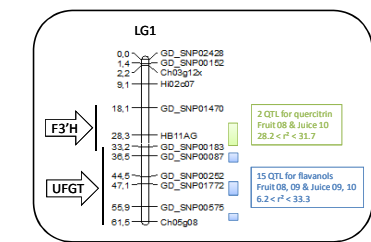
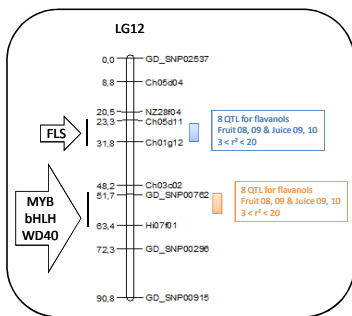
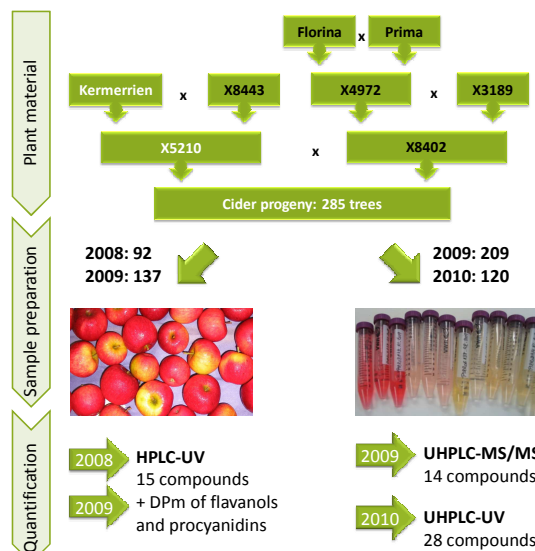


Figure. QTL meta-analysis for phenolic compounds quantified in fruit and juice prepared for two harvest years and candidate gene related to the biosynthetic pathway. Meta-QTLs are represented as full bars on the right side of the LG. Details on QTL included in meta-QTL analysis are described close to the meta-QTL. Candidate genes found close to the meta-QTL are indicated in the arrow on the left side of the LG.

Conclusion

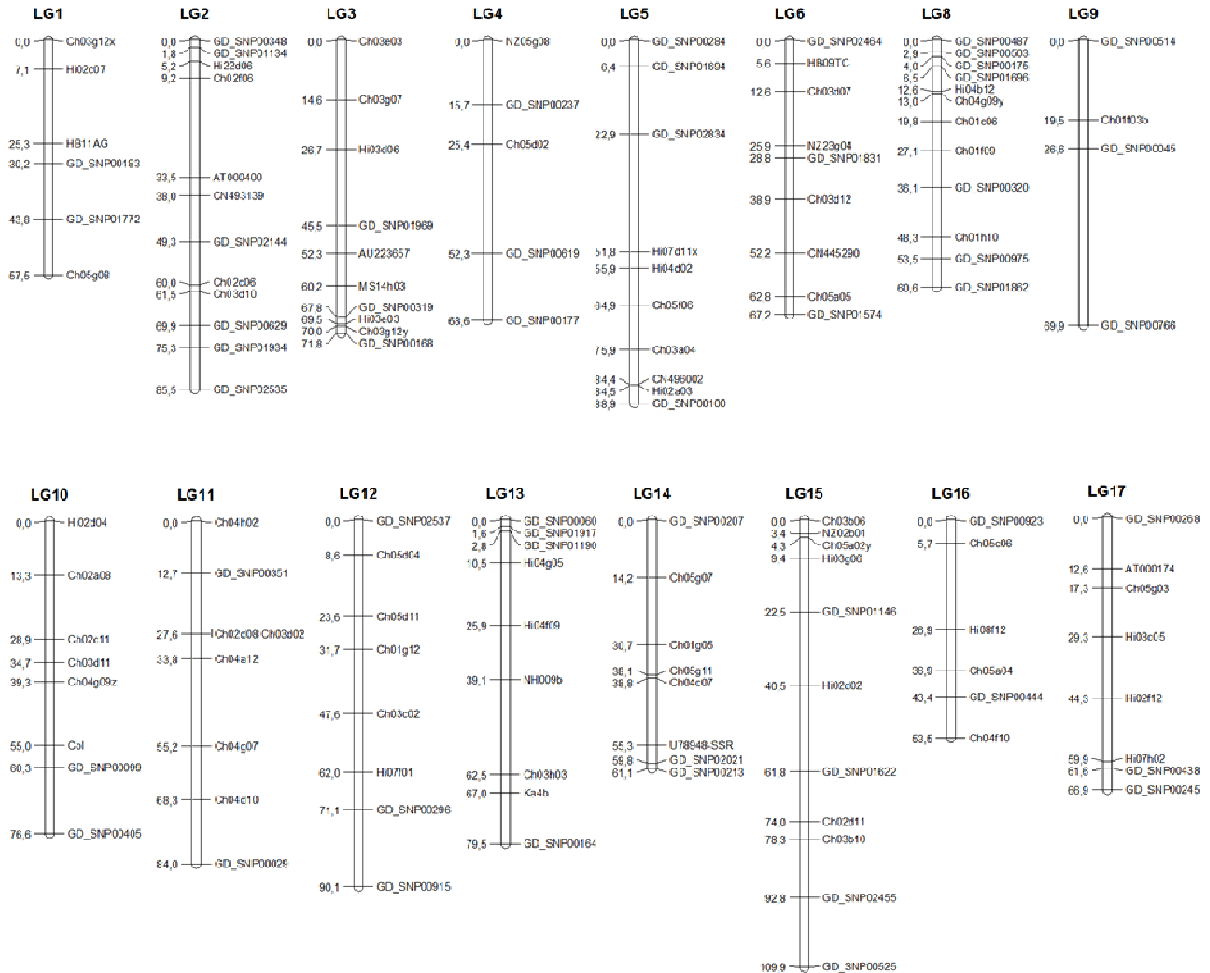
- Many QTL obtained for phenolic compounds quantified in fruit extracts and apple juices prepared in two harvest years. Several clusters identified for four phenolic groups.
- The meta-QTL analysis was a powerful tool to reduce confidence interval of these clusters.
- BLAST2GO software allowed a rapid analysis of putative gene functions present underneath QTL confidence interval.

Acknowledgment

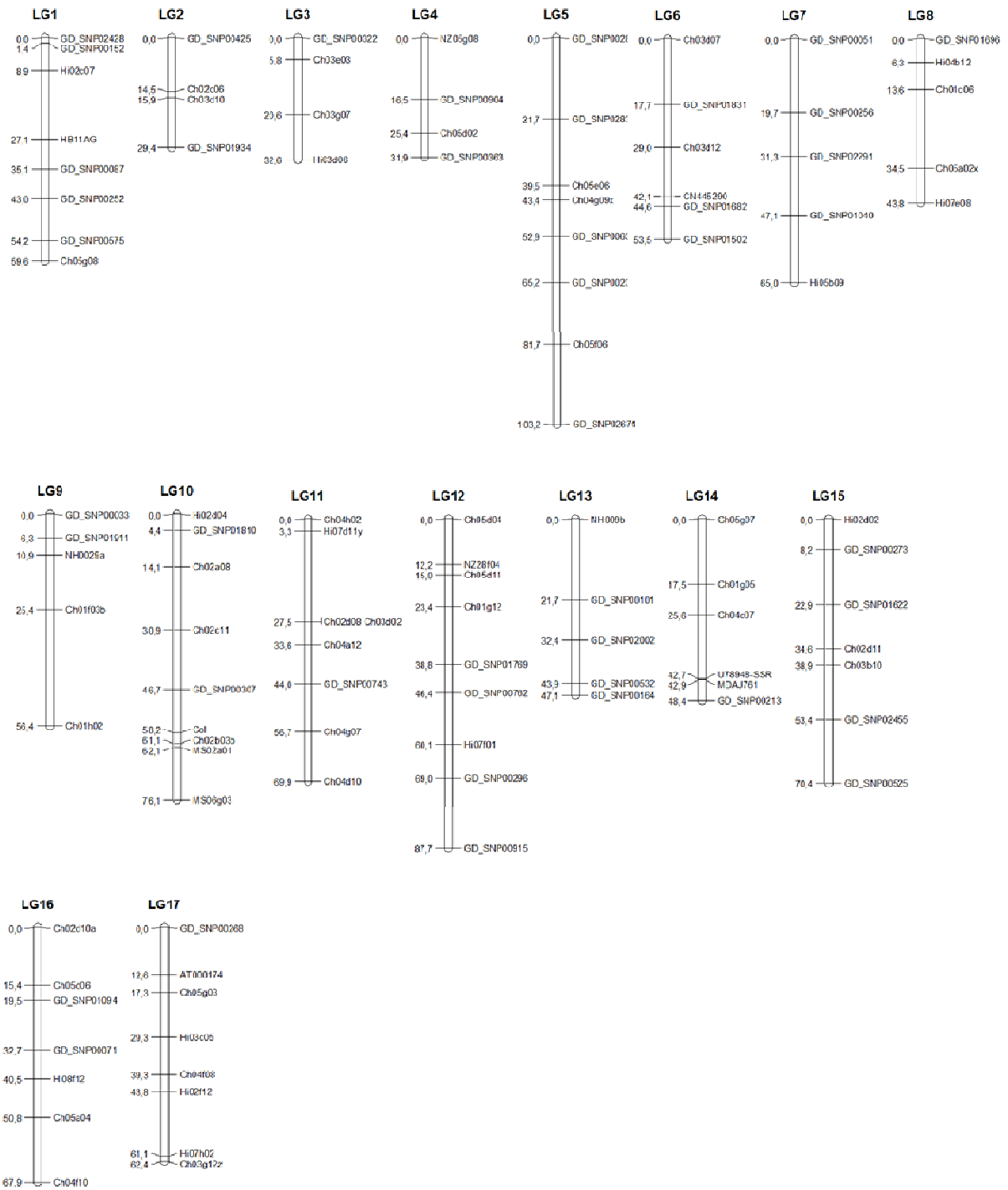
This work was supported by a PhD grant funding from the SFR 149 QUASAV (Structure Fédérative de Recherche: Qualité et Santé du Végétal), Angers, France and the inter-regional (Bretagne-Pays de la Loire) project INNOVACIDRE. Participation to RGC6 was funded by a grant awarded by the "Académie d'Agriculture de France".

Annexe VI. Cartes génétiques mâle, femelle et intégrée développées pour la descendance X5210 x 8402 à l'aide de marqueurs SSR et SNP.

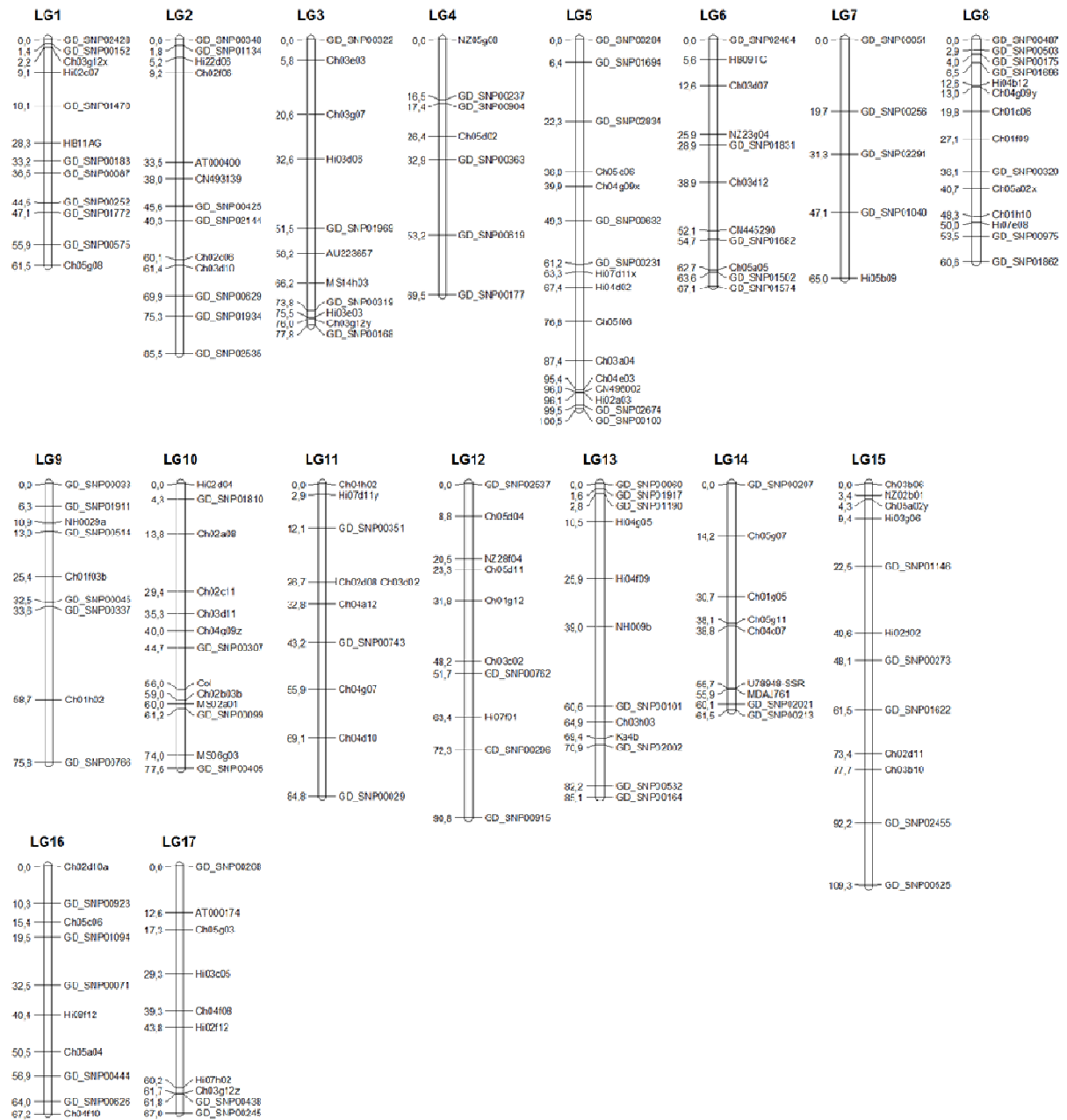
Carte femelle X5210 :



Carte mâle X8402 :



Carte intégrée :



Références bibliographiques

Articles de périodiques

- (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).
- Abad-Garcia, B., L. A. Berrueta, et al. (2007). "Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices." Journal of Chromatography A **1154**: 87-96.
- Abe, H., M. Nakano, et al. (2002). "Genetic analysis of floral anthocyanin pigmentation traits in Asiatic hybrid lily using molecular linkage maps." Theoretical and Applied Genetics **105**: 1175-1182.
- Aldrich, J. and C. A. Cullis (1993). "RAPD Analysis in Flax: Optimization of Yield and Reproducibility using KlenTaq 1 DNA Polymerase, Chelex 100, and Gel Purification of Genomic DNA." Plant Molecular Biology Reporter **11**(2): 128-141.
- Alonso-Salces, R. M., A. Barranco, et al. (2004). "Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Cultivars and Their Technological Properties." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**: 2938-2952.
- Alonso-Salces, R. M., A. Barranco, et al. (2004). "Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Cultivars and Their Technological Properties." J Agric Food Chem **52**: 2938-2952.
- Alonso-Salces, R. M., S. Guyot, et al. (2004). "Chemometric characterisation of Basque and French ciders according to their polyphenolic profiles." Analytical and Bioanalytical Chemistry **379**: 464-475.
- Alonso-Salces, R. M., E. Korta, et al. (2001). "Determination of Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Varieties Using Accelerated Solvent Extraction." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**: 3761-3767.
- An, X.-H., Y. Tian, et al. (2012). "The apple WD40 protein MdTTG1 interacts with bHLH but not MYB proteins to regulate anthocyanin accumulation." Journal of Plant Physiology **169**: 710-717.
- Antanaviciute, L., F. Fernandez-Fernandez, et al. (2012). "Development of a dense SNP-based linkage map of an apple rootstock progeny using the Malus Infinium whole genome genotyping array." BMC Genomics **13**: 203.
- Arcade, A., A. Labourdette, et al. BioMERCATOR: software for genetic maps display, maps projection and QTL meta-analysis. Gif-sur-Yvette, France, INRA.
- Awad, M. A. and A. de Jager (2000). "Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of 'Jonagold' and 'Elstar' apples during and after regular and ultra low oxygen storage." Postharvest Biology and Technology **20**: 15-24.
- Awad, M. A., A. De Jager, et al. (2000). "Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation." Scientia Horticulturae **83**(3-4): 249-263.
- Bain, J. M. and R. N. Robertson (1950). Cell size, cell number, and fruit development. The physiology of growth in apple fruits: 75-91.
- Ban, Y., C. Honda, et al. (2007). "Isolation and Functional Analysis of a MYB Transcription Factor Gene that is a Key Regulator for the Development of Red Coloration in Apple Skin." Plant Cell Physiology **48**(7): 958-970.

- Barriere, Y., J. Thomas, et al. (2008). "QTL mapping for lignin content, lignin monomeric composition, p-hydroxycinnamate content, and cell wall digestibility in the maize recombinant inbred line progeny F838 x F286." Plant Sci **175**(4): 585-595.
- Barriere, Y., J. Thomas, et al. (2008). "Qtl mapping for lignin content, lignin monomeric composition, p-hydroxycinnamate content, and cell wall digestibility in the maize recombinant inbred line progeny F838 x F286." Plant Science **175**(4): 585-595.
- Biedrzycka, E. and R. Amarowicz (2008). "Diet and Health: Apple Polyphenols as Antioxydants." Food Rev Int **24**: 235-251.
- Bink, M. C. A. M., M. P. Boer, et al. (2008). "Bayesian analysis of complex traits in pedigreed plant populations." Euphytica **161**: 85-96.
- Bore, J.-M. and J. Fleckinger (1997). Pommiers à cidre variétés de France. Paris.
- Boyer, J. and R. H. Liu (2004). "Apple phytochemicals and their health benefits." Nutrition Journal **3**(1): 5.
- Boyer, J. and R. H. Liu (2004). "Apple phytochemicals and their health benefits." Nutr J **3**(1): 5.
- Brat, P., S. Georgé, et al. (2006). "Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables." The Journal of Nutrition **136**: 2368-2373.
- Broman, K. W. and S. Sen (2009). Single-QTL analysis. A guide to QTL mapping with R/qlt, Springer: 400.
- Brun, H., A.-M. Chevre, et al. (2010). "Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*." New Phytologist **185**: 285-299.
- Burda, S., W. Oleszek, et al. (1990). "Phenolic Compounds and Their changes in Apples during Maturation and cold Storage." Journal of Agricultural and Food Chemistry **38**: 945-948.
- Caldas, G. V. and M. W. Blair (2009). "Inheritance of seed condensed tannins and their relationship with seed-coat color and pattern genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)." Theoretical and Applied Genetics **119**: 131-142.
- Calenge, F., D. Drouet, et al. (2005). "Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies." Theoretical and Applied Genetics **111**: 128-135.
- Calenge, F. and C.-E. Durel (2006). "Both stable and unstable QTLs for resistance to powdery mildew are detected in apple after four years of field assessments." Molecular Breeding **17**(4): 329-339.
- Calenge, F., A. Faure, et al. (2004). "Quantitative Trait Loci (QTL) Analysis Reveals Both Broad-Spectrum and Isolate-Specific QTL for Scab Resistance in an Apple Progeny Challenged with Eight Isolates of *Venturia inaequalis*." Genetics and Resistance **94**(4): 370-379.
- Caporossi, L., G. Tranfo, et al. (2010). "LC Determination of the Skin Exposure to Oxamyl on Greenhouse Workers and Comparison Between DAD and MS-MS Detection." Chromatographia **72**: 281-287.
- Cappiello, A., G. Famigliani, et al. (2008). "Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry." Analytical Chemistry **80**(23): 9343-9348.
- Celton, J.-M., S. Martinez, et al. (2011). "Deciphering the genetic determinism of bud phenology in apple progenies: a new insight into chilling and heat requirement effects on flowering dates and positional candidate genes." New Phytologist **192**(2): 378-392.

- Ceymann, M., E. Arrigoni, et al. (2011). "Rapid high performance screening method using UHPLC-MS to quantify 12 polyphenol compounds in fresh apples." Analytical Methods **3**: 1774-1778.
- Chagne, D., C. M. Carlisle, et al. (2007). "Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple." BMC Genomics **8**: 212.
- Chagne, D., K. Gasic, et al. (2008). "Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple." Genomics **92**: 353-358.
- Chagne, D., C. Krieger, et al. (2012). "QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit." BMC Plant Biol **12**: 12.
- Cheema, J. and J. Dicks (2009). "Computational approaches and software tools for genetic linkage map estimation in plants." Briefings in Bioinformatics **10**(6): 595-608.
- Colin-Henrion, M. (2008). *De la pomme à la pomme transformée : impact du procédé sur deux composés d'intérêt nutritionnel*, Angers: 272.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, et al. (2005). "An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts." Euphytica **142**: 169-196.
- Collard, B. C. Y. and D. J. Mackill (2008). "Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century." Philosophical Transaction of the Royal Society **363**: 557-572.
- Conesa, A., S. Gotz, et al. (2005). "Blast2GO : a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research." Bioinformatics **21**(18): 3674-3676.
- Cornille, A., P. Gladieux, et al. (2012). "New Insight into the History of Domesticated Apple: Secondary Contribution of the European Wild Apple to the Genome of Cultivated Varieties." Plos Genetics **8**(5): e1002703.
- Crozier, A., I. B. Jaganath, et al. (2009). "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." R Soc Chem **26**: 1001-1043.
- Crozier, A., I. B. Jaganath, et al. (2009). "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." Royal Society of Chemistry **26**: 1001-1043.
- De Freitas, V. and N. Mateus (2002). "Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates." J Sci Food Agric **82**(1): 113-119.
- De Freitas, V. and N. Mateus (2002). "Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates." Journal of the Science of Food and Agriculture **82**(1): 113-119.
- Debeaujon, I., K. M. Leon-Kloosterziel, et al. (2000). "Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis." Plant Physiology **122**(2): 403-413.
- Ding, C.-K., K. Chachin, et al. (1998). "Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Loquat Fruit." J Agric Food Chem **46**: 4144-4149.
- Ding, C.-K., K. Chachin, et al. (1998). "Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Loquat Fruit." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**: 4144-4149.
- Dixon, J. and E. W. Hewett (2000). "Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review." New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science **28**: 155-173.
- Dobson, P., J. Graham, et al. (2012). "Over-seasons Analysis of Quantitative Trait Loci Affecting Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Raspberry." J Agric Food Chem **60**: 5360-5366.

- Dobson, P., J. Graham, et al. (2012). "Over-seasons Analysis of Quantitative Trait Loci Affecting Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Raspberry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**: 5360-5366.
- Duncan, I. J. and R. B. Dustman (1936). "The anthocyanin pigment of the winesap apple." Journal of the American Chemical Society **58**(9): 1511-1514.
- Dunemann, F., D. Ulrich, et al. (2009). "QTL mapping of aroma compounds analysed by headspace solid-phase microextraction gas chromatography in the apple progeny 'Discovery' 3 'Prima'." Molecular Breeding **23**: 501-521.
- Dupont, N. (2010). "L'amélioration génétique des variétés cidricoles, des perspectives pour l'avenir." Pomme à cidre **25**: 24-25.
- Dupont, N., F. Laurens, et al. (2011). INNOVACIDRE, un programme de création variétale pour la filière cidricole. AFPP – quatrième conférence internationale sur les méthodes alternatives en protection des cultures. Lille.
- Eisele, T. A. and S. R. Drake (2005). "The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties." Journal of Food Composition and Analysis **18**: 213-221.
- Espley, R. V., R. P. Hellens, et al. (2007). "Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10." The Plant Journal **49**: 414-427.
- Evans, R. C. and C. S. Campbell (2002). "The origin of the apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes." American Journal of Botany **89**(9): 1478-1484.
- Feret, L. (1855). Histoire du pommier et du cidre. Caen, collection électronique de la bibliothèque municipale de Lisieux.
- Flachowsky, H., H. Halbwrith, et al. (2012). "Silencing of flavanone-3-hydroxylase in apple (*Malus x domestica* Borkh.) leads to accumulation of flavanones, but not to reduced fire blight susceptibility." Plant physiology and biochemistry **51**: 18-25.
- Flachowsky, H., I. Szankowski, et al. (2010). "Transgenic apple plants overexpressing the Lc gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight." Planta **231**: 623-635.
- Fournier-Level, A., L. Le Cunff, et al. (2009). "Quantitative Genetic Bases of Anthocyanin Variation in Grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) Berry: A Quantitative Trait Locus to Quantitative Trait Nucleotide Integrated Study." Genetics **183**: 1127-1139.
- Fournier-Level, A., L. Le Cunff, et al. (2009). "Quantitative Genetic Bases of Anthocyanin Variation in Grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) Berry: A Quantitative Trait Locus to Quantitative Trait Nucleotide Integrated Study." Genet **183**: 1127-1139.
- Fowler, Z. L. and M. A. G. Koffas (2009). "Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives." Applied Microbiology and Biotechnology **83**: 799-808.
- Gargouri, M., C. Manigand, et al. (2009). "Structure and epimerase activity of anthocyanidin reductase from *Vitis vinifera*." Acta Crystallographica Section D **65**(9): 989-1000.
- Gessler, C. and I. Pertot (2012). "Vf scab resistance of *Malus*." Trees **26**(1): 95-108.
- Gianfranceschi, L., N. Seglias, et al. (1998). "Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple." Theoretical and Applied Genetics **96**(8): 1069-1076.
- Gorinstein, S., Z. Zachwieja, et al. (2001). "Comparative content of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(2): 952-957.

- Gosch, C., H. Halbwirth, et al. (2009). "Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.)." Plant Science **176**: 223-231.
- Gosse, F., S. Guyot, et al. (2005). "Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis." Carcinogenesis **26**(7): 1291-1295.
- Grimi, N., F. Mamouni, et al. (2011). "Impact of apple processing modes on extracted juice quality: Pressing assisted by pulsed electric fields." Journal of Food Engineering **103**: 52-61.
- Guitton, B., J.-J. Kelner, et al. (2012). "Genetic control of biennial bearing in apple." Journal of Experimental Botany **63**(1): 131-149.
- Guyot, S., S. Bernillon, et al. (2008). Multiplicity of phenolic oxydation products in apple juices and ciders, from synthetic medium to commercial products. Recent advances in polyphenol research. **1**: 278-292.
- Guyot, S. and J. F. Drilleau (1998). "Les composés phénoliques comme facteurs de diversité et de typicité des cidres français." Polyphénols Actualités **18**: 9-13.
- Guyot, S., C. Le Bourvellec, et al. (2002). "Procyanidins are the most Abundant Polyphenols in Dessert Apples at Maturity." LWT **35**: 289-291.
- Guyot, S., N. Marnet, et al. (1998). "Reversed-Phase HPLC following Thiolysis for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien)." J Agric Food Chem **46**: 1698-1705.
- Guyot, S., N. Marnet, et al. (1998). "Reversed-Phase HPLC following Thiolysis for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**: 1698-1705.
- Guyot, S., N. Marnet, et al. (2001). "Direct thiolysis on crude apple materials for high-performance liquid chromatography characterization and quantification of polyphenols in cider apple tissues and juices." Methodes Enzym **335**: 57-70.
- Guyot, S., N. Marnet, et al. (2003). "Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(21): 6240-6247.
- Guyot, S., N. Marnet, et al. (2003). "Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices." J Agric Food Chem **51**(21): 6240-6247.
- Hackett, C. A., J. Russell, et al. (2010). "Multi-environment QTL mapping in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) using mixed models." Theoretical and Applied Genetics **121**: 1483-1488.
- Hackett, C. A., J. Russell, et al. (2010). "Multi-environment QTL mapping in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) using mixed models." Theor Appl Genet **121**: 1483-1488.
- Hagl, S., H. Deusser, et al. (2011). "Colonic availability of polyphenols and D-(-)-quinic acid after apple smoothie consumption." Molecular Nutrition and Food Research **55**: 368-377.
- Han, Y., S. Vimolmangkang, et al. (2012). "Introduction of apple ANR genes into tobacco inhibits expression of both CHI and DFR genes in flowers, leading to loss of anthocyanin." Journal of Experimental Botany **63**(7): 2437-2447.
- Harris, S. A., J. P. Robinson, et al. (2002). "Genetic clues to the origin of the apple." Trends in Genetics **18**(8): 426-430.

- He, F., Q.-H. Pan, et al. (2008). "Biosynthesis and Genetic Regulation of Proanthocyanidins in Plants." Molecules **13**: 2674-2703.
- He, F., Q.-H. Pan, et al. (2008). "Chemical Synthesis of Proanthocyanidins in Vitro and Their Reactions in Aging Wines." Molecules **13**: 3007-3032.
- Helentjaris, T., M. Slocum, et al. (1986). "Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms." Theoretical and Applied Genetics **61**: 650-658.
- Hernando, M. D., C. Ferrer, et al. (2007). "Application of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil." Analytical and Bioanalytical Chemistry **389**: 1815-1831.
- Herrero, M., I. Cuesta, et al. (1999). "Changes in Organic Acids During Malolactic Fermentation at Different Temperatures in Yeast-Fermented Apple Juice." Journal of the Institute of Brewing **105**(3): 191-195.
- Herrero, M., I. Cuesta, et al. (1999). "Changes in Organic Acids During Malolactic Fermentation at Different Temperatures in Yeast-Fermented Apple Juice." J Inst Brew **105**(3): 191-195.
- Hichri, I., S. C. Heppel, et al. (2010). "The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor MYC1 Is Involved in the Regulation of the Flavonoid Biosynthesis Pathway in Grapevine." Molecular Plant **3**(3): 509-523.
- Hoffmann, L., S. Besseau, et al. (2004). "Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis." Plant Cell **16**: 1446-1465.
- Huang, Y. F., A. Doligez, et al. (2012). "Dissecting genetic architecture of grape proanthocyanidin composition through quantitative trait locus mapping." BMC Plant Biol **12**: 30.
- Huang, Y. F., A. Doligez, et al. (2012). "Dissecting genetic architecture of grape proanthocyanidin composition through quantitative trait locus mapping." BMC Plant Biology **12**: 30.
- IFPC (2009). "Pomme à cidre : Les variétés." 16.
- Illa, E., D. J. Sargent, et al. (2011). "Comparative analysis of rosaceous genomes and the reconstruction of a putative ancestral genome for the family." BMC Evolutionary Biology **11**: 9.
- Jakopic, J., F. Stampar, et al. (2009). "The influence of exposure to light on the phenolic content of 'Fuji' apple." Scientia Horticulturae **123**: 234-239.
- Janick, J., J. N. Cummins, et al. (1996). Apples. Fruit Breeding. I: Tree and Tropical Fruits: 1-77.
- Jemal, M. (2000). "High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS." Biomedical Chromatography **14**: 422-429.
- Jende-Strid, B. (1993). "Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley." Hereditas **119**: 187-204.
- Jin, L., P. Xiao, et al. (2009). "Quantitative Trait Loci for Brown Rice Color, Phenolics, Flavonoid Contents, and Antioxidant Capacity in Rice Grain." Cereal Chemistry **86**(6): 609-615.
- Jones, P., B. Messner, et al. (2003). "UGT73C6 and UGT78D1, Glycosyltransferases Involved in Flavonol Glycoside Biosynthesis in Arabidopsis thaliana." The Journal of Biological Chemistry **278**(46): 43910-43918.

- Jorgensen, K., A. Vinther Rasmussen, et al. (2005). "Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products." Current Opinion in Plant Biology **8**: 280-291.
- Joung, J.-Y., G. M. Kasthuri, et al. (2003). "An overexpression of chalcone reductase of *Pueraria montana* var. *lobata* alters biosynthesis of anthocyanin and 50-deoxyflavonoids in transgenic tobacco." Biochemical and Biophysical Research Communications **303**(1): 326-331.
- Ju, Z.-G., Y.-B. Yuan, et al. (1995). "Relationships among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentrations and anthocyanin accumulation in apple." Scientia Horticulturae **61**: 215-226.
- Ju, Z., C. Liu, et al. (1995). "Activities of chalcone synthase and UDPGal: flavonoid-3-O-glycosyltransferase in relation to anthocyanin synthesis in apple." Scientia Horticulturae **63**: 175-185.
- Jung, S., A. Cestaro, et al. (2012). "Whole genome comparisons of *Fragaria*, *Prunus* and *Malus* reveal different modes of evolution between Rosaceous subfamilies." BMC Genomics **13**: 129.
- Kahle, K., W. Huemmer, et al. (2007). "Polyphenols Are Intensively Metabolized in the Human Gastrointestinal Tract after Apple Juice Consumption." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**: 10605-10614.
- Kahle, K., M. Krauss, et al. (2005). "Polyphenol profiles of apple juices." Mol Nutr Food Res **49**: 797-806.
- Kahle, K., M. Krauss, et al. (2005). "Polyphenol profiles of apple juices." Molecular Nutrition and Food Research **49**: 797-806.
- Kassim, A., J. Poette, et al. (2009). "Environmental and seasonal influences on red raspberry anthocyanin antioxidant contents and identification of quantitative traits loci (QTL)." Molecular Nutrition and Food Research **53**: 625-634.
- Kenis, K., J. Keulemans, et al. (2008). "Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple." Tree Genetics and Genomes **4**: 647-661.
- Kennedy, J. A. and G. P. Jones (2001). "Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(4): 1740-1746.
- Kennedy, J. A. and G. P. Jones (2001). "Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol." J Agric Food Chem **49**(4): 1740-1746.
- Kermasha, S., M. Goetghebeur, et al. (1995). "Analyses of phenolic and furfural compounds in concentrated and non-concentrated apple juices." Food Research International **28**(3): 245-252.
- Khan, S. A., P.-Y. Chibon, et al. (2012). "Genetic analysis of metabolites in apple fruits indicates an mQTL hotspot for phenolic compounds on linkage group 16." J Exp Bot **63**(8): 2895-2908.
- Khan, S. A., P.-Y. Chibon, et al. (2012). "Genetic analysis of metabolites in apple fruits indicates an mQTL hotspot for phenolic compounds on linkage group 16." Journal of Experimental Botany **63**(8): 2895-2908.
- Khanizadeh, S., R. Tsao, et al. (2008). "Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing." J Food Comp Anal **21**: 396-401.

- Khanizadeh, S., R. Tsao, et al. (2008). "Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing." Journal of Food Composition and Analysis **21**: 396-401.
- Kim, J. Y., Y. Seo, et al. (2001). "Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple." Plant Science **161**: 1145-1152.
- Korban, S. S. and S. Tartarini (2009). Apples. Genetics and Genomics of Rosaceae. K. M. Folta and S. E. Gardiner, Springer. **6**: 73-163.
- Koyama, K., H. Ikeda, et al. (2012). "Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape." Phytochemistry **78**: 54-64.
- Kumar, P., V. K. Gupta, et al. (2009). "Potential of molecular markers in plant biotechnology." Plant Omics Journal **2**(4): 141-162.
- Kumar, S., D. Chagne, et al. (2012). "Genomic Selection for Fruit Quality Traits in Apple (*Malus domestica* Borkh.)." Plos One **7**(5): e36674.
- Lam, C. K., Z. Zhang, et al. (2008). "Apple polyphenols inhibit plasma CETP activity and reduce the ratio of non-HDL to HDL cholesterol." Molecular Nutrition and Food Research **52**(8): 950-958.
- Lancaster, J. E. and D. K. Dougall (1992). "Regulation of skin color in apples." Critical Reviews in Plant Sciences **10**(6): 487-502.
- Lata, B. (2007). "Relationship between Apple Peel and the Whole Fruit Antioxidant Content: Year and Cultivar Variation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**: 663-671.
- Laurens, F., C.-E. Durel, et al. (2004). "Molecular characterization of french local apple cultivars using SSRs." Acta Horticulturae **663**: 639-642.
- Laurens, F., C.-E. Durel, et al. (2010). "Review on apple genetics and breeding programmes and presentation of a new European initiative to increase fruit breeding efficiency." Journal of Fruit Science **27**: 102-107.
- Lauri, P. E. and F. Laurens (2005). Architectural types in apple (*Malus x domestica* Borkh.) - Concepts and use for tree management and genetic improvement in France. Crops: growth, quality and biotechnology. R. Dris: 1356.
- Le Marchand, L. (2002). "Cancer preventive effects of flavonoids; a review " Biomedicine and Pharmacotherapy **56**: 296-301.
- Le Marchand, L., S. P. Murphy, et al. (2000). "Intake of Flavonoids and Lung Cancer." Journal of the National Cancer Institute **92**(2): 154-160.
- Lea, A. G. H. and G. M. Arnold (1978). "The phenolics of ciders: Bitterness and astringency." Journal of the Science of Food and Agriculture **29**(5): 478-483.
- Lea, A. G. H. and G. M. Arnold (1978). "The phenolics of ciders: Bitterness and astringency." J Sci Food Agric **29**(5): 478-483.
- Lee, K. W., Y. J. Kim, et al. (2003). "Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(22): 6516-6520.
- Leser, C. and D. Treutter (2005). "Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees." Physiologia Plantarum **123**: 49-56.
- Li, H., H. Flachowsky, et al. (2007). "Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.)." Planta **226**: 1243-1254.

- Li, H., J. Qiu, et al. (2012). "Molecular characterization and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) gene in *Saussurea medusa*." *Molecular Biology Reports* **39**(3): 2991-2999.
- Liebhard, R., B. Koller, et al. (2003). "Mapping Quantitative Field Resistance Against Apple Scab in a 'Fiesta' x 'Discovery' Progeny." *Genetics and Resistance* **93**(4): 493-501.
- Lillo, C., U. Lea, et al. (2008). "Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway." *Plant, Cell and Environment* **31**: 587-601.
- Lin-Wang, K., K. Bolitho, et al. (2010). "An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae." *BMC Plant Biology* **10**: 50.
- Lin-Wang, K., D. Micheletti, et al. (2011). "High temperature reduces apple fruit colour via modulation of the anthocyanin regulatory complex." *Plant, Cell and Environment* **34**: 1176-1190.
- Lin, J.-K. and M.-S. Weng (2006). *Flavonoids as Nutraceuticals. The Science of Flavonoids*. E. Grotewold. Columbus: 26.
- Lipsa, F. D., R. Snowdon, et al. (2012). "Quantitative genetic analysis of condensed tannins in oilseed rape meal." *Euphytica* **184**: 195-205.
- Longhi, S., M. Moretto, et al. (2012). "Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh.)." *Journal of Experimental Botany* **63**(3): 1107-1121.
- Lotito, S. B. and B. Frei (2004). "The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids." *Free Radical Biology and Medicine* **37**(2): 251-258.
- Lotito, S. B. and B. Frei (2006). "Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?" *Free Radical Biology and Medicine* **41**: 1727-1746.
- Lovdal, T., K. M. Olsen, et al. (2010). "Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato." *Phytochemistry* **71**: 605-613.
- Lu, Y. and L. Y. Foo (1997). "Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace." *Food Chemistry* **59**(2): 187-194.
- Macheix, J. J., A. Fleuriet, et al. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux*. Lausanne.
- MacLean, D. D., D. P. Murr, et al. (2006). "Postharvest Variation in Apple (*Malus domestica* Borkh.) Flavonoids following Harvest, Storage, and 1-MCP Treatment." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 870-878.
- Maldonado-Cellis, M.-E., S. Bousserouel, et al. (2009). "Differential Induction of Apoptosis by Apple Procyanidins in TRAIL-Sensitive Human Colon Tumor Cells and Derived TRAIL-Resistant Metastatic Cells." *Journal of Cancer Molecules* **5**(1): 21-30.
- Maliepaard, C., J. Jansen, et al. (1997). "Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species : overview and consequences for applications." *Genetics Research (Cambridge)* **70**: 237-250.
- Mangas, J. J., R. Rodriguez, et al. (1999). "Study of the Phenolic Profile of Cider Apple Cultivars at Maturity by Multivariate Techniques." *J Agric Food Chem* **47**: 4046-4052.
- Marks, S. C., W. Mullen, et al. (2007). "Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples." *J Sci Food Agric* **87**: 719-728.

- Marnet, N., S. Guyot, et al. (2002). Phloroglucinolysis applied to the characterisation and the quantification of procyanidins in apples and their derived products. Polyphenols Communications 2002. XXI International Conference on Polyphenols, Marrakech - Maroc.
- Matsui, K. N., L. M. Granado, et al. (2007). "Peroxydase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions." LWT - Food Science and Technology **40**(5): 852-859.
- Matthews, S., I. Mila, et al. (1997). "Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles." J Agric Food Chem **45**: 1195-1201.
- Mayr, U., S. Michalek, et al. (1997). "Phenolic Compounds of Apple and their Relationship to Scab Resistance." Journal of Phytopathology **145**: 69-75.
- McDonald, B. and C. Linde (2002). "Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance." Annual Review of Phytopathology **40**: 349-379.
- McDougall, G. J., I. M. Morrison, et al. (1996). "Plant Cell Walls as Dietary Fibre: Range, Structure, Processing and Function." Journal of the Science of Food and Agriculture **70**(2): 133-150.
- Mellway, R. D., L. T. Tran, et al. (2009). "The Wound-, Pathogen-, and Ultraviolet B-Responsive MYB134 Gene Encodes an R2R3 MYB Transcription Factor That Regulates Proanthocyanidin Synthesis in Poplar." Plant Physiology **150**: 924-941.
- Micheletti, D., M. Troggio, et al. (2011). "Genetic diversity of the genus *Malus* and implications for linkage mapping with SNPs." Tree Genetics and Genomes **7**: 857-868.
- Miedaner, T. and V. Korzun (2012). "Marker-Assisted Selection for Disease Resistance in Wheat and Barley Breeding." Phytopathology **102**(6): 560-566.
- Mink, P. J., C. G. Scrafford, et al. (2007). "Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women." The American Journal of Clinical Nutrition **85**: 895-909.
- Moalem-Beno, D., G. Tamari, et al. (1997). "Sugar-Dependent Gibberellin-Induced Chalcone Synthase Gene Expression in *Petunia* Corollas." Plant Physiology **113**(2): 419-424.
- Modhave, Y. (2012). "Matrix effect in bioanalysis: an overview." International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research **1**(6): 403-405.
- Mullen, W., S. C. Marks, et al. (2007). "Evaluation of Phenolic Compounds in Commercial Fruit Juices and Fruit Drinks." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**: 3148-3157.
- Napolitano, A., A. Cascone, et al. (2004). "Influence of Variety and Storage on the Polyphenol Composition of Apple Flesh." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(21): 6526-6531.
- Nogueira, A., S. Guyot, et al. (2008). "Effect of Alcoholic Fermentation in the Content of Phenolic Compounds in Cider Processing." Brazilian Archives of Biology and Technology **51**(5): 1025-1032.
- Novakova, L., Z. Spacil, et al. (2010). "Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures." Talanta **80**: 1970-1979.
- Ortega, N., M.-P. Romero, et al. (2010). "Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples." Journal of Food Composition and Analysis **23**(3): 298-305.

- Oszmianski, J. and C. Y. Lee (1990). "Enzymic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system." J Agric Food Chem **38**(5): 1202-1204.
- Oszmianski, J. and C. Y. Lee (1990). "Enzymic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system." Journal of Agricultural and Food Chemistry **38**(5): 1202-1204.
- Palloix, A., V. Ayme, et al. (2009). "Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies." New Phytologist **183**: 190-199.
- Pang, Y., J. P. Wenger, et al. (2009). "A WD40 Repeat Protein from *Medicago truncatula* Is Necessary for Tissue-Specific Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis But Not for Trichome Development." Plant Physiology **151**: 1114-1129.
- Peer, W. A. and A. S. Murphy (2006). Flavonoids as Signal Molecules: Targets of Flavonoid Action. The Science of Flavonoids. E. Grotewold. Columbus: 30.
- Perez-Illarbe, J., T. Hernandez, et al. (1997). "Cold storage of apples (cv. Granny Smith) and changes in phenolic compounds." Z Lebensm Unters Forsch A **204**: 52-55.
- Pflieger, S., V. Lefebvre, et al. (2001). "The candidate gene approach in plant genetics: a review." Molecular Breeding **7**: 275-291.
- Podsedeck, A., J. Wilska-Jeszka, et al. (2000). "Compositional characterisation of some apple varieties." European Food Research and Technology **210**(4): 268-272.
- Poland, J. A., P. J. Brown, et al. (2012). "Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach." Plos One **7**(2): e32253.
- Pontais, I., D. Treutter, et al. (2008). "Erwinia amylovora modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system." Physiologia Plantarum **132**: 262-271.
- Price, K. R., T. Prosser, et al. (1999). "A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing." Food Chemistry **66**: 489-494.
- Price, K. R., T. Prosser, et al. (1999). "A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing." Food Chem **66**: 489-494.
- Quideau, S., D. Deffieux, et al. (2011). "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis." Angewandte Chemie International Edition **50**(3): 586-621.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Ramsay, N. A. and B. J. Glover (2005). "MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity." Trends in Plant Science **10**(2): 63-70.
- Rehman Arif, M. A., M. Nagel, et al. (2012). "Genetic studies of seed longevity in hexaploid wheat using segregation and association mapping approaches." Euphytica **186**: 1-13.
- Renard, C. M. G. C. (2005). "Variability in cell wall preparations : quantification and comparison of common methods." Carbohydr Polym **60**: 515-522.
- Renard, C. M. G. C., A. Baron, et al. (2001). "Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences." Biological Macromolecules **29**: 115-125.

- Renard, C. M. G. C., A. Baron, et al. (2001). "Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences." Biol Macromol **29**: 115-125.
- Renard, C. M. G. C., J.-M. Le Quere, et al. (2011). "Modulating polyphenolic composition and organoleptic properties of apple juices by manipulating the pressing conditions." Food Chemistry **124**: 117-125.
- Rezaeizad, A., B. Wittkop, et al. (2011). "Identification of QTLs for phenolic compounds in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by association mapping using SSR markers." Euphytica **177**: 335-342.
- Sacchi, K. L., L. F. Bisson, et al. (2005). "A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines." American Journal of Enology and Viticulture **56**(3): 197-206.
- Sallustio, B. C., B. D. Noll, et al. (2011). "Comparison of blood sirolimus, tacrolimus and everolimus concentrations measured by LC-MS/MS, HPLC-UV and immunoassay methods." Clinical Biochemistry **44**: 231-236.
- Sanoner, P. (2001). Les polyphénols de la pomme à cidre : Diversité variétale et oxydation., Caen: 351.
- Sanoner, P., S. Guyot, et al. (1999). "Polyphenol Profiles of French Cider Apple Varieties (*Malus domestica* sp.)." J Agric Food Chem **47**(12): 4847-4853.
- Sanoner, P., S. Guyot, et al. (1999). "Polyphenol Profiles of French Cider Apple Varieties (*Malus domestica* sp.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(12): 4847-4853.
- Schieber, A., P. Keller, et al. (2001). "Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography." J Chrom A **910**: 265-273.
- Schilling, S., S. Schmid, et al. (2008). "Comparative Study of Pulsed Electric Field and Thermal Processing of Apple Juice with Particular Consideration of Juice Quality and Enzyme Deactivation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**: 4545-4554.
- Segura, V., C.-E. Durel, et al. (2009). "Dissecting apple tree architecture into genetic, ontogenetic and environmental effects: QTL mapping." Tree Genetics and Genomes **5**: 165-179.
- Semagn, K., A. Bjornstad, et al. (2006). "An overview of molecular marker methods for plants." African Journal of Biotechnology **5**(25): 2540-2568.
- Shao, Y., L. Jin, et al. (2011). "Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice." Theoretical and Applied Genetics **122**: 1005-1016.
- Shao, Y., L. Jin, et al. (2011). "Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice." Theor Appl Genet **122**: 1005-1016.
- Shulaev, V., D. J. Sargent, et al. (2011). "The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*)." Nature Genetics **43**(2): 109-U151.
- Silfverberg-Dilworth, E., C. L. Matasci, et al. (2006). "Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome." Tree Genetics and Genomes **2**: 202-224.
- Solovchenko, A. and M. Merzlyak (2003). "Optical properties and contribution of cuticle to UV protection in plants: experiments with apple fruit." Photochemical & Photobiological Sciences **2**: 861-866.
- Song, Y., Y.-X. Yao, et al. (2007). "Polyphenolic Compound and the Degree of Browning in Processing Apple Varieties." Agricultural Sciences in China **6**(5): 607-612.

- Song, Y., Y.-X. Yao, et al. (2007). "Polyphenolic Compound and the Degree of Browning in Processing Apple Varieties." *Agric Sci China* **6**(5): 607-612.
- Spanos, G. A., R. E. Wrolstad, et al. (1990). "Influence of Processing and Storage on the Phenolic Composition of Apple Juice." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**: 1572-1579.
- Stobiecki, M. and P. Kachlicki (2006). Isolation and Identification of Flavonoids. *The Science of Flavonoids*. E. Grotewold. Columbus: 24.
- Stoeckli, S., K. Mody, et al. (2008). "QTL analysis for aphid resistance and growth traits in apple." *Tree Genetics and Genomes* **4**: 833-847.
- Sturtevant, A. H. (1913). "The linear arrangement of six sex-linked factors in Drosophila, as shown by their mode of association." *Journal of Experimental Zoology* **14**: 43-59.
- Suarez, B., A. Picinelli, et al. (1998). "Changes in Phenolic Composition of Apple Juices by HPLC with Direct Injection." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **78**: 461-465.
- Sumbali, G. and R. S. Mehrotra (1981). "Influence of post harvest fungal infections on the phenolic contents of Apple, Pear and Peach fruits." *National Academy of Science Letters* **4**(10): 393-396.
- Sun, J., Y.-F. Chu, et al. (2002). "Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 7449-7454.
- Sun, J. and R. Hai Liu (2008). "Apple Phytochemical Extracts Inhibit Proliferation of Estrogen-Dependent and Estrogen-Independent Human Breast Cancer Cells through Cell Cycle Modulation." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 11661-11667.
- Szankowski, I., H. Flachowsky, et al. (2009). "Shift in polyphenol profile and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple (*Malus sp.*)." *Planta* **229**: 681-692.
- Takos, A. M., F. W. Jaffe, et al. (2006). "Light-Induced Expression of a MYB Gene Regulates Anthocyanin Biosynthesis in Red Apples." *Plant Physiology* **142**: 1216-1232.
- Tavernier, J. and P. Jacquin (1959). *Etude technologique de variétés de pommes à cidre*. Paris, Comité des fruits à cidre et des productions cidricoles.
- Thebaudin, J. Y., A. C. Lefebvre, et al. (1997). "Dietary fibres: nutritional and technological interest." *Trends in Food Science and Technologie* **8**(2): 41-48.
- Tomankova, K., L. Luhova, et al. (2006). "Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon spp.* and *Oidium neolycopersici*." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**: 22-32.
- Travers, I. (2004). Influence des conditions pédoclimatiques du terroir sur le comportement du pommier et la composition des pommes à cidre dans le Pays d'Auge, Caen/Basse-Normandie: 174.
- Treutter, D. (2001). "Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple." *Plant Growth Regulation* **34**: 71-89.
- Tsao, R. and R. Yang (2003). "Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* **1018**: 29-40.
- Tsao, R., R. Yang, et al. (2003). "Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)." *J Agric Food Chem* **51**(21): 6347-6353.

- Tsao, R., R. Yang, et al. (2003). "Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(21): 6347-6353.
- Ubi, B. E., C. Honda, et al. (2006). "Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: Effect of UV-B and temperature." Plant Science **170**: 571-578.
- Van der Sluis, A., M. Dekker, et al. (2001). "Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple: Effect of Cultivar, Harvest Year, and Storage Conditions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(8): 3606-3613.
- Van Ooijen, J. W. (2006). JoinMap 4: software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. P. R. I. B. V. a. K. B.V. Wageningen, Netherlands: 63.
- Van Ooijen, J. W., M. P. Boer, et al. (2002). MapQTL 4.0: software for the calculation of QTL positions on genetic maps. . P. R. I. B.V. Wageningen, Netherlands.
- Vaughn, K. C., A. R. Lax, et al. (1988). "Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function." Physiologia Plantarum **72**(3): 659-665.
- Vauzour, D., A. Rodriguez-Mateos, et al. (2010). "Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action." Nutrients **2**(11): 1106-1131.
- Velasco, R., A. Zharkikh, et al. (2010). "The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.)." Nature Genetics **42**(10): 833-839.
- Veyrieras, J.-B., B. Goffinet, et al. (2005). MetaQTL, INRA: 65.
- Volz, R. K. and T. K. McGhie (2011). "Genetic variability in apple fruit polyphenol composition in *Malus x domestica* and *Malus sieversii* germplasm grown in New Zealand." J Agric Food Chem **59**: 11509-11521.
- Volz, R. K. and T. K. McGhie (2011). "Genetic variability in apple fruit polyphenol composition in *Malus x domestica* and *Malus sieversii* germplasm grown in New Zealand." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**: 11509-11521.
- Voorrips, R. E. (2002). "MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs." The Journal of Heredity **93**(1): 77-78.
- Weaver, L. M. and K. M. Herrmann (1997). "Dynamics of the shikimate pathway in plants " Trends in Plant Science **2**(9): 346-351.
- Weingerl, V., M. Strlic, et al. (2009). "Comparison of Methods for Determination of Polyphenols in Wine by HPLC-UV/VIS, LC/MS/MS and Spectrophotometry." Acta Chimica Slovenica **56**: 698-703.
- Weisshaar, B. and G. I. Jenkins (1998). "Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation." Current Opinion in Plant Biology **1**: 251-257.
- Will, F., K. Schulz, et al. (2002). "The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice." International Journal of Food Science and Technology **37**: 653-660.
- Winkel, B. S. J. (2006). The Biosynthesis of Flavonoids. The Science of Flavonoids. E. Grotewold. Columbus: 26.
- Wojdylo, A., J. Oszmianski, et al. (2008). "Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties." J Agric Food Chem **56**(15): 6520-6530.
- Wojdylo, A., J. Oszmianski, et al. (2008). "Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(15): 6520-6530.

- Xie, X.-B., S. Li, et al. (2012). "The bHLH transcription factor MdbHLH3 promotes anthocyanin 1 accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples." Plant, Cell and Environment **35**(11): 1884-1897.
- Zanchi, D., P. V. Konarev, et al. (2009). "Rigidity, conformation, and solvation of native and oxidized tannin macromolecules in water-ethanol solution." J Chem Phys **130**(24): 245103.
- Zanchi, D., P. V. Konarev, et al. (2009). "Rigidity, conformation, and solvation of native and oxidized tannin macromolecules in water-ethanol solution." The Journal of Chemical Physics **130**(24): 245103.
- Zhang, Y., Y.-P. Yan, et al. (2010). "The Arabidopsis PAP1 Transcription Factor Plays an Important Role in the Enrichment of Phenolic Acids in *Salvia miltiorrhiza*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**: 12168-12175.
- Zhao, J. and R. A. Dixon (2009). "The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport." Trends in Plant Science **15**(2): 72-80.

Communications orales et posters de congrès

- Dare, communication orale ICP2012.** Dare, A.P., McGhie, T.K., Tomes, S., Greenwood, D.R., Hellens, R.P., 2012. Understanding the biosynthesis of phloridzin in apple. XXVIth International Conference on Polyphenols. Florence (Italy), 23th-26th July 2012. (oral communication).
- Lasserre-Zuber, poster RGC5.** Lasserre-Zuber P., Caffier V., Le Cam B., Durel C.E., 2010. Apple scab resistance gene pyramiding assessed in a French network of experimental orchards: Combinations of major and minor resistance factors exhibit differential efficiencies over time and space. 5th International Rosaceae Genomics Conference. Stellenbosch (South Africa), 14th-17th Novembre 2010. (poster).
- Martens, poster RGC6.** Martens, S., Herrera, A.L., Ibdah, M., Lewinsohn, E., Gang, D.R., 2012. Identification of the biosynthetic key step leading to the biosynthesis of dihydrochalcones in apple (*Malus x domestica* borkh.). 6th Rosaceous Genomics Conference. Mezzocorona (Italy), 30th September-4th October 2012. (poster).

Sites Internet

- Agreste, 2011.** Site Internet du ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire. Thématique fruits, légumes, viticulture et horticulture. <http://agreste.agriculture.gouv.fr/thematiques/productions-vegetales/fruits-legumes-viticulture>
- AICV, 2011.** Site Internet de l'association des industries des cidres et vins de fruits de l'Union Européenne. <http://www.aicv.org>
- Commission Européenne, 2011.** Site Internet de la Commission Européenne. Portail de la santé publique de l'Union Européenne. http://ec.europa.eu/health-eu/doc/alcoholineu_sum_fr_en.pdf
- CRL, 2011.** Site Internet du Centre Régional des Lettres de Basse-Normandie. Guide pratique de la production et de la fabrication des cidres et poirés (par les établissements Simon

- Frères_Cherrybourg). <http://www.normannia.info/cgi-bin/aurweb.exe/normannia/rechpdoc?idn=simonfreres1904.html>
- FAO, 2012.** Site Internet de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Espace statistiques, FAOSTAT, partie « Parcourir les données par ». http://faostat3.fao.org/home/index.html?#VISUALIZE_BY_DOMAIN
- Food-allergens, 2012.** Site Internet du symposium sur les allergènes alimentaires. Espace « Allergen Data Collections », fiche : Apple (*Malus domestica*), chapitre 5 : Composition of Apple. <http://www.food-allergens.de/>.
- GDR, 2012.** Site Internet consacré aux données de séquences des Rosaceae (Genome Database for Rosaceae). <http://www.rosaceae.org/>
- GNIS, 2011.** Site Internet du groupement national interprofessionnel des semences et plants. Espace enjeux : dossier recherche et création variétale, de nouveaux défis. <http://www.gnis.fr/index/action/page/id/99/title/Recherche-et-creation-varietale-de-nouveaux-defis>
- HiDRAS, 2012.** Site Internet du programme Européen pour l'amélioration de la résistance des variétés de pomme. Espace « Markers & Maps ». <http://www.hidras.unimi.it/>
- IFPC, 2011.** Site Internet de l'institut français des productions cidricoles. Espace infos techniques : les variétés de pomme à cidre. <http://www.ifpc.eu/infos-techniques/verger-et-materiel-vegetal/les-varietes-de-pommes-a-cidre>
- Lamondlab, 2011.** Site Internet du laboratoire Angus Lamond. Espace « the cell biologist's guide to proteomics ». <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayionisation.php>
- Lapomme, 2011.** Site Internet de l'association nationale des pommes et poires. <http://www.lapomme.org>
- PNNS, 2012.** Site Internet du Programme National Nutrition Santé. <http://www.mangerbouger.fr/>
- RosBREED, 2012.** Site Internet du projet international RosBREED. <http://www.rosbreed.org/>
- UPMC, 2011.** Site Internet de l'Université Pierre et Marie Curie. Dossier fruits et légumes du marché : la pomme. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Marche/pomme>
- Viniflor, 2011.** Site Internet de l'office national interprofessionnel des fruits, des légumes, des vins et de l'horticulture. Espace vin, filière cidricole. <http://www.onivins.fr/EspacePro/Cidre/Index>
- WAPA, 2011.** Site Internet de l'association des pommes et poires du monde (World Apple and Pear Association). Espace « Facts and Figures » : « Crop Forecast ». http://www.wapa-association.org/docs/2010/Facts_and_Figures/EU_Apple_Pear_Forecast_-_update_December_2010

KEGG, 2012. Site Internet de l'encyclopédie des gènes et génomes de Kyoto. Espace « KEGG PATHWAY » : « Biosynthesis of Other Secondary Metabolites ».
<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html#secondary>

Thèse de Doctorat

Cindy VERDU

Cartographie Génétique des Composés Phénoliques de la Pomme

Résumé

En lien avec leur potentiel antioxydant, les composés phénoliques sont généralement associés à l'effet protecteur sur la santé d'une alimentation riche en fruits et légumes. Ils sont également fortement associés à la qualité organoleptique des cidres puisqu'ils affectent directement leur astringence, leur amertume, leur couleur et leurs arômes. Deux études ont récemment été publiées sur la détection de QTL des composés phénoliques des pommes de table. Aucune étude n'a encore été publiée pour les pommes à cidre, réputées pour leur forte teneur en composés phénoliques. L'objectif de cette thèse est d'identifier les régions génétiques impliquées dans la teneur en composés phénoliques d'une descendance de pommiers à cidre. Dans un premier temps, deux méthodes de quantification ont été développées et comparées en UHPLC-UV et UHPLC-MS/MS pour les principaux composés phénoliques du jus de pomme. Bien qu'il y ait des surestimations avec l'un des détecteurs pour certains composés, ces deux méthodes corrélaient très fortement. Des dosages ont également été réalisés sur fruit entier à l'INRA de Rennes. Une grande variabilité a été observée pour les fruits et les jus de cette descendance, représentative des principales variétés de pommes à cidre cultivées en Europe. 48 QTL ont été détectés sur neuf groupes de liaison (LG). Neuf clusters semblent particulièrement stables, indépendamment de l'année ou du matériel (fruit ou jus) étudié. Les enzymes de la biosynthèse des composés phénoliques et leurs facteurs de transcription ont été ciblés pour l'identification des gènes candidats, réalisée *in silico* au niveau des principaux QTL. Ces travaux proposent de nouvelles cibles pour la sélection assistée par marqueurs comme le QTL pour l'acide chlorogénique du LG17 pour l'amélioration des variétés de pommes à cidre.

Mots-clés :

Malus x domestica, pommes à cidre, flavanol, acide hydroxycinnamique, flavonol, dihydrochalcone, anthocyanine, LC-UV, LC-MSⁿ, QTL, marqueurs moléculaires, gènes candidats.

Abstract

In relation to their antioxidant potential, phenolic compounds are usually associated with a protective effect on the human health of a diet rich in fruits and vegetables. They are also widely associated to the organoleptic quality of ciders since they affect bitterness, astringency, color and aroma. Two studies have recently been published on QTL detection for the phenolic content of dessert apple. No study has yet been published for cider apple, even though they are usually more concentrated in phenolic compounds. The objective of this work was to identify genomic regions involved in the phenolic content for a cider apple progeny. In a first time, two quantification methods were developed and compared in UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS for major phenolic compounds in juices. Even overestimation of some compounds with one detector were observed, these two methods were highly correlated. Phenolic compounds of whole fruits were also quantified at the INRA station of Rennes. A high variability was observed in both fruits and juices of this progeny, representative of major cider apple varieties grown in Europe. 48 QTL were detected on nine linkage groups (LG). Nine clusters seem particularly stable according to the year or material study. Enzymes of the polyphenol pathway and transcription factors were targeted as candidate gene and identified *in silico* under major QTL. This work offers new targets for the marker-assisted selection like the QTL for chlorogenic acid on LG17 to improve cider apple varieties.

Keywords:

Malus x domestica, cider apples, flavanol, hydroxycinnamic acid, flavonol, dihydrochalcone, anthocyanin, LC-UV, LC-MSⁿ, QTL, molecular markers, candidate genes.