



HAL
open science

Etude des réseaux de régulation de gènes qui gouvernent l'élaboration de la texture de la pomme

Sandrine Mikol-Segonne

► **To cite this version:**

Sandrine Mikol-Segonne. Etude des réseaux de régulation de gènes qui gouvernent l'élaboration de la texture de la pomme. Horticulture. Agrocampus Ouest, 2015. Français. NNT : 2015NSARI073 . tel-01534091

HAL Id: tel-01534091

<https://theses.hal.science/tel-01534091>

Submitted on 7 Jun 2017

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.

AGRO CAMPUS

OUEST

l'université
nam nantes
angers
le mans

PÔLE DE RECHERCHE ET D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

Sandrine MIKOL-SEGONNE • 12 mars 2015

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Biochimie - Biologie Moléculaire et cellulaire

ÉCOLE DOCTORALE • Végétal, Environnement, Nutrition,
Agroalimentaire, Mer (VENAM)
LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR 1345 Institut de Recherche en
Horticulture et Semences (IRHS)

**Etude des réseaux de
régulation de gènes qui
gouvernent l'élaboration de
la texture de la pomme**

Soulaiman SAKR

Professeur, AGROCAMPUS OUEST / *président et examinateur*

Jérôme PELLOUX

Professeur d'Université, Université de Picardie / *rapporteur*

Christophe ROTHAN

Directeur de recherche, INRA de Bordeaux / *rapporteur*

Daniel SARGENT

Senior Scientist, Institut FEM-IASMA, Italie / *examineur*

Jean-Pierre RENOUE

Directeur de recherche, IRHS / *directeur de thèse*

N° ordre : 2015-6

N° Série : I-73

THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans

pour obtenir le diplôme de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES,
AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE**

Spécialité : « Biologie cellulaire et moléculaire végétale »

Ecole Doctorale : « Végétal, Environnement, Nutrition, Agro-Alimentaire, Mer »

présentée par :

Sandrine MIKOL-SEGONNE

ETUDE DES RESEAUX DE REGULATION DE GENES QUI GOUVERNENT L'ELABORATION DE LA TEXTURE DE LA POMME

Soutenue le 12 mars 2015 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

Jérôme Pelloux , Professeur d'Université, Université de Picardie	Rapporteur
Christophe Rothan , Directeur de recherche, INRA de Bordeaux	Rapporteur
Soulaiman Sakr , Professeur d'Université, Agrocampus-Ouest	Examineur
Daniel Sargent , Senior Scientist, Institut FEM-IASMA, Italie	Examineur
Jean-Pierre Renou , Directeur de l'IRHS	Directeur de thèse

INRA-UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences
Centre Angers-Nantes - France

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, pris part à ce travail et avec qui j'ai partagé des moments de science et de convivialité pendant ces 3 années.

Un grand merci

A **Jean-Pierre**, mon directeur de thèse de m'avoir fait confiance. Merci pour tes conseils et ton soutien, de m'avoir guidée tout au long de ce travail et d'avoir toujours su garder ta porte ouverte (au sens propre et figuré d'ailleurs !) malgré ton emploi du temps bien rempli.

A **Mathilde** pour tes innombrables conseils scientifiques et pour ton soutien tout au long de ces trois années.

A **François** mon chef d'équipe et ancien responsable qui m'a permis et encouragée à réaliser cette thèse.

A tous les membres de mon jury qui ont accepté de juger ce travail : **Jérôme Pelloux, Christophe Rothan, Soulayman Sakr et Daniel Sargent.**

A **Jean-Marc** d'avoir eu la patience de répondre à mes questions, d'avoir dissipé les périodes de doutes et pour tous les « coups de main » que tu m'as donnés. Merci également pour ta bonne humeur quotidienne !

A **Sandra** sans qui les analyses transcriptomiques seraient beaucoup moins faciles, à **Sylvain G.** pour m'avoir éclairé sur cette « fameuse » séquence génomique du pommier et à **Fabrice** qui a toujours répondu avec plaisir à mes questions autour de R et des statistiques.

A tous les « petits rats de laboratoire » avec qui j'ai pu partager de grandes conversations plus ou moins sérieuses à savoir **Maryline, Raphaël, Julien, Marie-Charlotte, Anne-Sophie, Christophe, Caroline et Elisa.** Merci pour vos conseils scientifiques et pratiques !

Merci au plateau ANAN et surtout à **Muriel** pour sa patience malgré tous les problèmes rencontrés avec le scanner...

A notre fine équipe de dégustateurs sans qui toutes ces études ne seraient pas possibles. Merci à **Roland, Maryline, Fabrice, Raphael, Fabienne** et **Sylvain H.**

A toute l'équipe Fruitqual d'avoir permis la réalisation de ce travail : pour vos contributions passées dans les analyses et notations antérieures et pour votre aide dans les récoltes. Merci notamment à **Roland, Maryline, Sylvain H.** et **Christian**. Merci à **Mickaël** pour la relecture de ce manuscrit.

Aux spécialistes de la microscopie présents sur le plateau IMAC qui ont contribué à la réalisation de toutes ces belles images malgré les difficultés rencontrées ! Merci à **Marjorie** et **Fabienne**.

A tous les « Nantais » de BIA (INRA, Nantes) de m'avoir suivie, pour votre aide ainsi que de m'avoir toujours accueillie dans la bonne humeur. Je remercie en particulier **Marc, Estelle, Sophie, Mathilde, Axelle** et **Jacqueline**.

A mon comité de suivi de thèse d'avoir suivi l'état d'avancement de mes travaux et de m'avoir conseillée judicieusement tout au long de ces trois années. Merci à **Marie-Christine Ralet, Mondher Bouzayen, Bertrand Dubreucq** et **François Guérineau**.

A toute l'équipe administrative pour son efficacité et sa disponibilité. Merci à **Lylia, Patricia R., Patricia V., Sylvie** et **Valérie L.** Un merci particulier à **Anne** qui n'est plus là pour partager ce moment mais qui a toujours répondu présente quel que soit l'heure (du jour ou de la nuit !). Et faut dire qu'on t'en a fait voir de toutes les couleurs ! Merci pour ta bonne humeur et pour ta force de caractère qui devrait être un exemple pour tous.

A **Alain Vian** de m'avoir permis de faire du monitorat et de tester mes capacités pédagogiques ainsi que ma patience !

A la **Région Pays de la Loire** d'avoir financé ces travaux de recherche.

A tous les doctorants, CDDs et post-doctorants qui sont passés dans le labo et qui ont contribué à la bonne humeur quotidienne. Merci à **Ines, Cindy et Marie** pour les conseils de « doctorantes ». Merci à **Mathilde, Magali, Marie-Charlotte, Anne-Sophie, Clément, Matthieu, Tatiane, Isadora**. (C'est dingue ce qu'il y a comme filles dans ce labo !). Un merci particulier à **Manue**, la Vilaine pour ta bonne humeur, ton franc-parler et ton imagination débordante.

A **Diane**, « compagnon de galère » ! Trois ans à partager le même bureau, les mêmes déboires personnels et professionnels (pas tous mais un peu trop quand même !). Je t'ai vu grandir et murir : qui aurait cru cela possible ;-) Merci pour ta joie de vivre, ton « sens du critique », ton soutien et ta générosité. Merci également pour ce don de pâtissière que tu as développé et qui nous a régalé (je pense que je parle sans me tromper au nom de tout le bâtiment B !). Merci pour ta relecteur minutieuse, à la virgule près.

A **Arnaud G**, sans qui la manip diversité n'aurait pas été possible ! Merci pour ton amitié et tes encouragements durant toutes ces années !

A tous les membres de l'IRHS et tout particulièrement à ceux du bâtiment B. Merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse et votre soutien. Merci tout particulièrement à **Bernard et François**, mes anciens acolytes.

J'ai enfin une pensée pour ma famille et mes amis pour leur soutien durant ces 3 années. Merci « aux grands-mères » d'avoir répondu présent dans les moments décisifs. Merci à Frédéric pour tes encouragements, ta patience, ton soutien et pour tout le reste. Tu sais ce que tout cela signifie. J'ajouterai une pensée pour ma fille, qui sans le savoir, a été d'un grand soutien.

A mon père

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX	IV
LISTE DES ABBREVIATIONS	VI
<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	<u>1</u>
<u>CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	<u>5</u>
1 LE POMMIER.....	6
1.1 PARTICULARITES BIOLOGIQUES DU POMMIER.....	6
1.2 L'ANATOMIE DU FRUIT	7
1.3 LE DEVELOPPEMENT DU FRUIT	8
2 LA TEXTURE DU FRUIT	10
2.1 DEFINITION.....	10
2.2 EVOLUTION DE LA TEXTURE AU COURS DE LA CONSERVATION.....	11
2.2.1 La perte de fermeté ou « softening »	11
2.2.2 La farinosité.....	11
2.3 EVALUATION DE LA TEXTURE	12
2.3.1 L'analyse sensorielle.....	12
2.3.2 Les méthodes d'analyses physiques.....	13
2.4 LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX INFLUENÇANT LA TEXTURE DU FRUIT	14
2.4.1 Les conditions de culture	14
2.4.2 Les conditions post-récolte	15
3 LES DEUX COMPOSANTES PRINCIPALES ASSOCIEES AUX EVOLUTIONS TEXTURALES EN COURS DE CONSERVATION	17
3.1 LA PAROI PRIMAIRE, UN ACTEUR MAJEUR DANS LA QUALITE TEXTURALE.....	17
3.1.1 Structure et composition de la paroi cellulaire.....	17
3.1.2 Modification de la paroi au cours de la maturation du fruit.....	21
3.1.3 Implication de la pression de turgescence.....	24
3.2 LA REGULATION HORMONALE DE LA MATURATION.....	25
3.2.1 Le rôle de l'éthylène.....	25
3.2.2 Le rôle des autres phytohormones	27
4 LES BASES MOLECULAIRES DE LA TEXTURE DE LA POMME.....	29
4.1 LES APPORTS DES ETUDES GENETIQUES CHEZ <i>MALUS X DOMESTICA</i>	29
4.2 LES APPORTS DE LA GENOMIQUE FONCTIONNELLE.....	30
4.3 SEQUENÇAGE DU POMMIER ET DEVELOPPEMENT DE LA PUCE ARYANE v1.....	31
4.3.1 Le séquençage du pommier	31
4.3.2 La puce AryANE v1.0	32
5 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	34

CHAPITRE II : ANALYSE MULTI-DIMENSIONNELLE DE LA FARINOSITE 36

CONTEXTE.....	37
1 INTRODUCTION	41
2 MATERIALS AND METHODS.....	43
2.1 PLANT MATERIAL AND FRUIT SAMPLING	43
2.2 SENSORY AND INSTRUMENTAL TEXTURE ANALYSES.....	43
2.3 CRYO-SCANNING ELECTRON MICROSCOPY	44
2.4 CELL COHESION TEST.....	44
2.5 AIM EXTRACTION	45
2.6 PECTIN ENZYMATIC PROFILING.....	45
2.7 GALA CONTENT AND DEGREE OF METHYLESTERIFICATION	46
2.8 RNA EXTRACTION, AMPLIFICATION AND MICROARRAY HYBRIDIZATION	46
2.9 MICROARRAY ANALYSES.....	47
2.10 RT-QPCR AND SEMI-QUANTITATIVE PCR	47
2.11 GENOME-WIDE IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF PME GENES IN <i>MALUS X DOMESTICA</i> GENOME	48
2.12 <i>MdPME2</i> FULL LENGTH CDNA CLONING.....	49
2.13 SUBCELLULAR LOCALIZATION BY TRANSIENT EXPRESSION IN <i>NICOTIANA TABACUM</i>	50
3 RESULTS	50
3.1 SENSORY EVALUATION OF FRUIT MEALINESS DURING STORAGE.....	50
3.2 FRUIT TEXTURE INSTRUMENTAL PHENOTYPE	51
3.3 TRANSCRIPTOME CHARACTERISTICS OF MEALY APPLES	52
3.4 CONSTITUTIVELY DEREGULATED GENES ASSOCIATED WITH MEALINESS.....	53
3.5 <i>MdPME2</i> CLONING AND THE APPLE PME FAMILY	54
3.6 <i>MdPME2</i> SUBCELLULAR LOCALIZATION.....	55
3.7 APPLE FRUIT PECTIN CHARACTERIZATION.....	56
4 DISCUSSION.....	57
4.1 A NOVEL TEST TO QUANTIFY MEALINESS.....	57
4.2 MOLECULAR CHARACTERIZATION OF APPLE MEALINESS.....	58
4.3 SPECIFIC ROLE OF A <i>MdPME2</i> GENE IN MEALINESS DEVELOPMENT	59
5 CONCLUSIONS	61
REFERENCES.....	62
FIGURES AND TABLES	68

CHAPITRE III : LES JASMONATES CONTROLENT LA FARINOSITE 89

CONTEXTE.....	90
1 INTRODUCTION	91
2 MATERIALS AND METHODS.....	93
2.1 PLANT MATERIAL AND PHENOTYPIC ANALYSES.....	93
2.2 MICROARRAY ANALYSIS.....	93
2.2.1 RNA extraction, RNA labeling and microarray hybridization	93
2.2.2 Data normalization.....	94
2.3 STATISTICAL ANALYSES	94
3 RESULTS	95

3.1	PHENOTYPIC DESCRIPTION OF THE CORE COLLECTION	95
3.1.1	Description at harvest stage.....	95
3.1.2	Mealiness development after two months of cold storage.....	96
3.2	A TWO STEPS ANALYSIS TO IDENTIFY CONTRASTED CLUSTERS FOR MEALINESS	97
3.2.1	Phenotypic selection to perform the transcriptomic analyses.....	97
3.2.2	Structural grouping based on a supervised multivariate approach.....	97
3.3	TRANSCRIPTIONAL PROFILING OF GENES ASSOCIATED WITH MEALINESS	98
3.3.1	Jasmonates biosynthesis pathway-related genes.....	99
3.3.2	Flavonoid biosynthesis pathway-related genes.....	99
3.3.3	Ethylene pathway-related genes.....	101
3.3.4	Cell wall-related genes	101
3.3.5	Calcium channel regulation.....	101
4	DISCUSSION.....	102
4.1	MEALINESS UNLINKED TO HARVEST TRAITS	102
4.2	THE CONTRIBUTION OF A MULTIVARIATE APPROACH	102
4.3	JASMONATES AS KEY REGULATORS OF MEALINESS DEVELOPMENT	103
4.3.1	Induction of JA pathway in non-mealy apples	103
4.3.2	Regulation of ethylene pathway by jasmonates.....	104
4.3.3	Flavonoids contribute to cell integrity in ripe apple fruits.....	106
4.3.4	A potential role in turgescence control.....	109
5	CONCLUSIONS	110
	REFERENCES.....	111
	TABLES.....	116

CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE.....128

1	EVALUATION QUANTITATIVE DE LA FARINOSITE.....	130
2	UNE NOUVELLE DEFINITION DE LA FARINOSITE	132
2.1	LA MATURATION, UN PROCESSUS A DEUX VITESSES	132
2.2	MATURATION OU SENESCENCE.....	133
2.3	PROPOSITION D'UNE NOUVELLE DEFINITION DE LA « FARINOSITE ».....	134
3	NOUVEAU CONTOUR MOLECULAIRE DE LA FARINOSITE.....	135
3.1	LES GENES DE PAROI, UN ROLE SUR-ESTIME ?.....	135
3.2	LES JASMONATES, NOUVEL ACTEUR MAJEUR DE LA MATURATION ?.....	135
3.3	L'IMPORTANCE DES MECANISMES POST-TRANSCRIPTIONNELS	136
4	UNE HETEROGENEITE DE MATURATION DES LA RECOLTE	138

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....142

ANNEXES

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

FIGURE 1. Schéma d'une coupe longitudinale (A) et transversale (B) d'une pomme.	7
FIGURE 2. Coupe schématique d'une section radiale de cortex de pomme.	7
FIGURE 3. Les principales phases de développement des fruits climactériques, caractérisées par l'augmentation du diamètre du fruit (growth), du taux de respiration (respiration rate) et de la production d'éthylène (ethylene production).	8
FIGURE 4. Les différents niveaux structuraux ayant un impact sur la texture de la pomme.	10
FIGURE 5. Perte de fermeté de pommes stockées à 0-5°C.	11
FIGURE 6. Observation microscopique de pommes farineuses et non farineuses au microscope optique à balayage.	12
FIGURE 7. Profil sensoriel et définition des descripteurs sensoriels utilisés au sein du laboratoire IRHS-FruitQual.	13
FIGURE 8. Modèle simplifié de la paroi cellulaire végétale.	17
FIGURE 9. Représentation schématique de fibres de celluloses, de la paroi cellulaire aux molécules de celluloses.	18
FIGURE 10. Représentation schématique de la structure des pectines.	20
FIGURE 11. Modèle décrivant la relation entre la production d'éthylène et l'expression de gènes associés à la paroi cellulaire au cours du mûrissement de la pomme.	26
FIGURE 12. Principaux changements hormonaux associés à la croissance et à la maturation des fruits climactériques.	27

CHAPITRE II : Analyse multi-dimensionnelle de la farinosité

FIGURE 1. Fruit firmness for individual hybrids evaluated by penetrometry.	77
FIGURE 2. Cryo-scanning electron micrographs of fractured apple parenchymes in 2012.	78
FIGURE 3. Distribution of differentially expressed genes between mealy and non-mealy hybrids during kinetic of fruit maturation.	79
FIGURE 4. Selection of differentially expressed genes involved in apple mealiness.	80
FIGURE 5. Expression patterns of <i>MdPME2</i> for each individual hybrid as determined by microarray analysis at four developmental stages (100 DAF, H, 60 DAH and 120 DAH).	82
FIGURE 6. <i>MdPME2</i> cloning and validation by semi-quantitative RT-PCR.	83
FIGURE 7. Hierarchical cluster analysis of the 60 PME genes expressions in both 3 pairs of hybrids during complete fruit kinetic using GENESIS software.	84
FIGURE 8. Subcellular localisation of the <i>MdPME2</i> -rfp fusion protein transiently expressed in <i>Nicotiana tabacum</i> leaves.	85
TABLE 1. Sensory evaluation of mealiness for individual hybrids.	86
ADDITIONAL FILE 1. Results of cell cohesion test.	87

ADDITIONAL FILE 2. Differentially expressed genes of pairs 1 and 2 which displayed similar expression patterns at one or more fruit development stages.	87
ADDITIONAL FILE 3. Validation of microarrays results by quantitative real-time PCR (RT-qPCR).	88
ADDITIONAL FILE 4. Ethylene measurements during storage.	89
ADDITIONAL FILE 5. Sequence alignments.	90
ADDITIONAL FILE 6. Evolutionary relationships between 60 apple PMEs.	90
ADDITIONAL FILE 7. Degree of methylesterification (DM) of apple cell walls (2009, 2010) for mealy (M40, M74) and non-mealy hybrids (M20, M49) during the kinetic.	91
ADDITIONAL FILE 8. Pectin enzymatic profiling results.	92
ADDITIONAL FILE 9. IM population within HiDRAS pedigree.	96
ADDITIONAL FILE 10. List of primers used for RT-qPCR and cloning.	97

CHAPITRE III : Les jasmonates contrôlent la farinosité

FIGURE 1. PCA of sensory data at harvest on the 95 cultivars.	104
FIGURE 2. Sensory profiles of the 95 cultivars at harvest sorted out following their harvest date.	104
FIGURE 3. PCA of morphological traits on 95 cultivars.	105
FIGURE 4. Dispersion graph of the correlation between mealiness and cell cohesion test results.	105
FIGURE 5. Graphical representation of the 40 individuals with the two latent variables associated to the expression dataset obtained by PLS-DA.	106
FIGURE 6. Graphical representation of the 34 individuals with the two latent variables associated to the expression dataset obtained by PLS-DA.	106
FIGURE 7. Classification error rates (10 cross-validation averaged 20 times) with respect to each PLS-DA dimension.	107
FIGURE 8. Schematic representation of the jasmonates biosynthesis pathway with box plots for genes that displayed differential expression patterns between NM, Md and M apples. Adapted from Wasternack (2007)	108
FIGURE 9. General framework of the flavonoid pathway. Boxplots indicated mean intensities for each group (1: NM, 2: Md, 3: M). Adapted from Martens <i>et al.</i> (2010)	109
FIGURE 10. Schematic representation of the ethylene biosynthesis and signaling pathways with box plots for genes that displayed differential expression patterns between NM, Md and M apples.	110
FIGURE 11. A model of apple mealiness development with JA as key regulator of mealiness.	113
TABLE 1. Mealiness results after two months of cold storage.	125
TABLE 2. List of identified genes and their functional annotations.	126
ADDITIONAL FILE S1. List of all phenotypic traits analyzed at H and 60DAH.	127
ADDITIONAL FILE S2. Spearman's correlation coefficients between sensory and morphological mean values at harvest.	128
ADDITIONAL FILE S3. 643 selected genes based on Kruskal-Wallis results.	129

LISTE DES ABBREVIATIONS

1-MCP	1-methylcyclopropene
[Ca ²⁺] _{cyt}	cytosolic free calcium concentration
13-HPOT	(13S)-hydroperxyoctadecatrienoic acid
4CL	4-coumarate-CoA ligase
ACO	ACC oxydase
ACP / PCA	analyse en composante principal / principal component analysis
ACS	ACC synthase
ACX	acyl-CoA oxidase
ADN / DNA	acide désoxyribonucléique / desoxyribonucleic acid
ADNc	ADN complémentaire
AIM	alcohol insoluble material
AOC	allene oxine cyclase
AOS	allene oxide synthase
ARN/ RNA	acide ribonucléique / ribonucleic acid
AS	anti-sens / anti-sense
bHLH	basic helix-loop-helix
C4H	cinnamate 4-hydroxylase
CHS	chalcone synthase
COI	coronatine-insensitive
CPK	calcium-dependant protein kinase
DAF	jours après floraison / days after flowering
DAH	jours après récolte / days after harvest
DM	degré de méthylestérification / degree of methylesterification
EBF	EIN3-binding-F-box
EST	expressed sequence tag
ETR	ethylene response receptor
EXP	expansine
GalA	galacturonic acids
GSH	glutathione
GT	glycosyltransferase
H	récolte / harvest
HDA	histone deacetylase
HG	homogalacturonans
Ica	calcium ion channels
JA	jasmonates
JA-Ile	jasminate acid-isoleucine
JAR	JA-amino acid synthase
JAZ	jasmonate zim domain
KW	kruskal-wallis
LG	groupe de liaison

LOX	lipooxygenase
M	mealy
Mb	millions de paires de bases
Md	mealy in development
MeJA	methyl-jasmonate
Nat-siRNA	natural small interfering RNA
NM	non-mealy
OPDA	12-oxophytodienoic acid
OPR	OPDA reductase
PA	proanthocyanidins
PC	principal component
PCR	polymerase chain reaction
PG	polygalacturonase
PL	pectate lyase
PLS-DA	partial least square – discriminant analysis
PME	pectin methylesterase
QTL	quantitative trait loci
RGs	rhamnogalacturonans
ROS	reactive oxygen species
RT-qPCR	real-time quantitative PCR
S	sense
SOD	superoxide dismutases
sPLS-DA	sparse PLS-DA
WAK	wall associated kinase
WAKL	WAK like
XET	xyloglucanes endotransglycosylases
XTH	xyloglucanes endotransglycosylases/hydrolases

INTRODUCTION GENERALE

La population associe couramment une alimentation saine et équilibrée à la consommation de fruits et légumes. La pomme, par exemple, connue pour ses qualités nutritionnelles grâce à une teneur élevée en polyphénols, est le fruit le plus consommé en France avec près de 18 kg par an et par ménage. La production française de pommes est estimée à 1 737 tonnes en 2013 (Agrimer, 2014), plaçant la France au rang de troisième producteur européen, derrière la Pologne et l'Italie. Plus de 80% de cette production est destinée au marché frais, le reste à la transformation.

La qualité organoleptique de la pomme est une notion primordiale pour le consommateur et par conséquent, pour les producteurs, les metteurs en marché et les distributeurs. La qualité organoleptique fait référence à tous les sens : le visuel, avec l'aspect extérieur, le goût et l'odorat au travers des saveurs perçues (l'acidité, le sucré, les arômes...), la perception tactile en bouche au travers de la texture (fruit ferme, fondant, juteux...), mais également l'ouïe, avec le croquant du fruit. De nombreuses études sensorielles ont montré que la texture est un des critères les plus importants pour le consommateur (Jaeger *et al.*, 1998; Symoneaux *et al.*, 2012). C'est pourquoi l'étude de la texture du fruit constitue un objectif majeur pour toute la filière. La texture est un caractère complexe qui fait référence à de nombreux descripteurs sensoriels tels que le croquant, la jutosité, la fermeté, le fondant ou la farinosité. Parmi ces descripteurs, certains sont rejetés par le consommateur tels que la farinosité, considérée comme un défaut textural majeur. L'ensemble de ces descripteurs texturaux évoluent au cours du développement du fruit et sont soumis à différents facteurs de variabilité intrinsèques, liés aux génotypes cultivés, et exogènes, regroupant les facteurs environnementaux en production (*e.g* climat, sol) et les facteurs liés à l'itinéraire cultural et à la gestion des produits en post-récolte (conduite de l'arbre, conditions de stockage). La complexité de la texture liée à la multiplicité de ses descripteurs et de ses facteurs de variabilité rend alors difficile son étude de manière globale et explique pourquoi la plupart des recherches réalisées ciblent souvent sur un seul descripteur, le plus souvent la fermeté, et l'étude d'un ou deux génotypes. Parmi ces études, un nombre important a pour objectif de comprendre comment la texture du fruit se met en place et évolue, en particulier sa fermeté, et quelles voies métaboliques sont à l'origine des désordres texturaux. Ainsi, les études réalisées sur les espèces modèles telles que la tomate (*Solanum lycopersicon L*) et la fraise (*Fragaria vesca L*) contribuent à une meilleure compréhension des processus impliqués. Cependant, des différences majeures entre ces espèces limitent le transfert des connaissances d'une espèce à une autre. Effectivement, la fraise est le modèle des fruits non climactériques alors que la tomate, modèle des fruits

climactériques (comme la pomme), présente notamment une perte de fermeté très différente de celle de la pomme, suggérant la mise en jeu de voies métaboliques différentes. Pour ces différentes raisons, les connaissances des bases biologiques et génétiques de la texture de la pomme restent encore très parcellaires.

Le récent décryptage de la séquence complète du génome du pommier (Velasco *et al.*, 2010) a permis le développement de la première puce d'expression couvrant l'ensemble des gènes annotés du pommier (Celton, Gaillard *et al.*, 2014 ; projet AryANE-v1, financement INRA-Région Pays de Loire 2010). Celle-ci constitue un outil adéquat que j'ai utilisé au cours de ma thèse, afin d'aborder l'étude fonctionnelle des déterminants de la texture de la pomme. Compte tenu de la difficulté à intégrer l'aspect multi-descripteur de la texture, nous sommes particulièrement intéressés à la farinosité qui est un caractère textural très dépréciatif pour le consommateur. Cette thèse a ainsi pour principal objectif de mieux comprendre les bases moléculaires liées au développement de la farinosité. Cette analyse a pour finalité d'identifier des gènes potentiellement marqueurs de la farinosité pouvant servir au criblage des lots de pommes pour les sélectionneurs, les producteurs ou les metteurs en marché.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'état des connaissances sur la texture de la pomme et plus particulièrement la perte de fermeté et le développement du caractère farineux. Dans un premier temps, elle a pour objectif de souligner la complexité de ce caractère et de présenter l'ensemble des facteurs dont elle dépend. Dans un second temps, l'état des connaissances concernant son déterminisme cellulaire et moléculaire sera présenté.

A la suite de l'étude bibliographique, la deuxième partie, présentée sous la forme d'un article scientifique, se décompose en deux axes. Tout d'abord, il a pour objectif de présenter un nouveau test de criblage phénotypique permettant d'évaluer la farinosité d'une façon quantitative et non sensorielle, comme cela est le plus couramment réalisé. Cela m'a d'ailleurs amenée à préciser ce qu'est le phénotype farineux, trop souvent assimilé au caractère de perte de fermeté ou « softening », alors qu'il peut en être distingué. D'autre part, il a pour objectifs l'identification et l'étude d'un gène impliqué dans la structuration de la paroi végétale. Ce gène apparaît comme un marqueur moléculaire précoce de la farinosité au sein de six génotypes, issus d'une population ségrégeant pour ce caractère.

Dans un second chapitre, l'objectif est d'élargir cette étude moléculaire à un set de 34 cultivars. Cette étude a pour objectif, en s'affranchissant de la notion de fond génétique, d'identifier de nouvelles voies métaboliques et de nouveaux gènes candidats associés au

développement de la farinosité au cours de la conservation. De nouvelles pistes d'explications moléculaires du développement de ce phénotype sont proposées.

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

- **Communications dans des congrès internationaux à comité de lecture :**

Mikol S, Bruneau M, Gourdon C, Celton J-M, Orsel M, Laurens F et Renou J-P, 2012. Deciphering apple fruit mealiness, a transcriptomal approach. Sixth Rosaceae Genomics Conference, 30-4 Octobre 2012, Trento, Italie. *Poster*.

Mikol S, Bruneau M, Celton J-M, Orsel M, Delaire M, Juchaux M, Laurens F et Renou J.-P, 2013. Genome wide analysis reveals WAK and PME implications in textural default of apple fruit. The XIIIth Cell Wall Meeting, 7-12 Juillet 2013, Nantes, France. *Poster*.

Mikol S, Bruneau M, Celton J-M, Le Gall S, Boudier A, Francin-Allami M, Juchaux M, Laurens F, Orsel M et Renou J-P, 2014. Global transcriptome analysis reveals the implication of one PME gene in apple mealiness development. Seventh Rosaceae Genomics Conference, 24-26 Juin 2014, Seattle, Etats-Unis. *Communication orale et poster*.

- **Publications dans des revues internationales à comité de lecture**

Mikol Segonne S, Bruneau M, Celton JM, Gall SL, Francin-Allami M, Juchaux M, Laurens F, Orsel M and Renou JP, 2014. Multiscale investigation of mealiness in apple: an atypical role for a pectin methylesterase during fruit maturation. *BMC Plant Biology* 14:1593.

Mikol Segonne S, Pelletier S, Guyader A, Laurens F and Renou JP. Jasmonate controls apple mealiness during maturation through fine-tuning of ethylene and oxidative stress pathways. *In preparation*.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

1 LE POMMIER

1.1 Particularités biologiques du pommier

Le pommier (*Malus x domestica* Borkh.) est l'arbre fruitier le plus cultivé en France avec près de 39 508 ha en 2013 (Agrimer, 2014). Il est classé dans le genre *Malus*, de la sous-famille des *Maloïdeae* (autrefois *Pomoïdeae*), de la famille des *Rosaceae* qui comprend d'autres espèces d'importance économique telles que le poirier ou le rosier (Potter *et al.*, 2007).

Le pommier est une plante pérenne qui présente une phase juvénile plus ou moins longue (3 à 5 ans) durant laquelle il ne fleurira pas ou très peu, suivie d'une phase adulte, dite phase de pleine production, durant laquelle il produira des fruits pendant 15 à 20 ans. L'utilisation de porte-greffes de faible vigueur en production contribue à hâter la mise en production et à optimiser la productivité.

Le pommier se distingue également par son mode de reproduction allogame caractérisé par une auto-incompatibilité pollinique de type gamétophytique. Cette caractéristique a des conséquences sur les schémas de sélection et sur la conduite en verger. D'une part, il n'est pas possible de baser les études génétiques sur la création de lignées pures comme cela est réalisé pour de nombreuses espèces. D'autre part, cela implique la plantation de variétés pollinisatrices dans les vergers. Ainsi, l'ensemble des variétés cultivées présente un fort taux d'hétérozygotie et nécessite une propagation clonale par multiplication végétative (greffe), afin d'assurer l'homogénéité des plantations.

Ainsi, compte tenu de la durée d'implantation d'une parcelle, le choix de la variété à planter est crucial pour le producteur. En plus de bonnes caractéristiques agronomiques et de rusticité, la variété choisie doit présenter des qualités organoleptiques répondant aux attentes du consommateur.

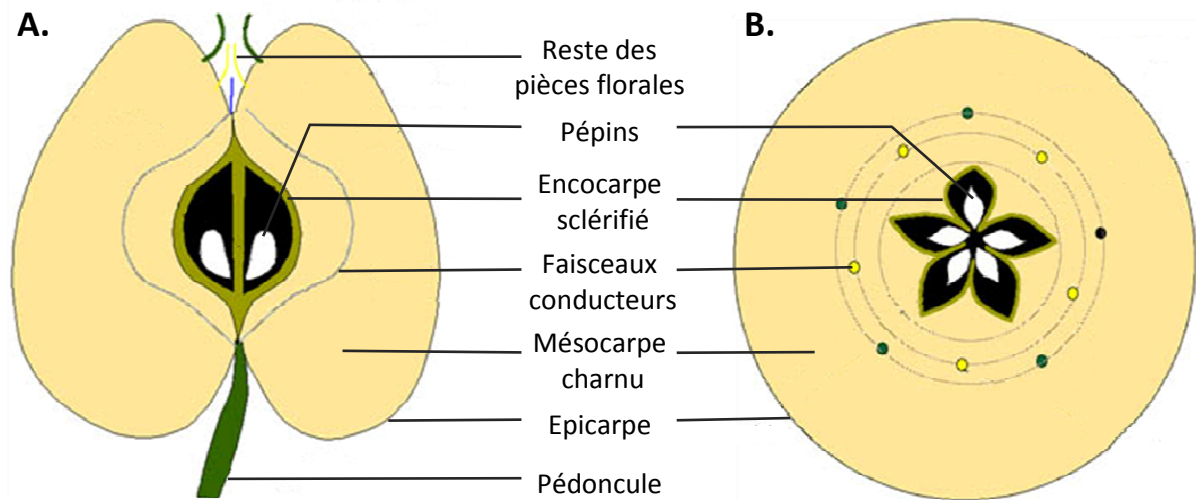


Figure 1 - Schéma d'une coupe longitudinale (A) et transversale (B) d'une pomme.
(UPMC, 2011).

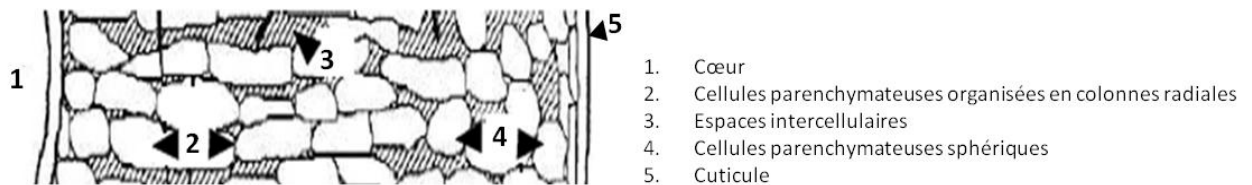


Figure 2 - Coupe schématique d'une section radiale de cortex de pomme.
Adapté de Khan and Vincent (1990).

1.2 L'anatomie du fruit

L'espèce *Malus x domestica* représente un très grand nombre de variétés, dont les fruits à maturité peuvent présenter une très grande diversité de tailles, de couleurs et de qualités. D'un point de vue botanique, la pomme est un fruit complexe charnu, formé par le développement conjoint du réceptacle, ou conceptacle floral, et de l'ovaire. A maturité, trois zones tissulaires seront distinctes (Bondoux, 1992): l'épicarpe, appelé communément la peau du fruit, le mésocarpe et l'endocarpe contenant les loges des pépins (Figure 1). L'endocarpe est issu du développement de l'ovaire dit infère adhérent : le fruit se développe sous l'insertion des pièces florales et celles-ci sont soudées au réceptacle floral. Il en résulte la formation de 5 loges carpellaires légèrement lignifiées dans lesquelles se trouvent les pépins. Le mésocarpe ou parenchyme cortical correspond à la zone de réserves du fruit. Il représente la partie charnue comestible. Il comprend les parois carpellaires et le conceptacle. L'épicarpe constitue la barrière entre l'environnement et le mésocarpe. Il est composé de la cuticule, de l'épiderme et de l'hypoderme. La cuticule, à l'interface entre le fruit et son environnement, aurait un rôle important dans le développement du fruit et dans la protection contre l'environnement biotique et abiotique.

En tant que partie comestible, une bonne compréhension de l'organisation du parenchyme cortical s'avère nécessaire. Les cellules les plus externes du parenchyme sont de petite taille (50 μm de diamètre), aplaties et sphériques, contrairement aux cellules près de l'endocarpe qui sont de grande taille (300 μm), et qui sont organisées en colonnes radiales le long des vaisseaux conducteurs. Elles se caractérisent également par la présence d'espaces intercellulaires réduits (Figure 2). Cette organisation tissulaire caractéristique confère au parenchyme des propriétés mécaniques différentes en fonction de l'orientation dans laquelle les contraintes mécaniques sont appliquées sur les tissus. Ce phénomène s'appelle l'anisotropie (Khan et Vincent, 1993; Mavroudis *et al.*, 2004). Les tissus supportent une déformation mécanique plus importante lors d'une compression tangentielle que lors d'une compression radiale (Khan et Vincent, 1993). Les auteurs expliquent cette différence par la présence des espaces intercellulaires orientés radialement, facilitant la propagation de la rupture. Mavroudis et coll. (2004) ont confirmé une diminution de 50 à 60 % de la porosité entre l'épiderme et l'endocarpe. Cette macroporosité est fonction du stade de développement du fruit et de la variété considérée (Harker *et al.*, 1997a).

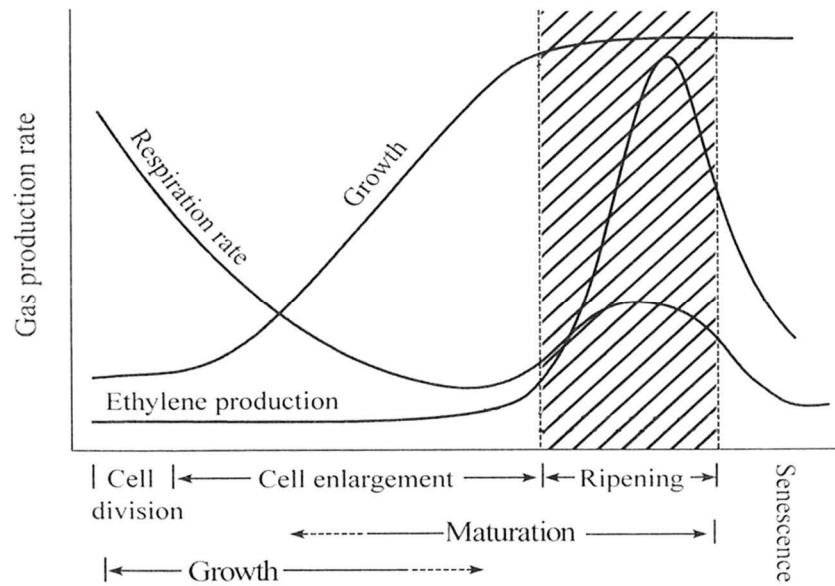


Figure 3 - Les principales phases de développement des fruits climactériques, caractérisées par l'augmentation du diamètre du fruit (growth), le taux de respiration (respiration rate) et la production d'éthylène (ethylene production). Adapté de Wills *et al.* (2007).

Ainsi, l'organisation des cellules parenchymateuses qui s'élabore au cours du développement du fruit influence fortement les qualités texturales.

1.3 Le développement du fruit

Dans des conditions de culture optimales, l'évolution du diamètre du fruit au cours de son développement décrit une courbe sigmoïde caractéristique. On distingue trois phases majeures : une phase de division cellulaire, une phase d'accroissement cellulaire puis une phase de maturation (Figure 3).

Après la fécondation, le fruit présente une activité mitotique intense pendant 3 à 5 semaines, correspondant à la phase de division cellulaire. Les divisions cellulaires se font principalement dans la direction radiale du fruit. Cette phase est suivie par un accroissement important de la taille du fruit qui dure environ 2 mois. Le diamètre du fruit augmente de façon conséquente grâce à l'élongation cellulaire. Les cellules peuvent atteindre 300 μ à maturité contre 10 μ en début de développement (Peña et Carpita, 2004). Cette forte élongation touche principalement les cellules du mésocarpe qui ont un développement vacuolaire important ; les vacuoles représentent alors 80 à 90% du volume cellulaire. Elles sont riches en eau et en acides organiques (Yamaki, 1984), les fruits charnus contenant 85 à 95 % d'eau. Les phases de division et d'accroissement cellulaire correspondent à la phase de croissance du fruit. Elle est suivie de la phase de maturation pendant laquelle les fruits subissent de nombreuses modifications physiologiques et biochimiques leur conférant leurs caractéristiques organoleptiques (arôme, couleur, texture...), et les rendant propres à la consommation. La phase de maturation se confond en partie avec le mûrissement (ripening) du fruit qui est initié après la maturation des graines, lorsque le fruit a atteint sa taille finale (Janssen *et al.*, 2008). Cette phase a pour finalité de rendre les fruits attractifs aux animaux qui assureront la dispersion des graines matures. Il en résulte une distinction entre la maturité commerciale et la maturité physiologique, parfois considérée comme un stade de « surmaturité » (Goulao *et al.*, 2007). La maturité commerciale est identifiée à l'aide de plusieurs indicateurs tels que la couleur de l'épiderme, des pépins ou à partir du stade de régression d'amidon. La récolte à maturité commerciale a pour caractéristique de se situer avant la crise climactérique, c'est-à-dire avant la crise respiratoire et le pic de synthèse d'éthylène qui ont pour effet d'accélérer la maturation du fruit. Le métabolisme du fruit stocké à basse température, parfois sous atmosphère contrôlée, sera ralenti, diminuant l'activité respiratoire et ainsi la consommation

des substrats. Le fruit pourra alors être conservé plusieurs mois. La dernière étape du cycle de vie d'un fruit correspond à la période de sénescence, associée à la dégradation des cellules et au stress oxydatif conduisant au pourrissement du fruit.

La qualité texturale du fruit s'élabore tout au long de la croissance et de la maturation du fruit. Il en résulte une organisation tissulaire spécifique influençant la qualité texturale du fruit.

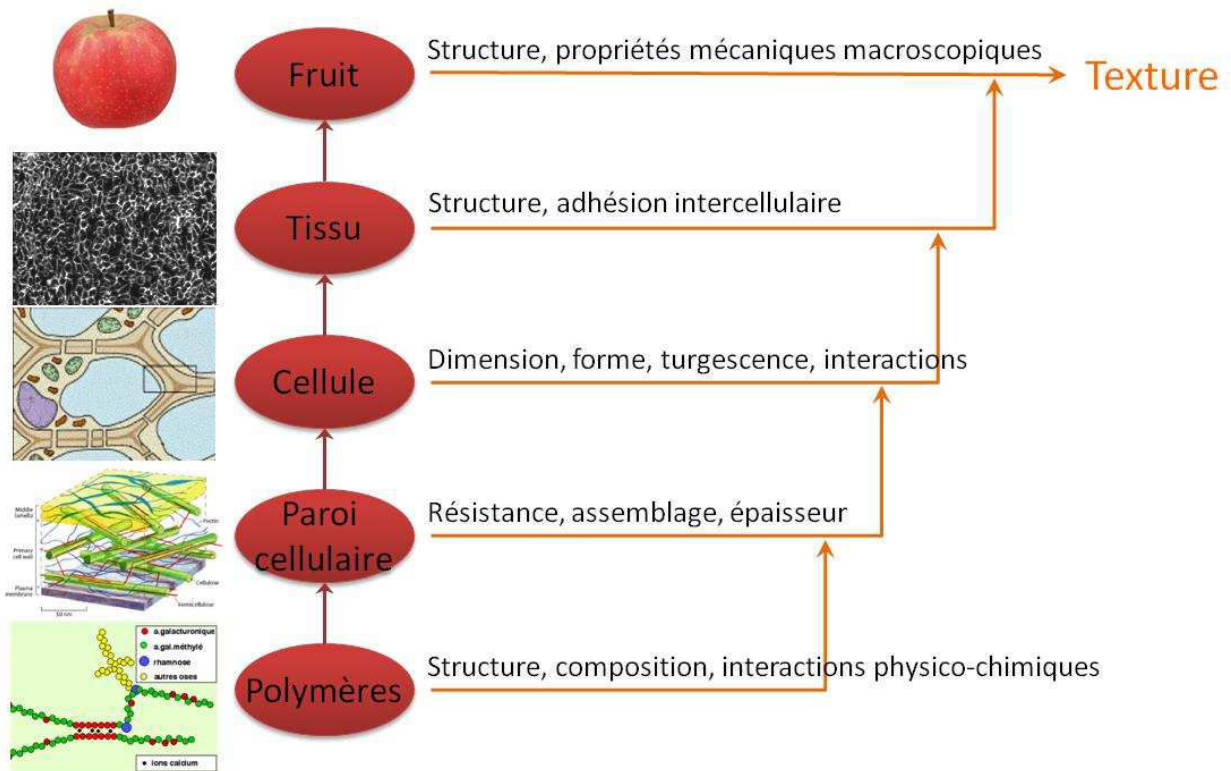


Figure 4 - Les différents niveaux structuraux ayant un impact sur la texture de la pomme. Adapté de Waldron *et al.* (2003).

2 LA TEXTURE DU FRUIT

2.1 Définition

La texture est une notion complexe à définir. Selon Bourne (1982), la texture représente « l'ensemble des caractères physiques et physico-chimiques résultant de différents éléments structuraux de l'aliment évalués par les mécanorécepteurs, les récepteurs tactiles et éventuellement les récepteurs visuels et auditifs en fonction de la force, de la distance et du temps ».

Du point de vue du consommateur, la texture d'un fruit est principalement déterminée par la façon dont ses tissus se déforment et se rompent. Un modèle multi échelle de la texture a été proposé par Waldron et coll. (2003) qui ont schématisé la texture comme la résultante de cinq niveaux structuraux du fruit (Figure 4). Ils décrivent la texture comme étant dépendante de la structure et des interactions des tissus, des cellules et des parois cellulaires. Hiérarchisée de l'échelle macroscopique à l'échelle microscopique, la texture découle :

- du fruit pouvant être de taille, de formes variées ;
- des tissus le constituant : leurs proportions, l'abondance de vaisseaux conducteurs, la présence d'espaces intercellulaires ;
- des cellules ayant des propriétés mécaniques différentes modifiant l'adhésion cellulaire ou la pression de turgescence ;
- des parois cellulaires qui peuvent varier en épaisseur, en résistance ;
- des polymères de la paroi cellulaire qui constituent la base du squelette moléculaire et peuvent varier en composition.

Tous ces éléments évoluent au cours de la maturation.

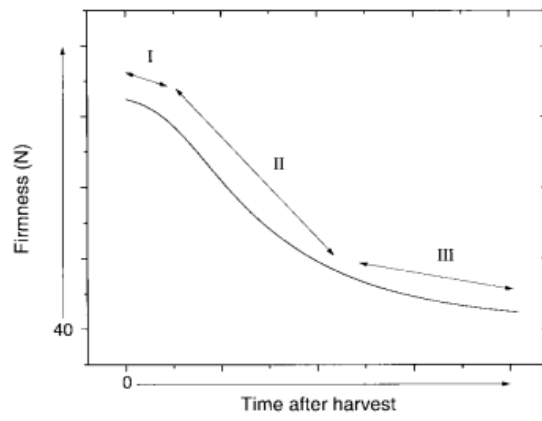


Figure 5 - Perte de fermeté de pommes stockées à 0-5°C. (Johnston *et al.*, 2002).

2.2 Evolution de la texture au cours de la conservation

La texture n'est pas un caractère fixé dans le temps : elle évolue au cours de la maturation du fruit. L'ensemble des études s'accordent à dire que toutes les variétés évoluent de façon similaire au cours du stockage : quelle que soit l'intensité du descripteur sensoriel à la récolte, les variétés présentent toutes une diminution de la fermeté, du croquant et de la jutosité (Mehinagic *et al.*, 2004; Galvez-Lopez *et al.*, 2012).

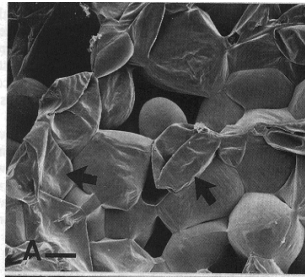
2.2.1 La perte de fermeté ou « softening »

L'évolution la plus caractéristique de la texture au cours de la maturation est la perte de fermeté appelée « softening » (ou ramollissement). Une classification a été établie par Bourne (1979) distinguant les fruits qui ramollissent peu (pomme) de ceux qui ramollissent beaucoup (tomate, pêche, fraise) au cours de la maturation. Effectivement, la pomme ne présente qu'une perte de fermeté de 25 à 50%, contrairement aux tomates pour lesquelles la fermeté diminue de plus de 75% (Bourne, 1979; Johnston *et al.*, 2001). Malgré tout, la courbe de perte de fermeté des pommes en cours de conservation est une courbe sigmoïde décroissante (Figure 5) similaire à celle de nombreux fruits, quelle que soit leur classification (Johnston *et al.*, 2002). Le fruit ramollit lentement durant la phase I, rapidement durant la phase II et de nouveau lentement durant la phase III. Les deux premières phases peuvent se confondre si la maturation est rapide, notamment lorsque les fruits sont laissés à température ambiante. Inversement, la phase I peut être prolongée en fonction des conditions de stockage. Il s'agit en revanche d'un processus irréversible. Une fois amorcé, il est impossible de l'arrêter. La perte de fermeté implique des mécanismes physiologiques et biologiques relatifs à la structure des tissus (perte d'adhésion cellulaire, modification de la rigidité et de l'élasticité des parois cellulaires), et aux flux hydriques (modification de la pression de turgescence des cellules en réponse aux modifications de la pression osmotique des cellules et aux pertes en eau associées à la transpiration du fruit).

2.2.2 La farinosité

Certaines variétés développent des défauts texturaux au cours du stockage tels que la farinosité. Un fruit farineux est défini comme étant mou, granuleux et peu juteux. Ainsi, la farinosité est la résultante de trois composantes texturales : le fondant, la granulosité et la

Pomme non farineuse



Pomme farineuse

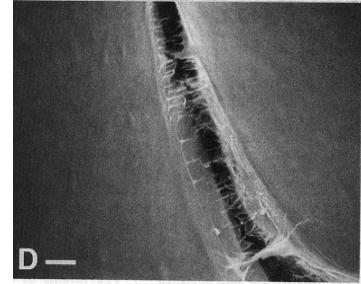
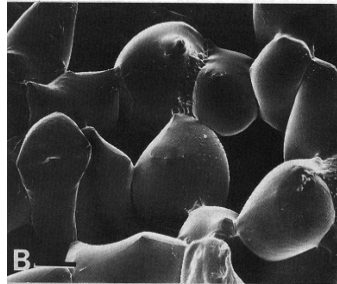


Figure 6 - Observation microscopique de pommes farineuses et non farineuses au microscope optique à balayage. (Harker and Hallett, 1992).

jutosité. Pour des raisons qui seront expliquées par la suite, il est difficile de développer un test mécanique qui mesure ce caractère. Cela explique en partie pourquoi peu d'études font clairement la distinction entre le « softening » et la farinosité. La différence entre les deux phénotypes a pourtant bien été soulignée par Iwanami et coll. (2005). A partir d'une étude portant sur 24 variétés de pommes, ils ont défini deux profils d'évolution texturale au cours du stockage: i) les variétés qui ramollissent sans jamais devenir farineuses et ii) les variétés qui ramollissent en devenant farineuses. Jusqu'alors, la composante génétique de la farinosité n'avait pas encore été mise en exergue bien que le rejet de ce descripteur par les consommateurs ait déjà été souligné à plusieurs reprises (Jaeger *et al.*, 1998; Symoneaux *et al.*, 2012).

La farinosité a été majoritairement décrite au niveau cellulaire par Harker et Hallett (1992). L'observation microscopique de la fracture de parenchyme de pommes a permis de mettre en évidence deux modes de séparation cellulaire qui reflètent deux phénotypes différents (Figure 6). Les pommes non farineuses présentent une majorité de cellules éclatées et peu d'espaces intercellulaires. Les pommes farineuses sont associées à un phénotype cellulaire différent : les cellules ne sont pas éclatées et apparaissent plus arrondies avec des espaces intercellulaires plus importants. Ainsi, deux mécanismes de séparation cellulaire se distinguent et expliquent les perceptions du consommateur. La rupture des parois expliquerait le croquant associé à une jutosité importante due à la libération du contenu intracellulaire riche en eau. A l'inverse, la séparation des cellules sans éclatement expliquerait la sensation granuleuse et le manque de jus. Lorsqu'un fruit est soumis à une contrainte mécanique, si les forces d'adhésion intercellulaire sont supérieures à celles des parois cellulaires, la rupture se fera au niveau des parois. A l'inverse, si les forces d'adhésion cellulaire sont inférieures à celles des parois cellulaires, les cellules se séparent les unes des autres au niveau de la lamelle moyenne et aucune rupture cellulaire n'est observée (Harker *et al.*, 1997a). Ainsi, les hypothèses émises reposent sur des remodelages de la paroi cellulaire qui seront détaillés par la suite.

2.3 Evaluation de la texture

2.3.1 L'analyse sensorielle

La texture correspond à un ensemble de descripteurs organoleptiques perçus par le consommateur. A ce jour, la méthode la plus intégrative pour l'évaluer est l'analyse sensorielle basée sur des tests discriminatifs. Ces derniers permettent d'établir une description

Descripteur	Définition
Fermeté	Force requise pour mordre dans la pomme
Croquant	Quantité de bruit lors de la 1 ^{ère} morsure
Jutosité	Quantité de jus libéré de la chair
Fondant	Force requise pour écraser la chair entre la langue et le palais
Grain	Perception physique des grains de la chair
Fibre	Perception physique de la fibre de la chair
Farinosité	Perception de la chair sèche et granuleuse

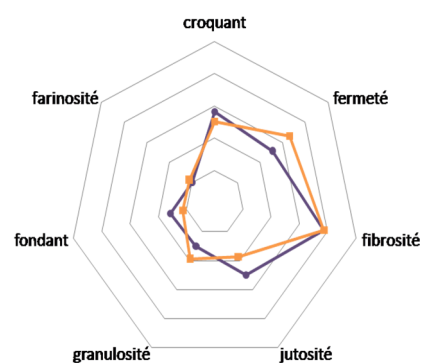


Figure 7 – Définitions des descripteurs sensoriels utilisés au sein du laboratoire IRHS-FruitQual et exemple de profil sensoriel.

efficace d'un échantillon à l'aide d'un nombre prédéfini de descripteurs, en utilisant une échelle de notation dite d'intensité. Le profil sensoriel généralement établi pour la pomme évalue la fermeté, le croquant, la jutosité, le fondant, la farinosité, la granulosité et la fibrosité (Figure 7) (Harker *et al.*, 2002; Mehinagic *et al.*, 2004; Galvez-Lopez *et al.*, 2012).

Ces analyses, réalisées par un panel d'experts, permettent de décrire au mieux la perception en bouche du consommateur. Cependant, toute perception organoleptique est subjective et propre à la sensibilité de chacun (Abbott *et al.*, 1984). C'est pourquoi ces analyses nécessitent d'avoir recours soit à un nombre élevé d'évaluateurs, soit à un panel d'experts (Daillant-Spinnler *et al.*, 1996). De plus, l'analyse sensorielle est une technique coûteuse en temps et en personnel et le nombre d'échantillons analysables par jour reste limité. Pour ces différentes raisons, de nombreux tests instrumentaux ont été développés.

2.3.2 Les méthodes d'analyses physiques

Les méthodes instrumentales développées reposent sur l'évaluation des propriétés mécaniques du fruit. Seules les méthodes permettant de mesurer la fermeté ou la farinosité seront décrites ci-dessous. La plupart d'entre elles sont des méthodes destructives et présentent l'inconvénient de n'évaluer qu'un seul descripteur sensoriel.

L'analyse la plus couramment utilisée est la pénétrométrie. Il s'agit de la méthode de référence utilisée par tous les acteurs de la filière. Elle consiste à mesurer la force nécessaire pour déformer la chair à l'aide d'une sonde cylindrique qui pénètre le fruit sur environ 10 mm à vitesse constante. La courbe force/déplacement enregistrée permet d'extraire différents paramètres liés à la fermeté de la chair (Harker *et al.*, 1997b; Mehinagic *et al.*, 2004; Galvez-Lopez *et al.*, 2012). L'utilisation d'une sonde acoustique, couplée (Longhi *et al.*, 2012) ou non (De Belie *et al.*, 2000) à la pénétrométrie, permet de mesurer le croquant du fruit.

Une autre méthode couramment utilisée est la double compression uniaxiale. Elle repose sur l'utilisation d'une sonde aplatie qui comprime le fruit à vitesse constante sur deux cycles successifs. Cette méthode permet d'acquérir différentes variables indicatrices de la déformation élastique du fruit, et informe sur la capacité de la chair à retrouver sa condition initiale. Elle sert donc à évaluer la fermeté et l'élasticité de la chair. Le lien avec les descripteurs sensoriels reste encore à préciser. Mehinagic et coll. (2004) ont proposé un modèle de prédiction de la farinosité basé sur la combinaison de deux variables de

compression. Cependant, cette corrélation n'a pas pu être validée par Galvez-Lopez et coll. (2012).

Le test de tension est un autre test utilisé pour évaluer la fermeté ou la farinosité (De Smedt *et al.*, 1998; Tu *et al.*, 2000). L'échantillon, maintenu en deux points opposés, est étiré à vitesse constante. Ces essais mécaniques permettent d'établir une courbe de tension correspondant à la force de tension en fonction de l'allongement. Elle mesure l'adhérence d'un tissu, c'est-à-dire la force nécessaire pour dissocier les cellules du parenchyme. Cette méthode est difficile à mettre en œuvre car elle nécessite un échantillonnage long et fastidieux. Couplé avec des observations microscopiques, la visualisation des tissus après rupture du parenchyme a permis de distinguer les deux principaux modes de séparation cellulaire présentés précédemment. L'observation de cellules se dissociant les unes des autres sans présenter de rupture de leur paroi semble être un bon indicateur de la farinosité des pommes (Harker et Hallett, 1992; Tu *et al.*, 2000). Malgré tout, la corrélation avec la perception sensorielle de la farinosité n'a jamais été clairement mise en évidence (Harker *et al.*, 1997b). Ainsi, la mesure quantitative de la farinosité à l'aide de mesures instrumentales semble laborieuse. Plusieurs auteurs suggèrent le développement de modèles prédictifs à partir de la combinaison de plusieurs mesures instrumentales différentes, mais personne n'a encore publié la combinaison permettant une bonne prédiction du caractère multidimensionnel farineux (Abbott *et al.*, 1984; Barreiro *et al.*, 1998; Andani, 1999).

Toutes ces méthodes d'évaluation instrumentale de la texture ne permettent pas de rendre compte facilement de certains descripteurs sensoriels tels que la farinosité, le fondant ou la jutosité (Harker *et al.*, 2002; Camps *et al.*, 2005). La difficulté à évaluer la texture dans sa globalité a contraint de nombreux chercheurs à ne s'intéresser qu'à une facette de la texture. A partir d'une analyse réalisée sur des pommes à textures contrastées, Harker et coll. (2002) concluent en recommandant l'utilisation des panels de dégustateurs.

2.4 Les facteurs environnementaux influençant la texture du fruit

2.4.1 Les conditions de culture

Il est important de mentionner que les conditions environnementales au cours de la croissance du fruit ont un impact sur sa qualité. Des variations de température ou des apports hydriques et carbonés au fruit, d'une année à l'autre, d'un verger à l'autre, peuvent avoir des

conséquences sur les phases de multiplication ou de grandissement cellulaire. Par exemple, des carences en carbone au moment de la phase de multiplication cellulaire peuvent fortement affecter le diamètre final du fruit (Wünsche et Lakso, 2000). L'accroissement cellulaire dépend de la pression de turgescence dans la cellule, qui elle-même résulte de l'approvisionnement en eau et de la richesse en solutés. La température moyenne au cours de la phase de croissance de la pomme aura une influence sur sa fermeté à la récolte. Dans des conditions climatiques plus fraîches, les pommes sont généralement plus fermes avec des cellules et des espaces intercellulaires de taille réduite (Volz *et al.*, 2004). On notera également que la charge de l'arbre aura une influence sur la qualité du fruit. Dans le cas de la variété « Royal Gala », moins l'arbre produira de fruits, plus ces derniers seront fermes à la récolte (Saei *et al.*, 2011). La date de récolte sera également déterminante sur la qualité du fruit. La récolte à maturité commerciale se situe généralement juste avant le pic climactérique, ce qui aura pour effet de ralentir la phase I du ramollissement. Cependant, la date de récolte ne modifie pas le taux de ramollissement qui a lieu durant la phase rapide II (Johnston *et al.*, 2002).

2.4.2 Les conditions post-récoltes

Les principaux paramètres post-récolte qui auront une influence sur l'évolution de la texture sont la température, l'humidité relative, les traitements post-récolte et l'atmosphère de la chambre de conservation.

Tout d'abord, la plupart des variétés sont conservées à des températures entre 0 et 3°C. Plus la température est élevée, plus la vitesse d'évolution de la texture sera rapide. De plus, la température optimale de conservation est souvent à définir pour chaque variété car elles peuvent présenter des sensibilités différentes au froid. L'humidité relative (HR) est également un facteur important. Tu et coll. (2000) ont étudié l'effet de l'HR sur la qualité texturale de pommes maintenues à 20°C. Ils ont démontré que des fruits conservés à une HR faible (30%) présentent une perte de poids plus importante liée à une déshydratation plus importante. Cependant, une humidité relative trop élevée (95%) favoriserait le développement de la farinosité. Des traitements post-récolte peuvent également être réalisés afin d'allonger la durée de conservation des fruits. L'application de calcium au cours du développement du fruit ou lors du stockage contribuerait par exemple à maintenir la fermeté du fruit au cours de la conservation. La formation d'une structure en boîte à œufs au niveau de la lamelle moyenne

via le calcium contribue ainsi à maintenir l'adhésion cellulaire (Ortiz *et al.*, 2010). Des traitements au 1-MCP, un inhibiteur des récepteurs membranaires de l'éthylène, sont souvent utilisés pour ralentir la maturation des pommes (Watkins, 2006). Une autre méthode très courante pour conserver les pommes après la récolte est le stockage en chambre froide sous atmosphère contrôlée, appauvrie en O₂ et enrichie en CO₂. Ces conditions ont pour objectif de maintenir le fruit dans la phase I du ramollissement en bloquant la voie de biosynthèse de l'éthylène. En effet, l'activité enzymatique de l'ACC oxydase est inhibée par une faible teneur en O₂ et l'activité enzymatique de l'ACC synthase est inhibée par le CO₂ (Gorny et Kader, 1997). Ainsi, la méthode de conservation du fruit employée aura un impact sur sa durée de conservation et sur la rapidité d'évolution de la texture.

La texture est un caractère complexe qui résulte de l'interaction de différents facteurs, génétiques et environnementaux. Elle est décrite par un grand nombre de descripteurs sensoriels corrélés et difficiles à évaluer individuellement. Il s'agit d'un caractère dynamique qui évolue en cours de conservation et qui peut aboutir à des textures rédhibitoires telles que la farinosité. Un des objectifs important pour la filière est le maintien des qualités texturales le plus longtemps possible en conservation.

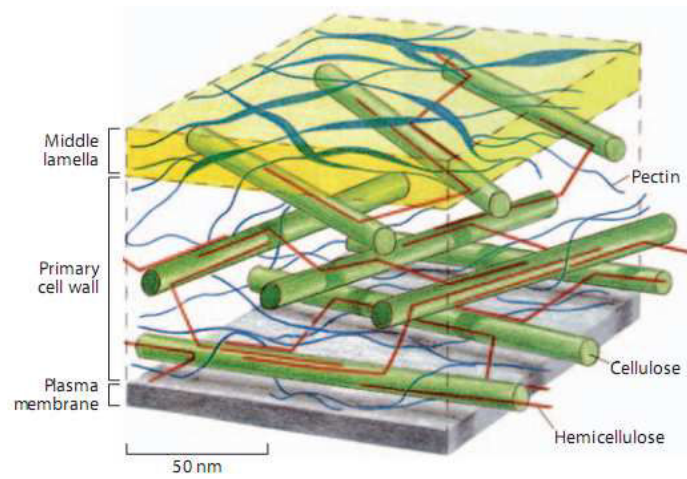


Figure 8 - Modèle simplifié de la paroi cellulaire végétale. (Scheller and Ulvskov, 2010).

3 LES DEUX COMPOSANTES PRINCIPALES ASSOCIEES AUX EVOLUTIONS TEXTURALES EN COURS DE CONSERVATION

De nombreuses études se sont attachées à décortiquer les mécanismes moléculaires et physiologiques mis en jeu et ont permis de mettre en évidence deux éléments majeurs associés à l'évolution de la texture: le métabolisme de la paroi cellulaire et les régulations hormonales.

3.1 La paroi primaire, un acteur majeur dans la qualité texturale

Le ramollissement observé au cours de la maturation des fruits est associé à des modifications structurales au niveau de la paroi cellulaire et à une baisse de la pression de turgescence.

3.1.1 Structure et composition de la paroi cellulaire

3.1.1.1 Structure générale de la paroi cellulaire

Les cellules végétales sont entourées d'une paroi, structure complexe déterminante dans le maintien et la cohésion cellulaire. Elle peut être formée de trois couches distinctes : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (Figure 8). La paroi secondaire, absente dans les cellules du parenchyme du fruit, ne sera pas décrite dans ce mémoire.

La lamelle moyenne est synthétisée lors de la division cellulaire. Elle forme la couche la plus externe de la paroi et est essentiellement composée de pectines. Leur capacité à se lier avec les ions calcium leur confère un rôle majeur dans l'adhésion des cellules les unes avec les autres, assurant ainsi la cohésion tissulaire (Jarvis *et al.*, 2003).

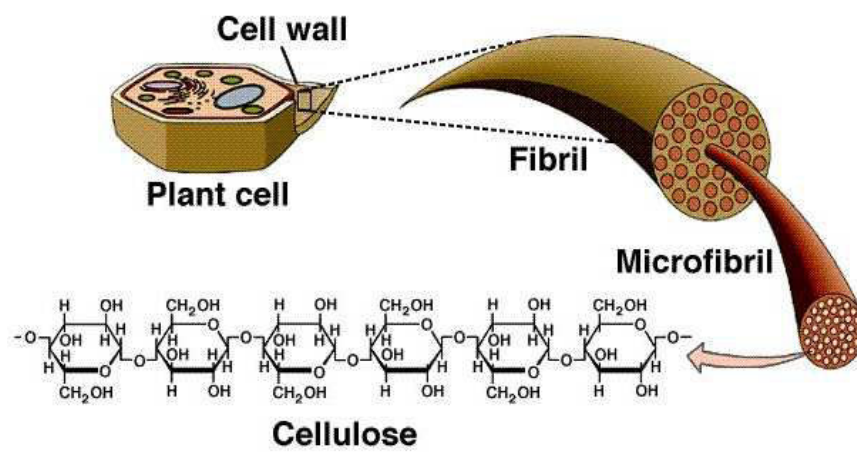


Figure 9 - Représentation schématique de fibres de cellulose : de la paroi cellulaire aux molécules de cellulose. (Malmström and Carlmark, 2012).

La paroi primaire, formée lors de la croissance cellulaire, est constituée d'un réseau de fibres celluloseux entrelacé dans une matrice amorphe composée d'hémicelluloses, de substances pectiques et de glycoprotéines de structure. La paroi primaire des fruits charnus est une paroi de type I caractérisée par des hémicelluloses de type xyloglucane et par une teneur en pectines d'environ 20 à 35% (Carpita et Gibeaut, 1993). Elle forme une paroi fine et élastique considérée comme l'armature rigide de la paroi. Elle détermine la forme et la taille des cellules en résistant à la pression de turgescence exercée par la vacuole. De plus, elle est fortement hydratée (65%). Elle est capable d'absorber et de conserver de l'eau en faible quantité ce qui contribue également au maintien de sa structure (Bonnin et Lahaye, 2013). Sa composition chimique et sa structure assurent un rôle dans la cohésion cellulaire. Le réseau cellulose-xyloglucanes assure la rigidité de la paroi cellulaire et lui confère une résistance aux tensions contrairement au réseau pectique qui assure la résistance aux compressions (McCann *et al.*, 1990). La paroi est également riche en protéines de structures, appelées glycoprotéines et qui représentent environ 10% de la paroi cellulaire. Parmi celles-ci, on distingue les expansines, probablement impliquées dans l'élongation cellulaire.

3.1.1.2 La cellulose

La cellulose représente environ 20 à 30% de la matière sèche des parois primaires (Carpita et McCann, 2000). Il s'agit d'un polymère d'unités de β -D-glucose reliées entre elles par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$. Les macromolécules de cellulose sont reliées entre elles par des liaisons hydrogènes formant des chaînes de microfibrilles de cellulose (Figure 9). Ce sont des fibres longues, rigides et inextensibles, constituant ainsi la trame rigide de la paroi à l'origine de ses propriétés mécaniques (Rose, 2003). Cette organisation confère à la paroi une résistance aux dégradations physiques, chimiques et enzymatiques (Lerouxel *et al.*, 2006).

Les microfibrilles de cellulose sont synthétisées au niveau de la membrane plasmique à partir d'UDP-glucose et d'ADP-glucose formés dans le cytosol, grâce à des enzymes appelées les cellulose synthases (CESAs).

3.1.1.3 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent environ 30 à 35 % de la matière sèche de la paroi. Elles constituent un groupe de polysaccharides complexes qui se caractérisent par leur solubilité dans des solutions alcalines et leur insolubilité dans l'eau. Il s'agit d'un groupe hétérogène de polymères branchés et étroitement associés aux microfibrilles de cellulose par des liaisons hydrogènes, contribuant ainsi au maintien d'une architecture pariétale et au renforcement de la paroi cellulaire (Scheller et Ulvskov, 2010).

Les hémicelluloses contiennent plusieurs sucres à cinq atomes de carbone (sucres C5), tels que le xylose ou l'arabinose, et des sucres C6 tels que le glucose, le mannose ou le galactose. On distingue trois familles de polysaccharides : les xyloglucanes (XyG), les galactoglucomannanes (GgM) et les glucuronoxylanes (GuX) dont les plus abondants dans la pomme sont les xyloglucanes, représentant environ 20 à 25 % du poids sec de la paroi primaire (Renard *et al.*, 1992). Les xyloglucanes possèdent un squelette composé de β -(1,4)-D-glucose dont 75 % des résidus glucose sont substitués en position O6 par des chaînes latérales mono-, di- ou tri-saccharidiques. Une nomenclature des structures de xyloglucanes en fonction des différentes chaînes latérales a été établie par Fry et coll. (1993). Les galactoglucomannanes représentent la deuxième famille d'hémicelluloses, présente seulement à l'état de traces dans la pomme (Voragen *et al.*, 1986a). Les glucomannanes ont un squelette de résidus D-mannose et D-glucose liés en β -1,4. Le D-glucose peut être substitué en α -1,6 par des résidus D-galactose, formant ainsi des galactomannanes. Les hémicelluloses sont souvent acétylées.

Les hémicelluloses sont synthétisées dans l'appareil de Golgi et transportées jusqu'à la paroi *via* des vésicules sécrétoires. Elles sont synthétisées par des glucosyltransférases (cellulose-synthases like (CSL), xylosyl/fucosyl/galactosyltransférases) localisées dans les membranes de Golgi (Somerville *et al.*, 2004).

La croissance de la paroi cellulaire sous l'action de la pression de turgescence pourrait être permise grâce à un phénomène de rupture et de reformation des liaisons glucosidiques dans le squelette des xyloglucanes *via* des xyloglucanes endotransglycosylases/hydrolases (XTHs) (Rose, 2003). Ainsi, les XTHs peuvent avoir deux effets radicalement opposés :

- l'activité des xyloglucanes endotransglycosylases (XETs) conduit à la rupture des chaînes de xyloglucanes,

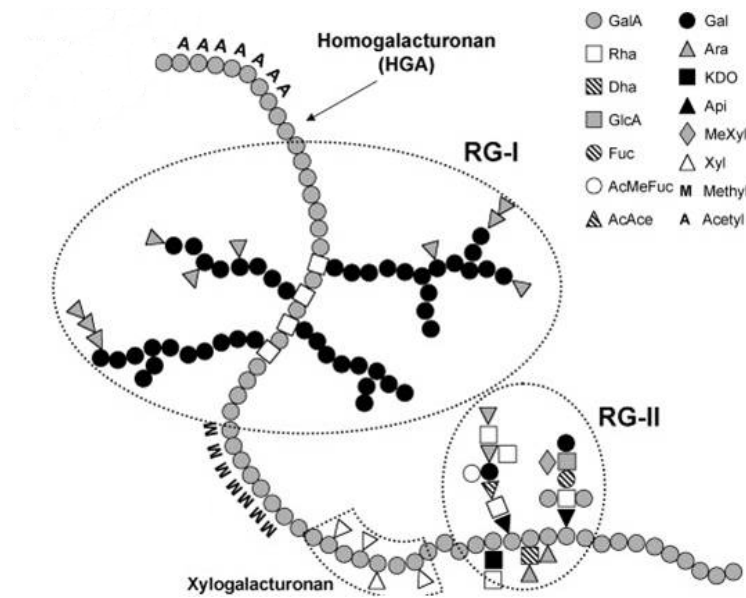


Figure 10 - Représentation schématique de la structure des pectines. (Pérez *et al.*, 2003).

- l'activité des xyloglucanes endohydrolases (XEHs) conduit à des raccourcissements irréversibles des chaînes.

La dégradation des hémicelluloses est réalisée par un groupe d'enzymes appelées les hémicellulases qui sont divisées en 2 groupes : les glycosides hydrolases (GHs) qui hydrolysent les liaisons glycosidiques, et les carbohydrates esterases (CEs) qui hydrolysent les liaisons esters des groupes latéraux acétate ou acide férulique (Scheller et Ulvskov, 2010).

3.1.1.4 Les pectines

Un réseau de pectines consolide ce maillage. Les pectines constituent l'élément majeur de la paroi en représentant environ 50 à 70 % du poids sec de la paroi des fruits charnus (Renard *et al.*, 1993; Mohnen, 2008). Les pectines sont caractérisées par une teneur élevée en acide galacturonique et sont formées de la juxtaposition de régions lisses et hérissées. On distingue trois domaines structuraux : les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes de type I (RGsI) et de type II (RGsII) (Figure 10).

Les régions « lisses » ou homogalacturonanes sont des polymères d'acide α -(1,4)-D-galacturonique souvent substitués par des groupements méthyles esters sur la fonction acide et parfois acétylés sur les hydroxyles libres (Voragen *et al.*, 1986b). Ils constituent le domaine pectique majoritaire représentant environ 60% des pectines totales (Mohnen, 2008; Voragen *et al.*, 2009). Les HGs sont caractérisés par leur degré de méthylestérification (DM) qui correspond au nombre de fonctions acides méthyle-estérifiées pour 100 unités d'acide galacturonique. Les pectines de pomme sont hautement méthylées avec un DM d'environ 65 à 75 %, variant en fonction du stade de développement du fruit ou de la variété (de Vries *et al.*, 1983; Billy *et al.*, 2008). Une baisse de DM peut avoir deux conséquences opposées: i) la formation d'un gel pectique grâce à la création de ponts calciques, ii) une meilleure accessibilité de la chaîne d'HGs à des enzymes pariétales participant à la dégradation des parois. La formation des ponts calciques semble nécessiter la succession de 7 à 20 acides galacturoniques. Ils contribuent à la formation de structures très stables assurant une cohésion cellulaire au niveau de la lamelle moyenne (Ralet *et al.*, 2001). La lamelle moyenne est effectivement principalement composée de pectines de type HGs (Jarvis *et al.*, 2003).

Les pectines présentent également des régions « hérissées » ou rhamnogalacturonanes, minoritaires dans les pectines de pomme. Les RGsI sont constitués d'une chaîne principale

d'acide galacturonique alternant avec du rhamnose et des chaînes latérales riches en oses neutres (galactose, arabinose). Des études *in vitro* ont montré l'existence d'interactions entre les chaînes latérales d'oses neutres et la cellulose, révélant un rôle potentiel de ces domaines pectiques dans le contrôle des propriétés mécaniques de la paroi (Zykwinska *et al.*, 2005). Les RGsII présentent une structure beaucoup plus complexe mais très conservée au sein du règne végétal (Voragen *et al.*, 2009). Ils sont formés d'une chaîne principale d'acide galacturonique portant des ramifications d'oses complexes tels que le rhamnose ou l'apiose. Les RGsII affecteraient la porosité, la résistance et la flexibilité de la paroi (Pérez *et al.*, 2003). Les RGsI et RGsII seraient absents de la lamelle moyenne.

Les pectines assurent la perméabilité de la paroi cellulaire et ont ainsi un rôle dans les échanges intercellulaires. Elles régulent la porosité, l'hydratation et le pH des parois par leurs charges (Carpita et McCann, 2000). Par ailleurs, les pectines déméthylées sont chargées négativement, elles peuvent alors se lier aux cations Ca^{2+} et former une structure appelée « boîte à œufs » (Morris *et al.*, 1982). Ces structures peuvent emprisonner des molécules d'eau et former un réseau de nature gélatineuse assurant l'adhésion entre cellules. Les pectines peuvent également se lier aux xyloglucanes par des liaisons covalentes (Thompson et Fry, 2000) et aux microfibrilles de cellulose (Zykwinska *et al.*, 2008). Il en résulte une participation des pectines au maintien de la cohésion cellulaire.

De la même façon que les hémicelluloses, les pectines sont synthétisées dans les vésicules golgiennes et sécrétées dans la paroi par exocytose. De par la complexité de leur structure, de nombreuses enzymes sont impliquées dans :

- leur synthèse : des glycosyltransférases (GTs), méthyltransférases ou acétyltransférases (Harholt *et al.*, 2010),
- leur remodelage : les pectines méthylestérases (PMEs), polygalacturonases (PGs) ou pectate lyases (PLs) (Wolf et Greiner, 2012).

3.1.2 Modification de la paroi au cours de la maturation du fruit

La paroi végétale est une structure dynamique. Sa composition et sa structure sont fortement remaniées au cours des différents stades de développement du fruit, impliquant une série coordonnée de processus biochimiques comme la synthèse des composés pariétaux, pendant la phase de croissance du fruit, puis leur réarrangement ou leur dégradation pendant la phase de maturation (Brummell *et al.*, 2004; Goulao et Oliveira, 2008). Ces réarrangements

structuraux sont liés à l'action d'enzymes pariétales, toutes susceptibles d'être des protéines candidates affectant les modifications texturales du fruit au cours de la maturation (Brummell et Harpster, 2001).

Un des évènements majeurs associé au ramollissement des fruits est la dépolymérisation et la solubilisation des pectines qui contribueraient à la perte d'adhésion cellulaire (Harker et Hallett, 1992). Des modifications des HGs et des RGsI ont été décrites en lien avec les évènements de maturation du fruit (Goulao, 2010; Peña et Carpita, 2004; Gwanpua *et al.*, 2014).

Tout d'abord, d'importantes modifications sont observées au niveau des HGs, principaux constituants de la lamelle moyenne. Les principales enzymes associées au remodelage des pectines de type HGs sont les pectines méthylestérases (PMEs) et les endo-polygalacturonases (PGs). Les PMEs, responsables de la dé-méthylestérisation des pectines, permettraient de « désencombrer » les chaînes de GalA alors accessibles aux PGs (Goulao, 2010). Une augmentation de l'activité des PMEs a été mesurée au cours du développement du fruit, suivie d'une baisse d'activité au cours de la maturation en lien avec la perte de fermeté (Goulao *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010). Cependant, aucune variation significative du degré de méthylestérisation des pectines (Billy *et al.*, 2008; Gwanpua *et al.*, 2014) ou de l'expression du gène *MdPME1* (Goulao *et al.*, 2008) n'a été observée au cours du stockage. Ainsi, le rôle des PMEs dans la maturation de la pomme est toujours en discussion, aucune validation fonctionnelle chez la pomme n'ayant encore pu appuyer un rôle éventuel. Les PMEs appartiennent à une grande famille multigénique (66 isoformes chez *Arabidopsis thaliana*) dont les fonctions peuvent varier selon l'isoforme considéré (Louvet *et al.*, 2006). Ceci expliquerait alors en partie pourquoi la déméthylestérisation des pectines par les PMEs est parfois associée à une perte de fermeté, comme chez la pêche (Murayama *et al.*, 2009) ou la fraise (Lefever *et al.*, 2004), ou parfois à un maintien de la fermeté comme chez la tomate (Phan *et al.*, 2007) ou l'abricot (Botondi *et al.*, 2003). Les pectines déméthylées sont ainsi susceptibles d'être dégradées par les PGs ou de réagir avec les cations bivalents, rendant la structure plus cohésive. Le rôle des PGs est beaucoup moins controversé. L'activité enzymatique des PGs, très faible en début de stockage, augmente nettement après quatre mois de conservation (Gwanpua *et al.*, 2014). L'étude de plantes transgéniques de « Royal Gala » sur-exprimant le gène *Md-PG1* a permis de caractériser plus finement son rôle. Il a pu être associé à une perte d'adhésion cellulaire (Atkinson *et al.*, 2002, 2012; Wakasa *et al.*, 2006;

Tacken *et al.*, 2010) dans les stades tardifs de la maturation de la pomme (Ireland *et al.*, 2014).

Dans une moindre mesure, des modifications ont également été reportées sur les domaines pectiques de types RGsI. Parmi les événements précoces, la perte de galactose des RGsI a été observée chez la pomme, principalement au cours de la phase d'élongation cellulaire. Les RGsI présentent dès lors principalement des ramifications riches en arabinose qui seront elles-mêmes dégradées au cours des stades avancés de la maturation de la pomme (Peña et Carpita, 2004; Gwanpua *et al.*, 2014). Ce phénomène semble être en concordance avec la perte de fermeté, suggérant un rôle potentiel des β -galactosidases (Gwanpua *et al.*, 2014) ou des α -arabinofuranosidases (Nobile *et al.*, 2011) dans le ramollissement de la pomme.

Des études plus récentes ont également suggéré des modifications des xyloglucanes par les XTHs. Une augmentation de l'activité enzymatique des XETs a été détectée après l'arrêt de la croissance du fruit ; elle se maintiendrait stable durant toute la période de conservation (Goulao *et al.*, 2007). Atkinson et coll. (2009) ont mis en évidence un pic d'expression des gènes *MdXTH2* et *MdXTH10* au cours de la maturation de « Granny Smith ». Ces 2 gènes XTHs présentent une réponse différente à un traitement exogène d'éthylène sur « Golden » : seul *MdXTH10* présente une expression éthylène-dépendante (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2013). Cependant, aucune dépolymérisation des xyloglucanes n'a été observée chez « Braeburn » : la quantité de xyloglucanes reste constante au cours de la maturation (Percy *et al.*, 1997). Le rôle des XTHs reste encore à déterminer mais ces premiers résultats suggèrent que certains gènes XTHs ont un rôle spécifique dans la maturité et qu'une régulation hormonale par l'éthylène est partiellement impliquée.

La plupart des études réalisées portent sur des modifications pariétales au cours de la conservation et se sont limitées à la perte de fermeté. De récentes études ont porté sur la corrélation des modifications des pectines avec plusieurs descripteurs sensoriels (Billy *et al.*, 2008) ou sur la détection de QTLs de descripteurs sensoriels et de la composition chimique des hémicelluloses (Galvez-Lopez *et al.*, 2011). La farinosité et le fondant semblent corrélés avec la teneur en GalA des pectines solubles (WSP) et avec le degré d'acétylation du matériel insoluble à l'alcool (Billy *et al.*, 2008).

3.1.3 Implication de la pression de turgescence

La pression de turgescence est due à la contrainte exercée par les liquides intracellulaires contre les parois. Elle est fonction de la différence des potentiels hydriques de la vacuole et du milieu extracellulaire et est alors fortement dépendante de la différence de pression osmotique entre ces deux compartiments. Elle est définie comme la force motrice de l'expansion cellulaire dans les organes en développement. Elle participe au maintien de la forme cellulaire et du port végétal (Jarvis, 1998). Elle aurait également un rôle dans le ramollissement des fruits, bien que mal défini.

Des modifications de la pression osmotique de tissus parenchymateux de pommes ou de poires, à l'aide de solutions de mannitol à différentes concentrations, ont permis de souligner l'effet de celle-ci sur le mode de rupture des cellules. Une pression de turgescence élevée a été associée à une rupture de la paroi des cellules. Inversement, si la pression de turgescence est faible, les tissus présentent un « décollement des cellules » les unes par rapport aux autres (Jarvis *et al.*, 2003). Cependant, le rôle de la pression de turgescence sur les modifications texturales ne semble pas si évident. Harker et Hallett (1992) ont souligné une pression de turgescence élevée dans des pommes farineuses par rapport à des pommes non farineuses. Cette pression de turgescence contribuerait à rendre les cellules plus rondes, à augmenter les espaces intercellulaires et ainsi à diminuer l'adhésion cellulaire (Harker et Hallett, 1992; De Smedt *et al.*, 1998). Or, Tong *et coll.* (1999) ont montré une corrélation positive entre la fermeté mesurée par pénétrométrie et la pression de turgescence au cours du stockage de différentes variétés de pommes. A partir d'une étude portant sur 27 variétés de pommes, Iwanami *et coll.* (2008) confirment cette baisse simultanée de la fermeté et de la pression de turgescence pour les variétés non farineuses. Cependant, ils soulignent également que cette corrélation ne semble pas s'appliquer aux variétés farineuses : plus elles sont farineuses, moins la baisse de pression de turgescence est importante.

Le maintien de la pression de turgescence au cours de la maturation du fruit est principalement associé à la dégradation de l'amidon en sucres solubles dans les vacuoles (Archbold, 1992). En revanche, les mécanismes associés à une baisse de turgescence des cellules au cours de la maturation du fruit sont encore hypothétiques. Ils résulteraient d'une accumulation de solutés dans l'apoplasme, modifiant ainsi les flux entre compartiments intra- et intercellulaires (Handa *et al.*, 2011). Ces variations du potentiel osmotique peuvent s'expliquer par la modification de la perméabilité des membranes cytoplasmique et vacuolaire ou par la modification de la concentration en osmolytes apoplastiques en réponse aux

modifications pariétales. Le rôle de la transpiration du fruit a également été souligné chez la tomate. Elle modifierait directement les flux hydriques qui semblent corrélés avec une perte de fermeté. La régulation de la transpiration est intrinsèquement liée aux caractéristiques de la cuticule (*e.g* épaisseur, lenticelles) qui joueraient également un rôle dans les différences texturales du fruit (Saladié *et al.*, 2007).

3.2 La régulation hormonale de la maturation

3.2.1 Le rôle de l'éthylène

Les fruits sont classés en deux grandes catégories : les fruits climactériques (la pomme, la tomate, le kiwi) et les non-climactériques (le raisin, la fraise). Ils se distinguent par une crise climactérique décrite comme une augmentation de la respiration dès le début de la maturation, qui coïncide avec un pic dans la synthèse d'éthylène. Le rôle exact de la crise climactérique pose encore question, mais les principales hypothèses sous-tendent un rôle dans la coordination et dans la synchronisation du processus de maturation des fruits (Handa *et al.*, 2011). On notera que la tomate est l'espèce modèle utilisée pour étudier la maturité du fruit. Cependant, la tomate présente un fort ramollissement contrairement à la pomme (Johnston *et al.*, 2002), ce qui suggère d'importantes différences d'évolution de la texture des fruits au cours de la maturation de chacune de ces espèces.

La production d'éthylène chez les fruits climactériques fait intervenir deux systèmes de régulation décrits par Lelièvre et coll. (1997). Les fruits climactériques en développement présentent un faible niveau de production d'éthylène correspondant au système 1. Le début de la crise climactérique marque le passage au système 2, actif pendant la phase de mûrissement du fruit. L'éthylène est alors produit de façon autocatalytique (Poel *et al.*, 2012).

Deux approches sont régulièrement utilisées pour étudier le rôle de l'éthylène : i) l'application exogène d'éthylène ou d'inhibiteurs chimiques de son action, tel que le 1-méthylcyclopropène (1-MCP) pouvant se lier aux récepteurs de l'éthylène (Watkins, 2006), ii) l'utilisation de plantes transgéniques chez lesquelles les voies métaboliques de l'éthylène sont perturbées (Dandekar *et al.*, 2004; Schaffer *et al.*, 2007; Pech *et al.*, 2008; Atkinson *et al.*, 2011). L'étude de pommiers transgéniques pour lesquels la voie de biosynthèse de l'éthylène a été perturbée montre une suppression de la production d'éthylène et un processus de maturation fortement ralenti. Ce ralentissement se traduit par un allongement de la durée de conservation, par un

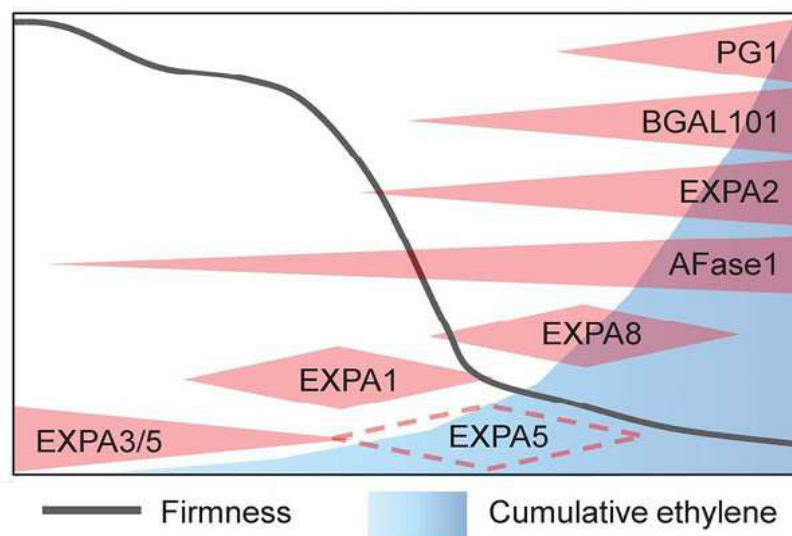


Figure 11 - Modèle décrivant la relation entre la production d'éthylène et l'expression de gènes associés à la paroi cellulaire au cours du mûrissement de la pomme. (Ireland *et al.*, 2014).

maintien de la fermeté et par une diminution de la production de composés volatils durant la conservation (Dandekar *et al.*, 2004; Schaffer *et al.*, 2007). Les mêmes conclusions ont été reportées pour d'autres espèces climactériques telles que la tomate (Klee et Giovannoni, 2011), le melon (Pech *et al.*, 2008) ou le kiwi (Atkinson *et al.*, 2011). Par ailleurs, une application exogène d'éthylène sur ces plantes transgéniques à des stades de maturation différents a permis de mettre en évidence des différences de sensibilité à l'éthylène entre des événements précoces ou tardifs (Johnston *et al.*, 2009; Tacken *et al.*, 2010). Ces résultats soulignent le rôle central de l'éthylène dans la maturation du fruit.

Cependant, quelques études ont démontré la coexistence de voies de régulation éthylène-dépendante et éthylène-indépendante impliquées dans la maturation du fruit. L'application de doses croissantes d'éthylène sur des plantes transgéniques de « Royal Gala » souligne une sensibilité à l'éthylène différente selon les événements. Des événements précoces tels que la conversion d'amidon en sucres solubles sont peu sensibles à l'éthylène, contrairement aux événements plus tardifs tels que la perte de fermeté (Johnston *et al.*, 2009). Des melons transgéniques surexprimant le gène codant pour l'ACC-oxydase (enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de l'éthylène) présentent un maintien global de leur fermeté. Une légère baisse de fermeté est malgré tout observée. Cette baisse a également été associée à l'existence de voies de régulation éthylène-indépendantes (Guis *et al.*, 1997). Toutefois, ces conclusions sont à nuancer car des études réalisées sur la tomate ont démontré que des résidus d'éthylène mesurés dans des plantes transgéniques de tomates seraient suffisants à activer certaines PGs qui ont une très forte sensibilité pour l'éthylène (Sitrit et Bennett, 1998). Un modèle basé sur cette idée de sensibilité des gènes à la dose d'éthylène a récemment été proposé pour la pomme (Ireland *et al.*, 2014). Il décrit l'intervention successive de certaines enzymes pariétales dans le ramollissement, en fonction de la concentration en éthylène (Figure 11).

La première phase du « softening » décrite par Johnston et coll. (2002) correspond à l'acquisition de la compétence à mûrir du fruit, ce dernier produit alors peu d'éthylène (système 1). Le léger ramollissement observé durant cette phase est associé à une forte expression des *EXP3* et *EXP5* qui est indépendante de l'éthylène. La phase rapide du ramollissement présente une expression importante des *EXP1* ainsi qu'une abondance d'expansines dans la paroi. Par la suite, la concentration d'éthylène augmente grâce à la capacité du fruit à produire de l'éthylène de façon auto-catalytique (système 2). On observe

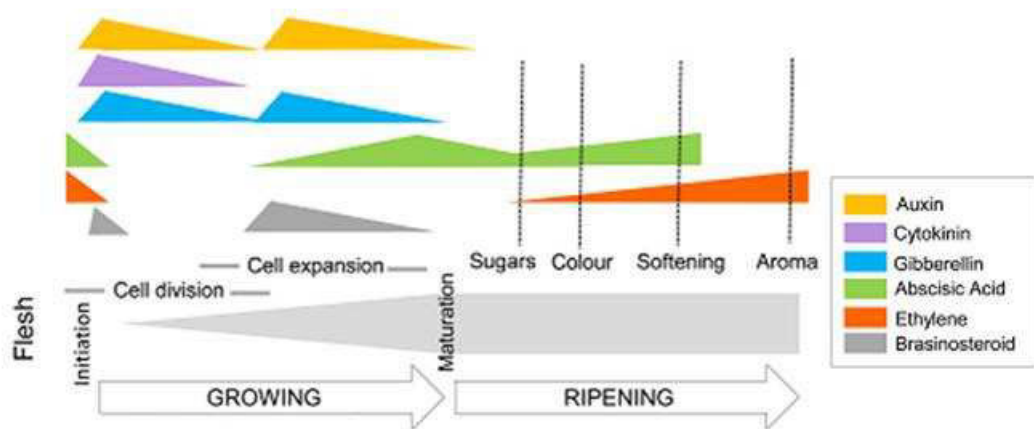


Figure 12 - Principaux changements hormonaux associés à la croissance et à la maturation des fruits climactériques. Adapté à partir de Mc Atee *et al.* (2013).

alors un fort ramollissement du fruit associé aux activités enzymatiques des *AFase1*, *BGALI01* et *PGI* dont l'expression est éthylène-dépendante. Il est important de noter que ce modèle est basé sur les gènes de paroi déjà identifiés dans la maturation de la pomme. De plus, ce modèle ne prend pas en compte le froid qui agit également comme un régulateur du ramollissement à la fois indépendamment, et de concert avec la voie de l'éthylène (Tacken *et al.*, 2010). L'étude de melons transgéniques altérés pour la voie de biosynthèse de l'éthylène puis traités au 1-MCP a montré que les gènes au sein d'une même famille peuvent être régulés de façon différente par l'éthylène. Par exemple, l'expression du gène *MPG1* est éthylène-dépendante alors que celle de *MPG2* est éthylène-indépendante (Nishiyama *et al.*, 2007). Ainsi, les mécanismes de régulation au cours des processus de maturation des fruits climactériques sont des phénomènes très complexes qui présentent encore de nombreuses inconnues. Par ailleurs, malgré le rôle majeur de l'éthylène, d'autres phytohormones semblent impliquées dans les processus de régulation associés à la maturation des fruits.

3.2.2 Le rôle des autres phytohormones

Les progrès réalisés en génomique et le développement des méthodes d'analyse haut-débit ont considérablement contribué à préciser les régulations hormonales impliquées dans la maturation des fruits. Les plus grandes avancées sont observées sur la tomate, mais de nombreuses données existent sur d'autres espèces (McAtee *et al.*, 2013). Un schéma général des changements hormonaux impliqués dans le développement et le mûrissement du fruit a été proposé par McAtee et coll. (2013) (Figure 12). L'auxine, les cytokinines, les gibbérellines et l'acide abscissique sont principalement impliqués dans la croissance du fruit tandis que l'éthylène a un rôle majeur au cours du mûrissement des fruits climactériques.

L'ensemble de ces hormones a également été spécifiquement associé à la maturation de *Malus x domestica*. Par exemple, une importante concentration d'acide abscissique endogène a été mesurée dans les premiers stades de développement de la pomme (Kondo *et al.*, 2000). L'auxine serait également impliquée dans la croissance du fruit en induisant l'élongation cellulaire (Devoghalare *et al.*, 2012). La suppression du gène *rin-like MADS-box* dans « Royal Gala » a pour effet le maintien élevé de la concentration en auxine et une absence de maturation (Schaffer *et al.*, 2013; Ireland *et al.*, 2013).

Le rôle des jasmonates (JA) est rarement intégré dans les modèles hormonaux associés à la maturation des fruits tels que celui proposé par McAtee et coll. (2013) (Figure 12). De nombreuses études ont pourtant souligné un rôle des JA dans la maturation des fruits. Tout d'abord, le dosage de JA endogènes a permis de mettre en évidence un pic de production de JA précédant de peu le pic de synthèse d'éthylène, suggérant un rôle des JA dans l'induction du système 2 de production d'éthylène (Fan *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'application de JA exogènes peut accélérer ou ralentir le mûrissement du fruit selon l'espèce (Kondo *et al.*, 2007; Ziosi *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2012; Concha *et al.*, 2013) ou le stade de développement (Miszczak *et al.*, 1995) considérés, ainsi que selon la dose appliquée (Fan *et al.*, 1998). Les jasmonates ont donc également un rôle dans la maturation des fruits.

Quelle que soit la phytohormone considérée, les rôles et modes d'action sont moins bien caractérisés que celui de l'éthylène et nécessitent de plus amples investigations.

L'évolution de la texture du fruit implique des modifications hormonales et pariétales coordonnées qui ont lieu tout au long de la croissance et de la maturation du fruit. Les modifications pariétales tardives sont des événements régulés majoritairement par l'éthylène, contrairement aux événements précoces qui sont souvent décrits comme éthylène-indépendants. Le rôle des hormones végétales, autres que l'éthylène, est encore méconnu à ce jour mais présente un intérêt grandissant. Les interactions possibles entre les différentes voies de signalisation hormonale ajoutent un niveau de complexité au modèle existant.

4 LES BASES MOLECULAIRES DE LA TEXTURE DE LA POMME

4.1 Les apports des études génétiques chez *Malus x domestica*

Malus x domestica étant une espèce d'importance économique mondiale, elle est donc très étudiée. Le pommier est un sujet d'étude difficile de par ses caractéristiques morphologiques (port volumineux des arbres, culture en vergers), génétiques (auto incompatibilité) et physiologiques (période juvénile). Depuis peu, les notions de plasticité phénotypique et adaptative des plantes ligneuses à leur environnement ont été reliées à la composante épigénétique chez les espèces forestières (Bräutigam *et al.*, 2013), ajoutant un degré de complexité jusqu'alors sous-estimé (cette dimension ne sera pas abordée dans ce mémoire). Malgré ces contraintes, il existe un très grand nombre de programmes d'amélioration des plantes portant principalement sur les résistances aux maladies et sur la qualité du fruit. De nombreuses études ont été réalisées sur l'étude des loci impliqués dans la variation de caractères quantitatifs (QTLs) tels que la qualité du fruit. Des QTLs majeurs liés à la texture du fruit ont été identifiés au sein de différentes populations sur les groupes de liaison (LG) suivants : LG01, LG08, LG10 et LG15 (King *et al.*, 2000; Maliepaard *et al.*, 2001; Seymour *et al.*, 2002; Kenis *et al.*, 2008).

Ces études génétiques ont permis d'identifier de nombreux gènes candidats présents sous ces QTLs. On distingue des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'éthylène tels que *Md-ACO1* sur le LG10 (Costa *et al.*, 2005), *Md-ACS1* (Oraguzie *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005) et *Md-ACS3* (Bai *et al.*, 2012) ainsi que des gènes impliqués dans les modifications pariétales tels qu'un gène codant pour une expansine, *Md-Exp7*, sur le LG01 (Costa *et al.*, 2008), une polygalacturonase, *Md-PG1*, sur le LG10 (Longhi *et al.*, 2013), une pectine lyase, *Md-Pel*, sur le LG14 et une xyloglucane endotransglycosilase, *Md-XET* (Longhi *et al.*, 2012). L'importance de *Md-PG1* a pu être appuyée par des études moléculaires montrant une étroite

corrélation entre le niveau d'expression du gène et la perte de fermeté au cours du stockage (Wakasa *et al.*, 2006). L'ensemble de ces études génétiques a porté sur la cartographie de QTLs liés à la fermeté instrumentale ; peu sont liés à la farinosité. Une étude intégrant des données sensorielles, instrumentales, biochimiques et histologiques, a permis l'identification d'un QTL associé à la farinosité sensorielle sur le LG04. Il colocalise avec d'autres QTLs associés à la fermeté sensorielle et instrumentale (pénétrométrie), et à des teneurs en xyloglucanes (Galvez-Lopez *et al.*, 2011).

Par ailleurs, l'héritabilité de descripteurs sensoriels a été estimée sur des populations en pedigree autour de 0,3 à 0,6 (Alspach et Oraguzie, 2002), à 0,55 pour la perte de fermeté (Iwanami *et al.*, 2008). La faible héritabilité et le nombre important de QTLs spécifiques identifiés (année, lieu ou fond génétique) soulignent la complexité de l'architecture génétique de la texture du fruit (Chagné *et al.*, 2014).

4.2 Les apports de la génomique fonctionnelle

L'étude des bases moléculaires d'un caractère repose soit sur des approches gènes candidats comme nous l'avons présenté tout au long de ce chapitre, soit sur des approches sans a priori réalisées sur l'ensemble du génome.

Le développement des puces à ADN a permis un essor considérable de la génomique fonctionnelle en rendant possible l'étude simultanée d'un nombre important de transcrits issu d'un tissu d'un individu à un moment donné. Les premières puces à ADN développées pour étudier la maturation de la pomme ont été développées à partir de séquences « expressed sequence tag » (ESTs). Les ESTs sont des séquences générées à partir des banques d'ADNc. Lee et coll. (2007) ont développé une puce contenant 3 484 ADNc pour étudier l'expression des gènes au cours des premiers stades de développement de la variété « Fuji ». Par la suite, un programme de séquençage d'ESTs a été réalisé à partir de plus de 43 banques d'ADNc de différents tissus de pommes, principalement issues de la variété « Royal Gala ». La base de données générée contient environ 150 000 ESTs dont 42 983 non redondants (Newcomb *et al.*, 2006). A partir de ces ESTs, une puce à 13 000 oligonucléotides a été développée pour l'étude du développement et de la maturation de « Royal Gala » (Janssen *et al.*, 2008). Cette puce a également permis l'identification de 17 gènes candidats régulés par l'éthylène et impliqués dans la production de composés aromatiques de lignées transgéniques de « Royal

Gala » (Schaffer *et al.*, 2007). Une étude comparative entre la pomme et la tomate a été réalisée afin d'identifier des gènes orthologues impliqués dans le contrôle de la maturité des fruits climactériques (Costa *et al.*, 2010). Une autre puce haute densité représentant 23 997 unigenes a été développée pour l'étude du transcriptome de deux cultivars à texture contrastée à la récolte. Les variétés « Honeycrisp » et « Cripps Pink » diffèrent par leur fermeté et leur précocité. « Honeycrisp » est une variété précoce, croquante et peu ferme contrairement à « Cripps Pink » qui est tardive et ferme. Les principales catégories fonctionnelles identifiées sont associées aux voies hormonales (éthylène, auxine, gibbérellines) et au remodelage de la paroi cellulaire (dégradation des hémicelluloses) (Zhu *et al.*, 2012). Ainsi, de nombreuses études transcriptomiques ont été réalisées mais elles ciblaient soit la cinétique de maturation d'une variété, soit la comparaison de variétés à un temps donné. Elles aboutissent pour la plupart aux mêmes conclusions quant aux catégories fonctionnelles impliquées dans la maturation du fruit, mais elles convergent rarement sur des gènes candidats impliqués dans les différences d'évolutions texturales.

4.3 Séquençage du pommier et développement de la puce AryANE v1

4.3.1 Le séquençage du pommier

Le génome du pommier domestique (*Malus x domestica* Borkh.) fut le premier complètement séquencé dans la famille des Rosacées. Le génome du pommier est estimé à 742,3 millions de paires de bases (Mb). Il trouverait son origine dans une duplication chromosomique globale, passant de 9 chromosomes à 17 chromosomes, qui se serait déroulée il y a environ 50 millions d'années. L'assemblage des contigs couvre environ 81% du génome (603,9 Mb), la partie non assemblée étant constituée à 98% d'éléments répétés. 90,2% des gènes annotés ont pu être positionnés sur les chromosomes. Ainsi, le nombre de gènes codants est de 57 386, ce qui représente un nombre élevé par rapport à la plupart des plantes supérieures telles qu'*Arabidopsis thaliana* (27 228), le peuplier (45 654) ou le raisin (40 577). Ce nombre élevé peut résulter de l'événement de duplication mais peut également provenir, dans une moindre mesure, d'un effet de sur ou sous prédiction des annotations (Velasco *et al.*, 2010).

4.3.2 La puce AryANE v1.0

Le projet AryANE (Array Apple Nimblegen Expression, GAP-INRA 2010-2012) a permis le développement d'un nouveau microarray d'expression couvrant l'ensemble des gènes du pommier. Le microarray AryANE v1.0 (Celton, Gaillard *et al.*, 2014) comprend 126 022 sondes représentant l'ensemble des transcrits codants prédits sur le pommier ainsi que 153 précurseurs de microARNs. Chaque gène est représenté par une sonde sens (S) et par une sonde anti-sens (AS).

Le support utilisé dans un premier temps a été une lame à oligonucléotides synthétisés *in situ* par la technologie MAS (Maskless Array Synthetiser). Les lames synthétisées par Nimblegen sont des multiplexes de 12 puces pouvant chacune contenir 135 000 sondes de 60 oligonucléotides. Le design des sondes a été réalisé par l'équipe de bioinformatique du laboratoire et par celui de la société Nimblegen. Ils ont identifié une série de dix sondes, présentant une température de fusion (TM) d'environ 60°C dans la partie 3' de chaque séquence codante (CDS), la contrainte en 3' étant imposée par un amorçage des rétro-transcrits issus de messagers par des oligodT et une efficacité de la reverse-transcriptase qui diminue après 1500 pb. Parmi les 10 sondes proposées, la plus spécifique a été sélectionnée en interne (S. Gaillard) à l'aide d'un algorithme adapté de SPADS (Thareau *et al.*, 2003), précédemment utilisé pour les puces CATMA (Crowe *et al.*, 2003). Un code de spécificité des sondes a été défini : le code 1 indique que la sonde est spécifique du gène sur les 60 bases, le code 2 indique une « cross-hybridation » possible sur 20 nucléotides consécutifs, le code 3 sur 40 nucléotides consécutifs et le code 4 sur 60 nucléotides consécutifs, la sonde étant alors non spécifique. La sonde AS est une sonde « miroir » de la sonde sens, portant ainsi le nombre total de sondes à 126 022 dont 96 120 sont classées de 1 à 3.

La puce AryANE est le premier microarray couvrant la totalité des transcrits annotés du pommier. Son originalité repose également sur la présence des sondes anti-sens (AS) présentes pour tous les transcrits. La réalisation d'un atlas d'expression sur huit organes différents du pommier a souligné l'importance des ARNs AS dans le fruit et dans les graines (Celton, Gaillard *et al.*, 2014). Les ARNs AS joueraient un rôle dans les mécanismes de régulation assurant le contrôle de l'expression génique par la production de nat-siRNA. Ils interviendraient dans des phénomènes de « silencing » post-transcriptionnel en agissant notamment sur l'expression des ARNs sens par appariement (Liu *et al.*, 2014).

Les approches génétiques menées jusqu'à présent sur le pommier ont permis de mettre en évidence un grand nombre de facteurs génétiques impliqués dans la texture du fruit ainsi que quelques gènes candidats sous-jacents aux QTLs. Cependant, la plupart des gènes identifiés jusqu'à ce jour sont souvent des déterminants moléculaires tardifs du ramollissement. Le décryptage de la séquence du génome du pommier et le développement de la puce AryANE devraient apporter un nouvel éclairage sur les mécanismes de régulation impliqués dans la maturation de la pomme.

5 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'étude bibliographique a permis de mettre en exergue la complexité du caractère textural de la pomme. Il s'agit d'un caractère multifactoriel, dynamique et sensible à son environnement. Deux grands processus sont associés à l'évolution des propriétés texturales au cours de la maturation du fruit : la dégradation des parois cellulaires et les régulations hormonales. La plupart des investigations se sont en majorité limitées à quelques approches « gènes candidats » classiques. Ainsi, les connaissances sur les mécanismes moléculaires mis en jeu restent encore très parcellaires. Le décryptage récent de la séquence complète du pommier a ouvert de nouvelles perspectives en génomique, avec notamment le développement des approches de génomique sans a priori. Ainsi, le développement de ces approches permet d'apporter des éléments de réponses complémentaires aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans le développement de la texture du fruit et d'identifier de nouveaux gènes candidats.

Cependant, la texture est un caractère multifactoriel complexe résultant d'une balance entre fermeté, jutosité, farinosité, etc. Elle est essentiellement mesurée par analyse sensorielle, qui reste un des indicateurs importants pour les professionnels de la filière. La complexité du caractère justifie l'absence de modèle moléculaire expliquant les modifications texturales de la pomme. Une vision synthétique de tous les processus mis en jeu s'avère être une première étape nécessaire à une compréhension globale des mécanismes associés à la farinosité. C'est pour cette raison que ces travaux ont porté principalement sur la farinosité, identifiée comme un caractère défavorable et déterminée génétiquement, d'autant plus que la farinosité est un caractère souvent délaissé au profit du ramollissement.

L'objectif de cette thèse est d'identifier les déterminants moléculaires de la farinosité de la pomme en s'appuyant sur des données phénotypiques déjà accumulées au sein de l'équipe FruitQual et sur la puce récemment développée, AryANE-v1. Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu aidera d'une part les sélectionneurs à mieux appréhender ce caractère dans les programmes de sélection et, d'autre part, il peut aider au développement de nouvelles méthodes pour optimiser le contrôle de la gestion des stocks en production pour l'ensemble des acteurs de la filière.

Le travail a été organisé en deux étapes successives :

1. Une première étude transcriptomique a été réalisée sur un pool d'individus issus d'une population en ségrégation afin de travailler dans un même fond génétique et de limiter ainsi les variations génétiques.
 - Est-il possible d'identifier des marqueurs précoces de la farinosité au sein de cette population ?

2. Une deuxième étude transcriptomique a été réalisée sur un set de 40 variétés afin de se soustraire de l'influence du fond génétique. Cette analyse repose sur une hypothèse majeure : «les transcrits dont l'abondance varie simultanément avec le phénotype farineux sont liés à l'expression du caractère ».
 - Existe-t-il un mécanisme moléculaire « universel » au sein de l'espèce conduisant à la farinosité de la pomme?

L'absence de test quantitatif permettant d'évaluer le caractère farineux nous a amené à développer un nouveau test qui sera présenté et évalué tout au long de ce mémoire.

Finalement, les résultats obtenus ont permis de préciser ce qu'est la farinosité et nous ont amenés à proposer une nouvelle définition de ce caractère. Ils apportent également un nouvel éclairage sur les mécanismes moléculaires associés au développement de la farinosité de la pomme.

CHAPITRE II

**Analyse multi-dimensionnelle de la
farinosité : le rôle atypique d'une
pectine méthylestérase au cours
de la maturation de la pomme**

CONTEXTE

La pomme est un fruit climactérique dont la texture évolue au cours de la conservation. Certaines variétés développent des désordres texturaux tels que la farinosité, un caractère rédhibitoire pour le consommateur. Il s'agit d'un caractère complexe qui nécessite l'emploi de plusieurs descripteurs sensoriels pour la caractériser. Ainsi, une pomme est dite farineuse quand elle est molle, sèche et granuleuse. Les connaissances portant sur ce caractère sont très parcellaires, tant au niveau de sa caractérisation phénotypique que moléculaire, ce qui résulte en partie des contraintes liées au modèle d'étude *Malus x domestica*, et à la difficulté d'analyser ce caractère complexe et dynamique. Afin de décortiquer les mécanismes mis en jeu au cours de la farinosité, une analyse multi-échelle basée sur la combinaison d'analyses phénotypiques, transcriptomiques et biochimiques a été réalisée sur six individus au cours du développement et de la maturation de la pomme. Ces six individus, issus d'une population ségrégant pour la farinosité (famille IM), ont été sélectionnés sur la base d'analyses sensorielles conduites pendant six années consécutives.

Tout d'abord, une description texturale de ces génotypes a permis de souligner la différence entre le ramollissement et la farinosité. Les sensations « farineuses » en bouches sont indépendantes de la fermeté instrumentale du fruit. Cependant, on peut noter qu'une perte de fermeté rapide semble conduire à la farinosité. Par ailleurs, l'observation histologique de parenchymes de pommes farineuses et non-farineuses confirme l'absence de cellules éclatées chez les farineux, mais pas l'augmentation des espaces intercellulaires.

Pour pallier l'absence d'évaluation quantitative, un test facile à mettre en place et reproductible a été développé. Il repose sur l'hypothèse que des pommes farineuses présentent une lamelle moyenne dégradée, contrairement à des pommes non farineuses. En pratique, des fragments de parenchymes standardisés sont mélangés dans de l'eau à l'aide d'un vortex. Après coloration au bleu de toluidine et dépôt entre lame et lamelle, les échantillons sont observés au microscope optique. Le nombre de cellules détachées du fragment de parenchyme

est alors compté à l'aide du logiciel ImageJ. Une bonne corrélation a été mesurée entre le nombre de cellules isolées et la note sensorielle de farinosité accordée par le panel d'experts (coefficient de corrélation de Pearson = 0.83, P-value < 0.01). L'ensemble de ces résultats phénotypiques renforce les hypothèses liées aux dégradations pariétales décrites au cours de la maturation du fruit.

Dans un second temps, une analyse transcriptomique a été conduite sur les six hybrides étudiés par couples farineux / non-farineux. Afin d'identifier les gènes responsables du développement de la farinosité, seuls les gènes présentant un profil différentiel d'expression (sur- ou sous-exprimés) de la même façon dans les trois couples ont été retenus. Cette sélection a permis d'identifier 1 783 gènes potentiellement impliqués dans la farinosité. Par ailleurs, l'objectif étant d'identifier des marqueurs précoces de la farinosité, une deuxième sélection plus drastique a été réalisée en recherchant les gènes différentiellement exprimés dès les temps précoces de la cinétique, réduisant la liste à 53 transcrits différentiellement exprimés.

Parmi ces 53 transcrits, un gène annoté « pectine méthylestérase » présente un profil unique et original : il est sur-exprimé chez les non-farineux. Généralement associé à une désorganisation de la paroi, l'hypothèse ici avancée est que cette PME contribuerait à maintenir la cohésion cellulaire des cellules de parenchyme non-farineux par la création de structures en boîtes à œufs au niveau de la lamelle moyenne. L'analyse *in silico* de l'ensemble des séquences protéiques a permis d'identifier 60 PME chez le pommier dont seul *MdPME2* présente un profil tel que celui présenté. Par ailleurs, l'expression transitoire de *MdPME2* dans des plants de *Nicotiana tabacum* démontre l'export de la protéine dans l'apoplasme. L'analyse biochimique des parois de cellules de parenchyme ne permet pas de mettre en évidence une différence globale de méthylation des pectines entre les farineux et les non-farineux. Cependant, l'étude des profils structuraux de pectines de pomme a permis de mettre en évidence un plus grand nombre d'oligouronides peu méthylestérifiés chez les non-farineux. Ainsi, *MdPME2* aurait une action locale et non globale. *MdPME2* ne peut expliquer à lui seul l'apparition de la farinosité. Cependant, il semble être un gène candidat pertinent à la non apparition du caractère farineux. Dans tous les cas, *MdPME2* apparaît comme un marqueur précoce de la farinosité, au moins dans le fond génétique de la famille IM.

Multiscale investigation of mealiness in apple: an atypical role for a pectin methylesterase during fruit maturation

Sandrine Mikol Segonne¹, Maryline Bruneau², Jean-Marc Celton², Sophie Le Gall⁴, Mathilde Francin-Allami⁴, Marjorie Juchaux³, François Laurens², Mathilde Orsel² and Jean-Pierre Renou^{1,2,3}

¹ AgroCampus-Ouest, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045 Angers, France.

² INRA, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49071 Beaucozéz, France.

³ Université d'Angers, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045 Angers, France.

⁴ INRA, UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, F-44316 Nantes, France

Abstract

Background: Apple fruit mealiness is one of the most important textural problems that results from an undesirable ripening process during storage. This phenotype is characterized by textural deterioration described as soft, grainy and dry fruit. Despite several studies, little is known about mealiness development and the associated molecular events. In this study, we integrated phenotypic, microscopic, transcriptomic and biochemical analyses to gain insights into the molecular basis of mealiness development.

Results: Instrumental texture characterization allowed the refinement of the definition of apple mealiness. In parallel, a new and simple quantitative test to assess this phenotype was developed. Six individuals with contrasting mealiness were selected among a progeny and used to perform a global transcriptome analysis during fruit development and cold storage. Potential candidate genes associated with the initiation of mealiness were identified. Amongst these, the expression profile of an early down-regulated transcript similar to an *Arabidopsis thaliana* pectin methylesterase gene (*AtPME2*) matched with mealiness development. *In silico* analyses of this *Malus x domestica* *PME* gene (*MdPME2*) confirmed its specific pattern compared with all other identified *MdPME* genes. Protein fusion experiments showed that *MdPME2* is secreted into the apoplast in accordance with a possible activity on pectin structure. Further microscopic analysis indicated a progressive loss of cell to cell adhesion in mealy apple fruits. Biochemical analysis revealed specific modifications of pectin residues

associated with mealiness, without global changes in the degree of methylesterification of pectins.

Conclusions: These data support the role of PME in cell wall remodelling during apple fruit development and ripening and suggest a local action of these enzymes. Mealiness may partially result from qualitative and spatial variations of pectin microarchitecture rather than quantitative pectin differences, and these changes may occur early in fruit development. The specific *MdPME2* gene highlighted in this study could be a good early marker of texture unfavourable trait in apple.

Keywords: apple, cell wall, *Malus domestica*, PME, fruit texture, transcriptome.

1 INTRODUCTION

Apple is amongst the largest consumed fruit in the world. During fruit maturation and ripening, apples undergo important metabolic changes consisting in the conversion of starch to simple sugars, the reduction in organic acid contents, skin colour changes, production of flavoured volatiles and flesh softening [1]. In some genotypes, mealiness may occur during storage. This modification in texture, often associated with excessive softening, makes apple fruits less attractive to consumers [2] and increases costs for marketers due to a loss of quality and a higher susceptibility to pathogens [3, 4].

Mealiness results from an undesirable ripening process and is characterized by textural deterioration, resulting in soft, grainy and dry fruit [5, 6]. Many reports about apple texture modifications during ripening have focused either on soft or mealy phenotypes. Iwanami *et al.* [7] underlined the coexistence of both phenotypes, suggesting that softening studies should consider the degree of mealiness to adequately investigate apple ripening process. Microscopic observations led to the conclusion that mealiness is associated with the dissolution of the middle lamella and the disruption of the primary cell wall [5]. The authors suggested that these changes of the cell wall results in a loss of cell-to-cell adhesion, resulting in tissue fracture by cell-to-cell separation rather than by cell rupture during mastication of the fruit. Fruit cell walls are a highly complex matrix composed of microfibrils of cellulose embedded in a network of hemicelluloses, pectins and proteins [8]. Amongst the genetically-programmed biochemical events which occur during fruit ripening, cell wall modifications are the most described. Many enzymes are involved in the dynamics of the cell wall during fruit development and ripening [9, 10]. High α -L-arabinofuranosidase gene expression and enzyme activity levels have been reported as being related to mealiness [11]. Pectin methylesterase (PME) activity has been shown to be higher during the early stage of ripening in soft apple fruits [12]. Both enzymes act on pectins (rhamnogalacturonan-I and homogalacturonan respectively) which render the cell wall matrix more accessible to other degrading enzymes such as polygalacturonases (PGs) [12, 13]. Experiments with transgenic apple plants showed that PG1 activity is necessary for “Royal Gala” softening [14]. Despite several studies, little is known about mealiness development and the associated molecular events. Nevertheless, all reports have concluded that fruit ripening results from a complex mechanism that cannot be reduced to a single gene but rather involves a complex network. Moreover it is likely that

mealiness as a unique sensory parameter reports various biochemical and structural situations in different fruit species.

Transcriptome analyses have the potential to screen many gene pathways simultaneously. In recent years, a number of studies have integrated these extensive datasets in order to investigate apple fruit ripening. Most of them were based on ‘custom made’ microarrays developed from EST apple databases. Lee *et al.* [15] used a 3,484 cDNAs array to identify 192 cDNAs involved in the early stages of apple fruit development. Janssen *et al.* [16] undertook a similar study on “Royal Gala” and extended to the fruit ripening stages, using a 13,000 gene apple oligonucleotide array. This same array was used previously to identify 17 putative candidate genes regulated by ethylene and involved in the production of aroma compounds in the fruits of transgenic lines of “Royal Gala” [17]. Costa *et al.* [18] focused on the ripening process of “Mondial Gala” using another apple EST array and heterologous hybridization using a tomato array. A high density 23k long-oligo apple array was designed by Zhu *et al.* [19] to compare transcriptome profiles between two cultivars with contrasted firmness and crispness phenotypes at harvest. Distinct sets of genes from various metabolic pathways were classified as cultivar dependent and may contribute to the observed phenotypic variation such as xyloglucan endo-transglycosylase / hydrolase (XTH) genes involved in cell wall remodelling [10]. Other apple microarrays were reported on apple tree scions [20] and fruitlet abscission [21]. Until now, all published apple transcriptome studies were restricted to a subset of identified transcripts. Due to the availability of the apple genome sequence [22], the AryANE_v1 microarray representing the fully annotated genome was recently designed [23].

The results presented in this study constitute the first whole genome analysis of apple and provide insight into molecular regulatory events involved in fruit mealiness development, which is considered as the development of an unfavourable texture trait. Up to now, the most commonly used method to characterize mealiness was based on sensory analyses. As this method is rather time consuming and can be user dependent, a novel simple cell cohesion test was developed to assess mealiness. In addition, using the AryANE_v1 microarray, six siblings from a population of hybrids with contrasting phenotypes for fruit mealiness were studied. As modifications leading to mealiness are probably initiated early in ripening, the expression profiles were studied over the complete fruit cycle from cell expansion to fruit cold storage. Amongst all the differentially expressed genes, only a few displayed consistent

and opposite expression profiles between all mealy and non-mealy genotypes leading to the identification of one *Malus x domestica* member of the pectin-methylesterase (EC 3.1.1.11) gene family. Investigation through biochemical analyses suggests an essential role in mealiness development.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material and fruit sampling

Six hybrids progenies issued from the “IM” population segregating for mealiness. This population was derived from a cross between X6681 and X6683, two genitors from the INRA breeding programme (Angers) (Pedigree is available in Additional file 9). The cross was developed in the framework of the European research project High-Quality Disease-Resistant Apple for a Sustainable Agriculture (HIDRAS) [54]. Hybrids were selected for their clear-cut segregation for fruit mealiness, based on sensory analyses, hereinafter named M40, M74 and M48 (mealy), and M49, M20 and M16 (non-mealy). Apples were collected at 100 days after flowering (100DAF), at harvest (H), at 60 and 120 days after harvest (60 and 120DAH) and cold stored at 1°C. Harvest criterions were the optimum maturity based on taste, ground color and starch index of 6-7 [55]. Stored apples were warmed overnight at room temperature prior to analysis. At harvest and storage stages, two apples were submitted to sensory analysis. Flesh tissues of four peeled apples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for RNA extraction and enzymatic profiling during four consecutive years (2007, 2009 to 2011). The cell cohesion test was developed and performed using fruits from 10 apple genotypes harvested in 2012 in experimental orchards at INRA, Angers following the same harvest and storage procedure as described above (Additional file 1).

2.2 Sensory and instrumental texture analyses

Sensory analyses were performed by an expert panel of four judges working in pairs as described in [11]. Sensory attributes were mealiness, firmness, crunchiness, juiciness, meltiness and granularity. They were rated on a 9 point scale from 1 (low) to 5 (very high). An apple was considered as mealy if its mealiness score was above 2.5. In addition,

instrumental firmness was assessed using an automate penetrometer (TA.XT.-PLUS, Stable Micro System) equipped with a 4 mm-diameter convex probe as described by [56]. Assessments were performed on the two unpeeled and opposite sides of each fruit in the blush and shaded regions. Ten apples were analysed for individual genotype from harvest to 120DAH. Forces in Newtons (N) measured at 7 and 9 mm of displacement were used to estimate an average force F_{fmoy} (N) [57].

2.3 Cryo-Scanning Electron Microscopy

Apple flesh was ruptured at room temperature and prepared to expose the inner surface of the broken sample for cryo-scanning electron microscopy (SEM). The sample was reduced to a square of 5 mm with a thickness of 2 mm. The fractured biological surface was fixed with carbon on the stub and immediately introduced into the SEM (Phenom G2 Pro, PhenomWorld) in a frozen chamber (-20°C) for 30 min.

2.4 Cell cohesion test

The expert panel scored 158 apples (Additional file 1). The apples were used to develop the cell cohesion test. Three radial cylinders with diameter and thickness of 1 cm each were cut from fresh apple parenchyma. Samples were suspended into 5 ml of tap water in a 50 mL tube, mixed using a vortex at 3000 rpm for 2 min and stained with 50 % toluidine blue dye. 40 μ l of suspended cells were immediately spotted onto a microscopy slide and visualized with a binocular microscope at 7x magnification (Olympus SZX16). Images were captured with a digital camera. Two replicates per sample were analysed. Automatic counting of individual cells was achieved using the function “*Analyze particles*” from ImageJ software [58] after image conversion from RGB coloured picture to black and white. Statistical analyses were performed with R software. Pearson’s correlation was calculated between individual cell density in the solution and the mealiness score from sensory evaluation and validated with a significance test.

2.5 AIM extraction

Alcohol Insoluble Materials (AIMs) were extracted using an automated extraction method with accelerated solvent extraction unit ASE® 350 (DIONEX, CA, USA). Approximately 4 g of frozen apple flesh was lyophilized, dried at 40°C overnight under vacuum over P₂O₅ and ground into fine powder using FastPrep-24 instrument (MP Biochemicals, CA) at a speed of 6.5 m.s⁻¹ for 60 s. Samples were extracted using 80% ethanol at flow 2 mL/min in 22 ml cells of the ASE 350. ASE extractions were performed at 100 °C with flow time of 6 min, followed by rinse volume 150%, and a purge time (N₂) of 30 s. 100DAF samples were extracted twice and H, 60 and 120 DAH samples were extracted three times as technical replicates. The procedure of extraction was conducted for two consecutive years (2009 and 2010). AIMs were dehydrated at 40°C overnight under vacuum over P₂O₅. All biochemical measurements were performed from dry AIM.

2.6 Pectin enzymatic profiling

For each AIM sample, 5 mg were suspended in 1 mL of acetate buffer (5 mM, pH 5) and degraded by pectin lyase (0.55 nkatal) prepared according to [59]. Enzymatic digestion and mass spectrometry acquisition were performed according to [60]. Briefly, oligosaccharides in the hydrolysates were analysed by MALDI-TOF MS using an Autoflex III MALDI-TOF/TOF spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Spectra were recorded in the mass range *m/z* 600–1400 and exported to Flex Analysis 3.0 software (Bruker) and preprocessed. Ion masses and intensities were normalized according to the ion peak attributed to DU4m4. Oligosaccharide nomenclature was as follows: the letter U corresponds to uronic acid, the following number refers to the number of residues in the oligomer (i.e., DP degree of polymerization), acetyl and methyl esters substitutions were referred to as a and m, respectively, followed by the amount of groups. According to this nomenclature, DU4m4 refers to an oligo-hexouronide of DP4 fully methyl esterified and unsaturated at the nonreducing end. Each AIM sample was analysed in triplicate. Kruskal-Wallis (P-value < 0.05) analyses were performed with R software on MALDI-TOF MS ion intensities.

2.7 GalA content and degree of methylesterification

GalA content was quantified after sulphuric acid hydrolysis. AIM samples were dispersed in 13 M sulphuric acid for 30 min at 30 °C and then hydrolysed in 1 M sulphuric acid (2 h, 100 °C). Uronic acids from the acid hydrolysates were quantified using the methoxydiphenyl colorimetric acid method.

Analysis of pectin degree of methylesterification (DM) was performed using gas chromatography method after saponification of the AIM. AIM were precipitated after addition of acetone and centrifugation at 14 000 rpm for 10 min and supernatants were transferred into GC vials. A 73-75% DM citrus pectin sample was used as control. Methanol at 0.8 mg mL⁻¹ was used as external standard. Butanol at 0.35 mg mL⁻¹ was added to each sample as internal standard. GC was performed using a column Optima Wax 30m x 0.25 mm x 0.25 µm, and a temperature program as following: from 50°C (held for 2 min) to 100°C at 15°C min⁻¹, then from 100°C to 217°C (held for 2 min) at 20°C min⁻¹. The DM was calculated as moles of methanol per mol of GalA.

2.8 RNA extraction, amplification and microarray hybridization

Total RNAs were extracted from 4 g of frozen fruit flesh tissue ground in liquid nitrogen using a CTAB extraction buffer as described in [11]. mRNAs were amplified, labelled and co-hybridized according to [23] as following: aRNAs were produced with Message AmpII aRNA amplification kit (Ambion) from 200 ng of total RNA. Then, 5 µg of each aRNAs were retrotranscribed and labelled with either Cyanine-3 or Cyanine-5 fluorescent dye (Interchim, Montluçon, France). Labelled samples were combined as 30 pmol for each dye and co-hybridized to the Nimblegen microarray AryANE v1.0 containing 135000 60-mers oligonucleotide probes as described in [23]. Deva software (Nimblegen) was used to extract pair-data files from the scanned images, obtained using the MS200 microarray scanner (Roche Nimblegen).

Based on sensory score, genotypes were associated in 3 **mealy**/non-mealy pairs: P1 (**M40/M49**), P2 (**M74/M20**) and P3 (**M48/M16**). The reference RNA, a non-mealy hybrid, was hybridized along with the treatment RNA, a mealy hybrid, with the opposite dye. Expression for each gene was worked out as the mean and standard error of two biological replicates hybridized on two independent arrays with fluorochrome reversal (dye switch: 2009

and 2010) for the four time points and for the three pairs, for a total of 24 arrays. P1 and P2 were also analysed at harvest and 60 DAH for 2007 and 2011 (6 arrays).

2.9 Microarray analyses

All statistical analyses were conducted as described [61] with the R software (R development Core Team, 2009). Briefly, data were normalized with the Lowess method, and differential expression analyses were carried out using the *lmFit* function and the Bayes moderated *t* test using the R package LIMMA [62] from the Bioconductor project. To estimate gene expression levels, the normalized expression values were corrected from background.

Genes were considered differentially expressed if the *t*-test *P*-values of the paired sample were below 1%. GENESIS software (http://genome.tugraz.at/genesisclient/genesisclient_description.shtml) was used to visualize results. Functional classification was based on Mapman ontology [63]. An enrichment analysis (Wilcoxon rank sum test) was performed with MapMan software. Kruskal-Wallis (*P*-value < 0.05) analyses were performed on *MdPME2* intensities with R software.

The microarray data have been submitted to the Gene Expression Omnibus data base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under the accession number GSE59947.

2.10 RT-qPCR and semi-quantitative PCR

Total-RNA samples used for the microarrays experiments were treated with 2U of DNase I (Promega, USA). cDNAs were synthesized using 1 µg of DNA-free-RNA with 1 µl of oligo(dT)15 (Promega), 200U of MMLV-RT (Promega) and 0.5 mM of each dNTP for 1 hr at 42°C in 25 µl. The RT-qPCR were performed in duplicate with 3 µl of 10x diluted cDNA in a final volume of 15 µl using the IQ SYBR Green Super Mix (Quanta biosciences). Specific forward and reverse primers concentration was set at 0.3 µM. RT-qPCR reactions were run on a CFX96 Touch™ Real-Time PCR detection system (Bio-Rad, USA) under the following conditions: an initial step at 95°C for 3 min, then 40 cycles of 95°C for 10 sec and 60°C for 1 min, and a final dissociation curve ranging from 60°C to 95°C. Amplification and dissociation curves were monitored and analysed with CFX Manager software v1.6 (Bio-Rad). Primers were designed for short and specific amplification of the microarray probe region of the

selected sequences with Primer 3 plus software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (Additional file 10). For each run, single product amplification was confirmed by melt curve analysis. The amplification efficiency was tested for each primer pairs using a dilution curve method over a 6 point dilution series (from 0.1 to 0.002) on a pool of cDNAs containing all genotypes and developmental stages. Primer pairs selected for further analysis have efficiencies above 91%. RT-qPCR was carried out for 5 genes, 2 pairs at different time points.

Based on the microarray results, three reference genes with similar expression levels in all samples were selected to calculate a normalization factor: MDP0000645828 (GADPH), MDP0000217860 and MDP0000271281 (respectively annotated as drought-responsive family protein and putative porin). Relative expression level was calculated using a formula derived from the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [$\Delta Ct = (Ct_{tag} - Ct_{ref})$], where Ct is the threshold cycle, tag is the target gene, and ref is the reference gene [64]. Specific primers were designed for MDP0000222620 and MDP0000245813 gene based on GDR CDS sequences (<http://www.rosaceae.org/>) (Additional file 10).

Semi-quantitative PCR were carried out on cDNA from M20 and M74 at four developmental stages, each one being a pool of 2009 and 2010 cDNAs. Reactions were run for 30 cycles on diluted cDNA (3 point dilution series from 0.1 to 0.001) using GoTaq®Flexi DNA polymerase (Promega) according to the manufacturer's protocol.

2.11 Genome-wide identification and analysis of PME genes in *Malus domestica* genome

The HMM profile of the Pectinesterase proteins (PF01095) was downloaded from the Pfam database (<http://pfam.sanger.ac.uk>), and used as a query to search the translated Apple genome (<http://www.rosaceae.org/>) using the HMMER 3.0 program with default parameters (hmm.org). All sequences collected were checked using the NCBI conserved domain database [65]. Protein coding genes without a complete pectinesterase domain (EC 3.1.1.11) or with extra and incoherent domain were discarded from further analyses.

Multiple protein sequence alignments were performed with the online MUSCLE tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Phylogenetic analysis was carried out by the

neighbor-joining method using MEGA 5 software [66] using a p-distance model and pairwise deletion for missing data treatment; 1,000 replicates were used for bootstrap analysis.

MdPMEs sequence alignment and phylogenetic tree data are available on Dryad (<http://datadryad.org/>) under the DOI number: 10.5061/dryad.4337n.

2.12 *MdPME2* full length cDNA cloning

A 3'RACE cDNA amplification was performed with the 3'RACE system kit (Invitrogen) on 1µg of DNase free total-RNA from genotype M20 according to the manufacturer's protocol. A forward primer (F6) was designed on the AryANE_v1_00084532 microarray probe sequence. The PCR program included an initial denaturation at 94°C for 5 min, then 40 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 45 sec and 72°C for 1 min 30 sec, and a final extension at 72°C for 10 min. A reverse primer (R) was then designed on the obtained sequence.

Full length cDNA was cloned using the high fidelity Phusion DNA polymerase (Finnzymes) and primers MDP222620 F5 and R on a pool of cDNA from the M20 genotype according to the manufacturer's instructions. A nested PCR was then performed on the first PCR product with the forward and reverse primers MDP222620-F1 and R. The PCR product was purified using the PCR clean-up system (Promega) according to the manufacturer's instructions, and cloned in the pENTR/D-TOPO vector using the pENTR directional TOPO cloning kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. One Shot TOP10 chemically competent *E.coli* cells (Invitrogen) were then transformed by heat shock with 2 µL of the reaction. The transformed bacteria were grown overnight at 37°C on LB agar medium containing 50 µg/ml kanamycin as selective agent. Positive clones were selected by PCR amplification of the inserted cDNA using F and R primers and a plasmid sequenced to confirm the proper orientation of the cloned fragments.

All DNA sequencing were performed by Genoscreen (<http://www.genoscreen.fr>) and *MdPME2* sequence was submitted to [GenBank:KM252690]. All primers are described in Additional file 10.

2.13 Subcellular localization by transient expression in *Nicotiana tabacum*

The full length *MdPME2* cDNA was cloned in the destination vector pH7RWG2 (containing mRFP and allowing a C-terminal fusion to *MdPME2*, <http://gateway.psb.ugent.be/>) by recombination using the gateway cloning system (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Plasmids were extracted using Nucleospin plasmid kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's protocol.

Plasmid containing the *MdPME2*-mRFP construct was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 by electroporation. The transformed *A.tumefaciens* were inoculated into 2 ml of LB supplemented with 50 µg/ml of rifampycine, 25 µg/ml of gentamycine and 50 µg/ml of spectinomycin overnight at 28°C. The diluted bacteria were used to infiltrate young *Nicotiana tabacum* leaves according to the protocol previously described [67]. The sub-cellular localization was analyzed 2 to 3 days after infiltration using a confocal laser scanning microscope (Nikon A1, BIBs platform at INRA Nantes). To verify cell wall localization, some leaf fragments were plasmolysed for 5 min in 30% glycerol prior to microscopic observation.

3 RESULTS

3.1 Sensory evaluation of fruit mealiness during storage

Apple texture including mealiness was evaluated by a panel of experts from harvest to four months of cold storage. Mealiness assessment is based on the sensation of fruit dry flesh associated with a grainy texture. It is a genetically determined trait also dependant on environmental conditions [6]. In order to identify stable fruits phenotypes over the years, notations were repeated for four consecutive years and led to the selection of six hybrids (Table 1). These hybrids are full-sibs from a population segregating for mealiness [11, 24]. The three hybrids M16, M20 and M49 produced non-mealy apples while the three hybrids M40, M48 and M74 displayed mealy apples after cold storage. Their degree of mealiness increased greatly between two and four months of cold storage. Nonetheless, a slight influence of the production year was observed on mealiness notations. In 2011, apple fruits became mealy earlier displaying higher score at 60 and 120 days after harvest (DAH) when compared with the other years. On the opposite, in 2010 the mealy hybrid M40 displayed a

lowest level of mealiness at 120 DAH than the other years (Table 1). It is noteworthy that M48 was always less mealy than the 2 others hybrids M40 and M74.

3.2 Fruit texture instrumental phenotype

Measurement of fruit firmness on unpeeled apples using a penetrometer revealed no difference between mealy and non-mealy apple fruits at 120 DAH (Figure 1A). Mealiness is therefore not correlated with the measurement of firmness in this study. However, the rate of softening, measured as the loss of firmness, between H and 60DAH, was different between mealy and non-mealy apple fruits (Figure 1B). The measured force decreased by 42.1 % between harvest and 60 DAH for the mealy apples, and in contrast by only 16.5 % for the non-mealy apples.

In order to assess fruit mealiness with an alternative method to sensory analysis, a cell cohesion test was developed. This test is based on the hypothesis that fruit mealiness results from cell detachment rather than cell wall disruption during mastication. From the mealiness evaluation of 158 apples fruits (extended to other genotypes including “Golden Delicious”), a significant positive correlation was observed between sensory analysis and detached cell quantification (Pearson coefficient correlation = 0.83, P-value < 0.01) (Additional file 1). This result confirmed the hypothesis that parenchymal cells of mealy apple fruits are less strongly bound to each other than cells from non-mealy apple fruits.

This hypothesis was further confirmed using SEM imaging of parenchyma surfaces obtained from fractured apple flesh. Representative images of mealy and non-mealy apple fruits phenotyped at harvest and 120 DAH are shown Figure 2. At harvest (Figure 2A-C), the fracture pattern of apples from all hybrids is characterized by the disruption of individual cells and the presence of air gaps. At 120 DAH, the fracture pattern of non-mealy samples (Figure 2B) presented a similar pattern to that observed at harvest, with burst cells. In contrast, mealy fruit patterns at 120 DAH were characterized by a palissadic arrangement of the cells and minimal cell rupture (Figure 2D). In accordance with the hypothesis, mealy apple tissues were fractured by cell detachment rather than by cell rupture.

3.3 Transcriptome characteristics of mealy apples

In order to characterize the transcriptome of mealy apples, the four genotypes which displayed the strongest phenotypic differences were studied as mealy (M40, M74) *versus* non-mealy (M49, M20) pairs over the developmental (100 DAF, H) and storage (60 DAH, 120 DAH) periods during several years. The expression profiles of M40 and M74 apples were respectively compared to the expression profiles of M49 and M20 apples. Differentially expressed genes were identified with significant P-values for paired sample t-tests (P-value < 0.01). We hypothesized that genes involved in mealiness displayed a differential expression pattern for each pair of mealy / non-mealy hybrids. Genes were selected only when they displayed identical expression patterns for both pairs (up or down regulated for both pairs) for at least one time point. Thus, a total of 1783 differentially expressed transcripts were selected at one or more developmental stages. The number of differentially expressed transcripts increased in concert with mealiness development: the main phenotypic changes were initiated about 60 DAH which was also the time point displaying the highest transcription deregulation (Figure 3A). Based on MDP genes annotations, the differentially expressed transcripts were classified into functional categories (Additional file 2). The most represented functions were linked to protein modifications (11%, Wilcoxon test: P-value < 0.05), transcriptional regulation (5.6%, P-value = 0.09), biotic stress responses (4.6%, P-value < 0.05), photosynthesis (3.2%, P-value < 0.05), cell wall modification (1.9%, P-value < 0.05), and unknown functions (33.8%, P-value < 0.05). Moreover, sense (S) and anti-sense (AS) probes were designed for each annotated apple CDS, and 13.6% of the differentially expressed probes corresponded to AS transcripts. Celton, Gaillard *et al.* [23] demonstrated relatively high levels of AS transcription in apple fruits and seeds compared with other organs. This should be considered for further studies on fruit development as these AS transcripts are likely to be involved in small interfering RNA (siRNA) dependent negative regulation of the coding mRNAs.

In order to validate the microarray data, the relative transcript abundances of a subset of differentially expressed genes were tested by RT-qPCR, using cDNA from mealy and non-mealy apples. The results were in agreement with those obtained from the microarrays analysis (Additional file 3). The observations of gene expression level differences between mealy and non-mealy apple fruits were similar with both techniques (Pearson correlation coefficient = 0.86, P-value < 0.01).

3.4 Constitutively deregulated genes associated with mealiness

The majority of phenotypic changes associated with mealiness were observed 60 days after harvest. However, it is likely that molecular events are initiated early in the kinetic of fruit development. Based on this hypothesis and in order to identify genes possibly useful as early molecular markers of mealiness, the study was focused on genes which displayed differential expression patterns during the entire apple fruit development and cold storage period. Using these criteria, 53 genes were selected (Figure 3B). Apples from the M48 hybrid were always less mealy than apples from M40 and M74 (Table 1). Therefore, the third comparison between M48 and M16 apples was used to select genes involved in the development of fruit mealiness regardless of the severity of the phenotype. Genes with two distinct profiles were selected. This drastic selection led to the identification of 16 relevant genes (Figure 4). Thirteen genes were down-regulated at all time points for all 3 pairs such as MDP0000322658, similar to AT5G49690 from *Arabidopsis thaliana* coding for a glycosyltransferase (GT) potentially involved in pectin synthesis, and MDP0000222620, similar to AT1G53830 coding for a pectin methylesterase (PME) involved in pectin modification. Three transcripts were up-regulated including the AS transcript of the gene MDP0000204610 similar to AT1G21240 annotated as “Wall Associated Kinase” (WAK). WAKs are pectin receptor-like proteins, and some *Arabidopsis* WAKs have been shown to be involved in cell expansion during plant development [25, 26]. Apples are climacteric fruits and hormones, particularly ethylene, are known to play a central role during fruit maturation [27]. In this study, no genes related to hormonal pathways were differentially expressed during the complete time course. Such results are not surprising as early cellular events during ripening are hypothesized to be less dependent on ethylene [28, 29]. This strict selection can also explain why hormone-related genes are not revealed. However, ethylene production was measured during storage and no significant difference was noticed between mealy and non-mealy apples at all the time points (see protocol and results In Supplemental file 4). Some genes displayed differential expression patterns at least at one time point, but none of them were validated using the third pair. This result does not question the role of hormonal pathways during apple ripening but it suggests that a hormonal pathway may not be the key regulator of mealiness in the studied population. Moreover, fruit ripening results from both ethylene-dependent and ethylene-independent pathways [10, 11, 30]. These results support the hypothesis that mealiness and softening may involve two different mechanisms.

These 53 selected genes are potentially involved in mealiness development during apple fruit ripening and cold storage. Among them, the MDP0000222620 gene coding for a protein annotated as a PME is one of the most relevant as PMEs have major role in pectin remodeling in plant cell wall. PMEs are known to be involved either in the stiffening or in the loosening of the cell wall [31]. In the case of fleshy fruits, the role of PMEs is usually associated with pectin degradation that occurs during fruit ripening [32]. That is in accordance with the observation that parenchyma cells from mealy fruit tend to easily detached from each other due to the alteration of the pectin rich middle lamina. In the present study, MDP0000222620 transcript expression levels were significantly higher in non-mealy than in mealy fruit during the whole kinetic of development (Figure 5), suggesting that this gene might be involved in cell wall stiffening. Furthermore, the expression level of MDP0000222620 was higher in M48 (the least mealy hybrid) compared to M40 and M74 hybrids (Figure 5). MDP0000222620 transcript expression pattern was also consistent with phenotypic variations.

3.5 *MdPME2* cloning and the apple PME family

Even if the probe AryANE_v1_00084532 was firstly assigned to the MDP0000222620 gene, we actually showed that it reveals a close homolog of it: MDP0000245813. The complete CDS sequence, hereinafter named *MdPME2*, was cloned from M20 apples and was shown to share 97% of similarities to the MDP0000245813 gene identified on the alternative genes set published [22] (figure 6A, sequences alignments in Additional file 5). The probe sequence corresponding to MDP0000222620 is only 80% similar to MDP0000245813 sequence. Semi quantitative RT-PCR clearly showed that only the MDP0000245813 gene and not the MDP0000222620 gene was expressed in both M20 and M74 genotypes (Figure 6B). Therefore, the probe designed on MDP0000222620 sequence actually reveals the transcriptional activity of the MDP0000245813 gene.

In silico analysis of the MDP0000245813 protein sequence, confirmed the presence of a processed amino-terminal PRO domain similar to a PME inhibitor domain (PF04043) followed by a complete catalytic PME domain (PF01095). A processing motif (RRLI) was also identified between both domains (Figure 6A). This latter was described as a cleavage site suggesting the cleavage of the PRO domain during the process of the protein maturation [31, 33]. The current knowledge on the PME family and these observations support the hypothesis that *MdPME2* codes for a pectin methylesterase.

In all studied species, genes coding for pectin methylesterases belong to large multigenic families and their members might be involved in different developmental processes [33, 34]. To determinate if other *MdPME* genes are involved in development of fruit mealiness, all apple *MdPME* homologues were identified within the apple v1 genome sequence [22].

Based on protein similarities to the PME conserved domain (PF01095), 60 genes were identified as potential pectinesterase family members. Molecular phylogenetic analysis showed that the *MdPME* family is divided in two groups. As observed with the Arabidopsis *AtPME* family [33], PME proteins from group type I are characterized by the presence of a PRO domain which is absent in PMEs from group type II. The *MdPME2* belonged to the type I characterized by PME proteins displaying a PRO domains (PF04043) (Additional file 6).

Moreover, *MdPME2* displayed a unique differential expression pattern during fruit maturation among all *MdPMEs* annotated genes (Figure 7). Few PMEs annotated genes displayed differential expression patterns between mealy and non-mealy apples, but none of them remained consistently differentially expressed during the kinetic of development. Roles of other PMEs in cell wall remodelling during apple maturation is not excluded. However, *MdPME2* is the only gene of the family to be more highly expressed during the whole kinetic analysis in non-mealy hybrids compared with mealy apples. This result underlined the specific role of *MdPME2* in apple mealiness.

3.6 MdPME2 subcellular localization

To investigate the subcellular localization of the MdPME2, a C-terminal translational mRFP fusion was generated and transiently expressed in *N. tabacum* leaves. The mRFP signal was predominantly observed at the cell periphery, consistent with expected cell wall localization (Figure 8A). To further confirm the cell wall localization, transformed leaves cells were plasmolysed. As expected, the dehydration and compression of the cytoplasm induced dissociation of the plasma membrane from the cell wall. The mRFP signal was observed both in the apoplasm and in the cell wall confirming the exportation of the recombinant protein (Figure 8B). This subcellular localization is in accordance with the possible role of the *MdPME2* in the modification of the cell wall structure in mealy apples, particularly the pectin components.

3.7 Apple fruit pectin characterization

To investigate whether pectin was altered during ripening of apple mealy apples the degree of methylesterification (DM) of uronic acids was determined on alcohol insoluble materials (AIMs) from pairs 1 and 2 in 2009 and 2010. The DM was about 75% at 100DAH. It decreased slowly until harvest and remained stable during cold storage (Additional file 7). Hence, these results indicated, as expected, that the apples underwent a de-methylation process through apple development before harvest and in early stage of ripening but they did not reveal global differences between mealy and non-mealy pectins when analyzed at the whole fruit level.

Another approach was to investigate changes in apple pectin architecture. The fine structure of homogalacturonans (HGs) was determined using pectin enzymatic oligosaccharide fingerprinting with oligouronides mass profiling. The peak areas of individual ion signals of the mass spectra were used to calculate relative abundance of each structure allowing the identification of different patterns of methylation and acetylation on the oligouronides. A direct comparison of each oligouronide using Kruskal-Wallis tests showed significant differences between mealy and non-mealy apples. Mealy apples displayed a significantly higher abundance of highly methylesterified structures (DU4m2, DU4m3, DU5m3 and DU5m4) during almost the complete kinetic. Non-mealy apples displayed higher abundance of highly methylesterified structures which are acetylated, such as DU5m4a1 or DU6m2a2, mainly from 60DAH onwards (Additional file 8). These results are consistent with *MdPME2* expression which is higher in non-mealy genotypes resulting in de-methylesterified blocks of free carboxyl groups. An abundance of highly methylesterified but acetylated moieties were also measured in non-mealy apples. O-acetylations of pectins may reduce pectin accessibility to PME enzymes [35]. Therefore PMEs may not act on these acetylated blocks. These results suggest that PMEs demethylesterify pectin in a processive manner leading to demethylesterified blocks. Some local structural rearrangements may explain some specific cell wall functionalities. Furthermore, a putative pectin acetylerase, MDP0000162976, was significantly less expressed in non-mealy hybrids (pairs 1 and 2) at 120DAH (Additional file 2). The role of a pectin acetylerase is to cleave the ester bond between a glycosyl carbon and an acetyl group. This enzyme could deacetylated pectins of mealy apples which explains abundance of methyl but not acetylated structures. Its low activity in non-mealy results in maintain of acetylated pectins which cannot be demethylesterified by PMEs. This gene might play an interesting role in regulating PMEs activities and targeting localized

demethylesterification of pectins. But it could not be considered as an early molecular marker of mealiness.

4 DISCUSSION

4.1 A novel test to quantify mealiness

The confusion made between softening and mealiness results from the lack of easy and objective tests to assess mealiness. Currently, softening is evaluated using a penetrometer by measuring the puncture force required to penetrate the apple flesh using a convex probe [12, 36]. However, apple fruits may sometimes soften and in addition develop unfavourable traits such as mealiness [7]. Mealiness has been assessed by measuring the tensile strength required to separate flesh cells [5, 37, 38] or with sensory analysis performed by a trained panel [11, 39]. In the present study, apples were assessed by sensory analysis which remains the most reliable method to evaluate mealiness [40, 41]. Indeed, mealiness revealed by sensory analysis was not revealed by penetrometry: no difference between mealy and non-mealy apples was detected based on puncture force. Nevertheless, the softening rate was higher in mealy apples compared with non-mealy apples when assessed with penetrometry. These observations suggest that the rate of softening, rather than the absolute softness of the fruit, may be positively correlated with mealiness.

Sensory analysis by a trained panel of four people is time consuming, expensive, difficult to transpose easily to other laboratories and the number of samples that can be analysed is limited. A few reports investigated some assumptions about cell wall modifications and apple fruit mealiness in order to develop a new test to quantify mealiness. Assumptions are based mainly on microscopic observations of the fracture surface obtained *via* a tensile test. Different modes of tissue failure can be observed such as cell fracture or cell-to-cell separation. Mealy apples are characterized by neighbouring cells separating from each other at the level of the middle lamella without any damage [5]. SEM observations support this first description of mealiness: cell walls appearing thicker and middle lamella stretching in mealy apples. Mealiness may result from the separation of rounded cells during mastication which leads to a lack of juice and a sandy consistency. The development of the cell cohesion test to assess mealiness was based on this hypothesis. A similar test based on the measurement of the

degree of cell separation by shaking flesh tissue disks in a sucrose solution for 8 hours was proposed [42]. In this test, mealiness assessment is based on the weight lost by the disks after shaking. However, cell to cell separation may be the result of individual cell isolation or of clusters of cells. This may lead to imprecision if considering that detachment of clusters of cells is due to an earlier stage of cell wall disassembly than detachment of individual cells.

A link between the observation of angular cells and flesh firmness has been established [43]. However the rapid method used to study cell morphology was based on fruit cell isolation and solubilization of pectin. This method is not appropriate for the characterisation of mealiness. In the present study, the cell cohesion test is a simple test able to discriminate mealy and non-mealy apple fruits within a very short time by quantifying only isolated cells that separated after shaking flesh tissue in water. This test requires little specific material and can be applied to multiple samples.

4.2 Molecular characterization of apple mealiness

Mealiness has often been associated with a defect in the adhesion and rigidity of the cell walls [5, 44]. These phenotypes might be the consequence of cell wall disorganization carried out by several parietal enzymes [9, 45]. However, only few genes coding for cell wall related proteins were identified in the present transcriptional study. Among these genes, several transcripts displaying unexpected profiles were identified. First, a gene coding for a PME was less expressed in mealy apples although PMEs are known to be involved in pectin solubilization [33]. Secondly, AS expression from a WAK annotated locus was higher in mealy apples. Genes transcripts in AS orientation, often described as precursors of nat-AS-siRNAs, could play a role in post-transcriptional gene silencing of the complementary mRNAs [46]. WAK encoding genes are a small multigenic family. WAKs are supposed to act as signaling proteins that are trans-membrane receptors of pectin residues involved in plant defense responses [25]. It is possible that they are involved in the maintenance of cell wall integrity [47]. Interestingly, this result suggests that WAK AS transcripts might indirectly play a role in apple cell wall integrity, resulting in stiffening of the cell wall. In contrast, another AS WAK transcript was less expressed in mealy apples, but its expression pattern was less consistent amongst the genotypes.

Surprisingly, other genes would have been expected to be differentially expressed but they did not show differential patterns of expression between mealy and non-mealy apples. For example, polygalacturonases (PGs) which function is to depolymerise homogalacturonans by cleaving stretches of unesterified uronic acids (GalA) residues are believed to have a role in apple fruit softening. In [14], the silencing of *MdPG1* in “Royal Gala” resulted in firmer fruits. Further analyses by [29] shown that PGs are mainly involved in the advanced stage of apple softening. In our study, transcripts with sequence similarity to PGs did not display differential expression pattern between mealy and non-mealy apples during the whole time course. However, *Md-PG1* (MDP0000326734) was differentially expressed for both pairs only at 120DAH (Additional file 2) which confirm a role of *Md-PG1* in the advanced stages of mealiness development.

Another gene, *MdAF3*, encoding an α -L-arabinofuranosidase, has been suggested to be associated with mealiness in apple fruits [11]. The authors report distinct patterns of *MdAF3* transcription between certain mealy and non-mealy apple fruits at harvest and after two months of cold storage. *MdAF3* expression did not show a consistent profile in the three analysed pairs in this study, suggesting *MdAF3* is not involved in the development of mealiness.

4.3 Specific role of a *MdPME2* gene in mealiness development

One *MdPME* gene, named *MdPME2*, was identified as differentially expressed in all of the stages of fruit development in this study. *MdPME2* expression remained decreased in mealy apples but remained high in non-mealy apples. *MdPME2* expression was also affected by the fruit production year.

The majority of studies of the role of PMEs in apple fruit ripening has involved measurements of PME activities from fruit set to over ripe stages in “Mondial Gala” [34] or during cold storage of “Fuji” and “Golden Delicious” fruits, classified respectively as firm and soft cultivars [12]. None of these cultivars have ever been classified as mealy. No link between the enzyme activity and *MdPME* mRNA expression was demonstrated. In these studies, two different *MdPME* genes were identified. First, *MdPME1*, which was shown to be specifically expressed in flowers and not in apple fruits [48]. A *MdPME* primer set was used by Wei *et al.* to detect a second *MdPME* gene [12]. In the present work, the gene MDP0000196867

possibly corresponding to the Wei *et al.* primers, was not differentially expressed according to mealiness.

In silico analysis of the *MdPME2* protein sequence revealed the presence of a transmembrane domain (signal anchor) required for protein exportation to the cell wall. Localization of the *MdPME2* protein by mRFP-tagged fusion protein experiments confirm its translocation into the apoplast where the PME enzyme is hypothesised to act on the cell wall components.

Amongst the 60 identified PMEs, *MdPME2* displayed a unique expression pattern suggesting a specific role during apple development. Many studies have focused on the role of PMEs in pectin depolymerisation during fruit ripening [9, 10]. However, recent works tend to re-evaluate this role. In apricot, PME activity increased in a firm cultivar while it decreased in the soft cultivar [49]. Anti-sense inhibition of *SlPE1*, a minor PME isoform in tomato fruits, results in fruits that soften faster than controls [50]. Therefore PMEs could be involved in the deconstruction of the cell wall during fruit development and storage by promoting the action of cell wall hydrolases such as PGs which can degrade the de-esterified pectins. PMEs also may have a role in cell wall stiffening. De-esterified pectins interact with bivalent ions Ca^{2+} and are hypothesised to form egg-box structures. This conformation is supposed to limit the access of PGs to the pectin backbone and therefore to prevent pectin degradation [31]. Results from the present work are consistent with this second property. Maintaining high expression of *MdPME2* in fruit flesh would increase Ca^{2+} bound to the cell wall, subsequently maintaining apple flesh integrity and thus preventing the apparition of mealiness.

Moreover, significant differences were observed in the pectin fine structures between mealy and non-mealy apples while no significant changes were noticed in the degree of methylesterification of the AIM. It has been demonstrated that PMEs can de-esterify homogalacturonic acid (HGA) in various ways. They may act in blockwise or random manners creating micro-domains with different properties within the cell walls [51]. In agreement with the observation of calcium rich zones at tricellular junctions or the corner of intercellular spaces, which remain intact after the rest of the middle lamella had been degraded [52], it has been suggested that local calcium linked gels of low-ester pectin could be responsible for intercellular adhesion [45]. This supports the hypothesis that the identified *MdPME2* might locally change the pectin properties in a way that is not observable at a whole fruit scale but only locally. Recently, differences of pectin structure were identified by immunodetection between two apple cultivars during fruit development [53]. ‘Royal Gala’, a

soft cultivar, displayed more highly methylesterified HG regions in corners of tricellular junctions compare to ‘Scifresh’, a firm cultivar, which is associated with corners filled with non or low methylesterified pectin. Both results suggest that PME_s could act locally. Thus, MdPME₂ might play a role in determining cell-to-cell cohesion during apple fruit ripening by regulating calcium binding to the cell wall.

5 CONCLUSIONS

In this paper, a new and simple method was developed to quantify mealiness and allowed the characterization of genotypes with contrasting phenotypes for this trait. Analysis of differential expression profiles using the microarray method led to the identification of a number of genes that might be involved in mealiness development in apple fruits. Amongst them, the *MdPME₂* gene seems to be a relevant molecular marker associated with apple mealiness. Further investigations to specify the role of *MdPME₂* in the molecular events related to the development of mealiness would require an enzymatic activity characterization and antibody production.

Acknowledgments

This work was supported by the Institut National de la Recherche Agromomique and by the Region Pays de la Loire.

*The authors would like to thank Roland Robic for his help in orchard, lab tasting and analyses and all sensory experts involved in this analyse; Céline Gourdon for her contribution in sample preparation and data analysis; Axelle Boudier for her help with *N. tabacum* transformation and confocal observations; the INRA-Horticultural experimental Facility (UEH0449) for the apple trees maintenance; the ANAN and I-MAC platforms of the SFR QuaSaV for respectively microarray and microscopic facilities access; the BIBS (INRA Nantes) platform for biochemical analyses; Dr Marc Lahaye (INRA / UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages) for his advice on biochemical analyses; Dr Gregory Mouille (IJPB / UMR1318) for providing the *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 clone; Dr Alexis Peaucelle (IJPB / UMR1318) for helpful discussion and Dr Thomas Baldwin for critically reading the manuscript.*

REFERENCES

1. White PJ: **Recent advances in fruit development and ripening: an overview.** *Journal of Experimental Botany* 2002, **53**:1995-2000.
2. Symoneaux R, Galmarini MV, Mehinagic E: **Comment analysis of consumers likes and dislikes as an alternative tool to preference mapping. A case study on apples.** *Food Quality and Preference* 2012, **24**:59-66.
3. Cantu D, Vicente AR, Greve LC, Dewey FM, Bennett AB, Labavitch JM, Powell AL: **The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to Botrytis cinerea.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 2008, **105**:859-864.
4. Seymour GB, Manning K, Eriksson EM, Popovich AH, King GJ: **Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture.** *Journal of Experimental Botany* 2002, **53**:2065-2071.
5. Harker FR, Hallett IC: **Physiological changes associated with development of mealiness of apple fruit during cool storage.** *HortScience* 1992, **27**:1291-1294.
6. Johnston JW, Hewett EW, Hertog MLATM: **Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: A review.** *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 2002, **30**:145-160.
7. Iwanami H, Moriya S, Kotoda N, Takahashi S, Abe K: **Influence of mealiness on the firmness of apples after harvest.** *HortScience* 2005, **40**:2091-2095.
8. Carpita NC, Gibeaut DM: **Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth.** *The Plant Journal* 1993, **3**:1-30.
9. Brummell DA: **Cell wall disassembly in ripening fruit.** *Functional Plant Biology* 2006, **33**:103-119.
10. Goulao LF, Oliveira CM: **Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not a fruit.** *Trends in food science & technology* 2008, **19**:4-25.
11. Nobile PM, Wattedled F, Quecini V, Girardi CL, Lormeau M, Laurens F: **Identification of a novel α -L-arabinofuranosidase gene associated with mealiness in apple.** *Journal of Experimental Botany* 2011, **62**:4309-4321.
12. Wei J, Ma F, Shi S, Qi X, Zhu X, Yuan J: **Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit.** *Postharvest Biology and Technology* 2010, **56**:147-154.
13. Toivonen PMA, Brummell DA: **Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables.** *Postharvest Biology and Technology* 2008, **48**:1-14.

14. Atkinson RG, Sutherland PW, Johnston SL, Gunaseelan K, Hallett IC, Mitra D, Brummell DA, Schroder R, Johnston JW, Schaffer RJ: **Down-regulation of POLYGALACTURONASE1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit.** *BMC Plant Biology* 2012, **12**:129.
15. Lee YP, Yu GH, Seo YS, Han SE, Choi YO, Kim D, Mok IG, Kim WT, Sung SK: **Microarray analysis of apple gene expression engaged in early fruit development.** *Plant Cell Reports* 2007, **26**: 917-926.
16. Janssen B, Thodey K, Schaffer R, Alba R, Balakrishnan L, Bishop R, Bowen J, Crowhurst R, Gleave A, Ledger S, McArtney S, Pichler FB, Snowden KC, Ward S: **Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit.** *BMC Plant Biology* 2008, **8**:16.
17. Schaffer RJ, Friel EN, Souleyre E, Bolitho K, Thodey K, Ledger S, Bowen JH, Ma JH, Nain B, Cohen D, Gleave A, Crowhurst R, Janssen B, Yao JL, Newcomb R: **A Genomics Approach Reveals That Aroma Production in Apple Is Controlled by Ethylene Predominantly at the Final Step in Each Biosynthetic Pathway.** *Plant Physiology* 2007, **144**:1899-1912.
18. Costa F, Alba R, Schouten H, Soglio V, Gianfranceschi L, Serra S, Musacchi S, Sansavini S, Costa G, Fei Z, Giovannoni J: **Use of homologous and heterologous gene expression profiling tools to characterize transcription dynamics during apple fruit maturation and ripening.** *BMC Plant Biology* 2010, **10**:229.
19. Zhu Y, Zheng P, Varanasi V, Shin S, Main D, Curry E, Mattheis J: **Multiple plant hormones and cell wall metabolism regulate apple fruit maturation patterns and texture attributes.** *Tree Genetics & Genomes* 2012, **8**:1389-1406.
20. Jensen P, Makalowska I, Altman N, Fazio G, Praul C, Maximova S, Crassweller R, Travis J, McNellis T: **Rootstock-regulated gene expression patterns in apple tree scions.** *Tree Genetics & Genomes* 2010, **6**:57-72.
21. Botton A, Eccher G, Forcato C, Ferrarini A, Begheldo M, Zermiani M, Moscatello S, Battistelli A, Velasco R, Ruperti B, Ramina A: **Signaling pathways mediating the induction of apple fruitlet abscission.** *Plant Physiol* 2011, **155**:185-208.
22. Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troglio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, et al: **The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.).** *Nature Genetics* 2010, **42**:833-839.
23. Celton JM, Gaillard S, Bruneau M, Pelletier S, Aubourg S, Martin-Magniette ML, Navarro L, Laurens F, Renou JP: **Widespread anti-sense transcription in apple is correlated with siRNA production and indicates a large potential for transcriptional and/or post-transcriptional control.** *New Phytologist* 2014, **203**:287-299.

24. Kouassi AB, Durel CE, Costa F, Tartarini S, Weg WE, Evans K, Fernandez-Fernandez F, Govan C, Boudichevskaja A, Dunemann F, Antofie A, Lateur M, Stankiewicz-Kosyl M, Soska A, Tomala K, Lewandowski M, Rutkovski K, Zurawicz E, Guerra W, Laurens F: **Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values for apple fruit-quality traits using pedigreed plant material in Europe.** *Tree Genetics & Genomes* 2009, **5**:659-672.
25. Kohorn BD, Kohorn SL: **The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors.** *Frontiers in Plant Science* 2012, **3**:88.
26. Wagner TA, Kohorn BD: **Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion.** *The Plant Cell* 2001, **13**:303-318.
27. McAtee P, Karim S, Schaffer R, David K: **A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening.** *Frontiers in Plant Science* 2013, **4**:79.
28. Johnston JW, Gunaseelan K, Pidakala P, Wang M, Schaffer RJ: **Co-ordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene.** *Journal of Experimental Botany* 2009, **60**:2689-2699.
29. Ireland HS, Gunaseelan K, Muddumage R, Tacken EJ, Putterill J, Johnston JW, Schaffer RJ: **Ethylene regulates Apple (*Malus x domestica*) fruit softening through a dose x time-dependent mechanism and through differential sensitivities and dependencies of cell wall-modifying genes.** *Plant Cell Physiol* 2014, **55**:1005-1016.
30. Vicente A, Saladie M, Rose J, Labavitch J: **The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2007, **87**:1435-1448.
31. Micheli F: **Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology.** *Trends in Plant Science* 2001, **6**:414-419.
32. Handa AK, Tiznando-Hernandez ME, Mattoo AK: *Fruit development and ripening: a molecular perspective.* San Diego: Academic Press; 2011.
33. Pelloux J, Rusterucci C, Mellerowicz EJ: **New insights into pectin methylesterase structure and function.** *Trends in Plant Science* 2007, **12**:267-277.
34. Goulao LF, Santos Jo, de Sousa I, Oliveira CM: **Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples.** *Postharvest Biology and Technology* 2007, **43**:307-318.
35. Oosterveld A, Beldman G, Schols HA, Voragen AG: **Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp.** *Carbohydr Res* 2000, **328**:185-197.
36. Harb J, Gapper NE, Giovannoni JJ, Watkins CB: **Molecular analysis of softening and ethylene synthesis and signaling pathways in a non-softening apple cultivar, 'Honeycrisp' and a rapidly softening cultivar, 'McIntosh'.** *Postharvest Biology and Technology* 2012, **64**:94-103.

37. Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G: **Texture of fresh fruit.** *Horticultural Reviews* 1997, **20**:121-224.
38. Tu K, Nicolai B, Baerdemaeker JD: **Effect of relative humidity on apple quality under simulated shelf temperature storage.** *Scientia Horticulturae* 2000, **85**:217-229.
39. Allan-Wojtas P, Sanford KA, McRae KB, Carbyn S: **An integrated microstructural and sensory approach to describe apple texture.** *Journal of the American Society for Horticultural Science* 2003, **128**:381-390.
40. Harker FR, Maindonald J, Murray SH, Gunson FA, Hallett IC, Walker SB: **Sensory interpretation of instrumental measurements 1: texture of apple fruit.** *Postharvest Biology and Technology* 2002, **24**:225-239.
41. Mehinagic E, Royer GI, Symoneaux R, Bertrand D, Jourjon Fdr: **Prediction of the sensory quality of apples by physical measurements.** *Postharvest Biology and Technology* 2004, **34**:257-269.
42. Motomura Y, Takahashi J, Nara K: **Quantitative measurement of mealiness in apple flesh.** *Bulletin of the Faculty of Agriculture and Life Science Hirosaki University* 2000, **3**:23-28.
43. McAtee PA, Hallett IC, Johnston JW, Schaffer RJ: **A rapid method of fruit cell isolation for cell size and shape measurements.** *Plant Methods* 2009, **5**:5.
44. Smedt VD, b EP, c JDB, Nicolai B: **Microscopic observation of mealiness in apples: a quantative approach.** *Postharvest Biology and Technology* 1998, **14**:151-158.
45. Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP: **Intercellular adhesion and cell separation in plants.** *Plant, Cell & Environment* 2003, **26**:977-989.
46. Wang XJ, Gaasterland T, Chua NH: **Genome-wide prediction and identification of cis-natural antisense transcripts in Arabidopsis thaliana.** *Genome Biology* 2005, **6**:R30.
47. Engelsdorf T, Hamann T: **An update on receptor-like kinase involvement in the maintenance of plant cell wall integrity.** *Annals of Botany* 2014, **114**:1339-1347.
48. Goulao L, Cosgrove D, Oliveira C: **Cloning, characterisation and expression analyses of cDNA clones encoding cell wall-modifying enzymes isolated from ripe apples.** *Postharvest Biology and Technology* 2008, **48**:37-51.
49. Botondi R, DeSantis D, Bellincontro A, Vizovitis K, Mencarelli F: **Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low- and high-aroma varieties of apricots.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, **51**:1189-1200.
50. Phan TD, Bo W, West G, Lycett GW, Tucker GA: **Silencing of the Major Salt-Dependent Isoform of Pectinesterase in Tomato Alters Fruit Softening.** *Plant Physiology* 2007, **144**:1960-1967.

51. Willats WG, McCartney L, Mackie W, Knox JP: **Pectin: cell biology and prospects for functional analysis.** *Plant Molecular Biology* 2001, **47**:9-27.
52. Roy S, Conway WS, Watada AE, Sams CE, Pooley CD, Wergin WP: **Distribution of the anionic sites in the cell wall of apple fruit after calcium treatment.** *Protoplasma* 1994, **178**:156-167.
53. Ng JK, Schroder R, Sutherland PW, Hallett IC, Hall MI, Prakash R, Smith BG, Melton LD, Johnston JW: **Cell wall structures leading to cultivar differences in softening rates develop early during apple (*Malus x domestica*) fruit growth.** *BMC Plant Biology* 2013, **13**:183.
54. Gianfranceschi L, Soglio V: **The European project HiDRAS: innovative multidisciplinary approaches to breeding high quality disease resistant apples.** *Acta Horticulturae* 2004, **663**:327-330.
55. Pitts LJ, Cavalieri RP: **Objective assessment of apple maturity based on starch location.** *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers* 1988, **31**:962-966.
56. Galvez-Lopez D, Laurens F, Devaux M, Lahaye M: **Texture analysis in an apple progeny through instrumental, sensory and histological phenotyping.** *Euphytica* 2012, **185**:171-183.
57. Camps C, Guillermin P, Mauget JC, Bertrand D: **Data analysis of penetrometric force/displacement curves for the characterization of whole apple fruits.** *Journal of texture studies* 2005, **36**:387-401.
58. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.** *Nature Methods* 2012, **9**:671-675.
59. Ralet MC, Williams MA, Tanhatan-Nasser A, Ropartz D, Quemener B, Bonnin E: **Innovative enzymatic approach to resolve homogalacturonans based on their methylesterification pattern.** *Biomacromolecules* 2012, **13**:1615-1624.
60. Lahaye M, Falourd X, Quemener B, Ralet MC, Howad W, Dirlwanger E, Arus P: **Cell wall polysaccharide chemistry of peach genotypes with contrasted textures and other fruit traits.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, **60**:6594-6605.
61. Celton JM, Dheilley E, Guillou MC, Simonneau F, Juchaux M, Costes E, Laurens F, Renou JP: **Additional amphivasal bundles in pedicel pith exacerbate central fruit dominance and induce self-thinning of lateral fruitlets in apple.** *Plant Physiology* 2014, **164**:1930-1951.
62. Smyth GK: **Limma: linear models for microarray data.** In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Edited by Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W. Springer, New York; 2005:397-420.
63. Usadel B, Nagel A, Thimm O, Redestig H, Blaesing OE, Palacios-Rojas N, Selbig J, Hannemann J, Piques MC, Steinhauser D, Scheible WR, Gibon Y, Morcuende R, Weicht D, Meyer S, Stitt M: **Extension of the visualization tool MapMan to allow**

- statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses.** *Plant Physiology* 2005, **138**:1195-1204.
64. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
65. Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Omelchenko MV, Robertson CL, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Zheng C, Bryant SH: **CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.** *Nucleic Acids Research* 2011, **39**:D225-229.
66. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** *Molecular Biology and Evolution* 2011, **28**:2731-2739.
67. Francin-Allami M, Boudier A, Popineau Y: **Comparative study of wheat low-molecular-weight glutenin and alpha-gliadin trafficking in tobacco cells.** *Plant Cell Reports* 2011, **32**:89-101.
68. Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barrieu F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Leon C, Renaudin JP, Dédaldéchamp F, Romieu C, Delrot S, Hamdi S: **Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development.** *Planta* 2005, **222**:832 - 847.
69. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *Journal of Molecular Biology* 1990, **215**:403-410.

FIGURES AND TABLES

Figure 1 - Fruit firmness for individual hybrids evaluated by penetrometry

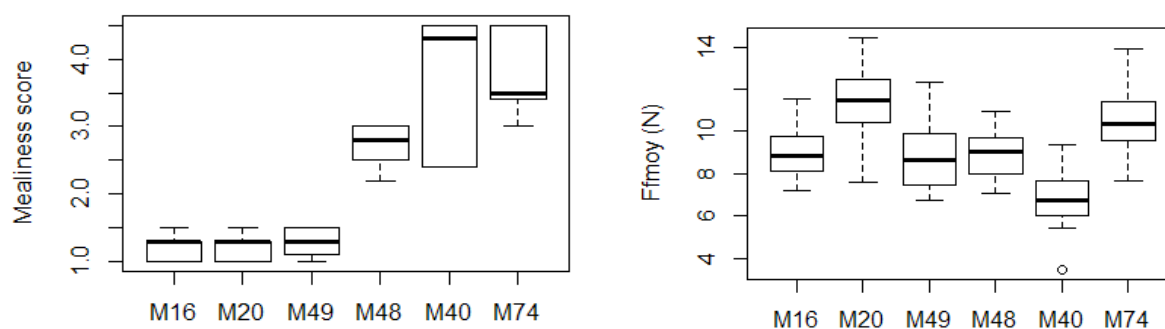
1.A Comparison between sensory and instrumental measurements at 120 DAH.

The hybrids are ordered in accordance with their sensory profiles (M16, M20, M49 as non-mealy and M48, M40 and M74 as mealy). Ffmoy, expressed in Newton, represents the mean force measured in the apple flesh (mean of forces measured at 7 and 9 mm of deformation). Boxplots present the median (the central mark), the region between the upper and lower quartiles (white area), the 95% confidence intervals around the median (the whiskers), the outliers are plotted individually.

1.B Lost of flesh firmness from harvest to 120 DAH

The dash lines are associated with mealy hybrids and the bold ones with non-mealy.

A.



B.

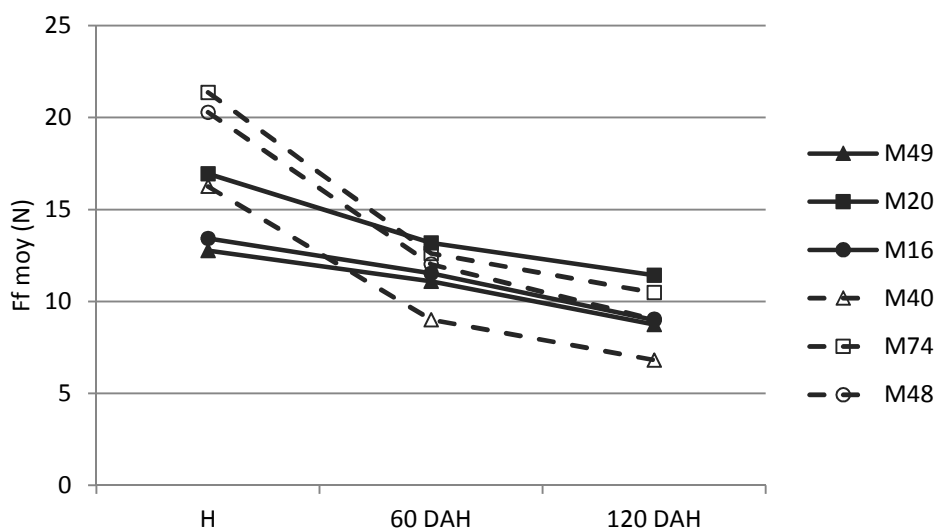


Figure 2 - Cryo-scanning electron micrographs of fractured apple parenchymes in 2012.

(A-C) at harvest; (B, D) at 120 DAH, after 4 months of cold storage at 1°C.

(A, B) M20, a non-mealy hybrid; (C, D) M40, a mealy hybrid.

Bar scale is at the bottom-left corner of each micrograph, score of mealiness is the number at the bottom-right corner.

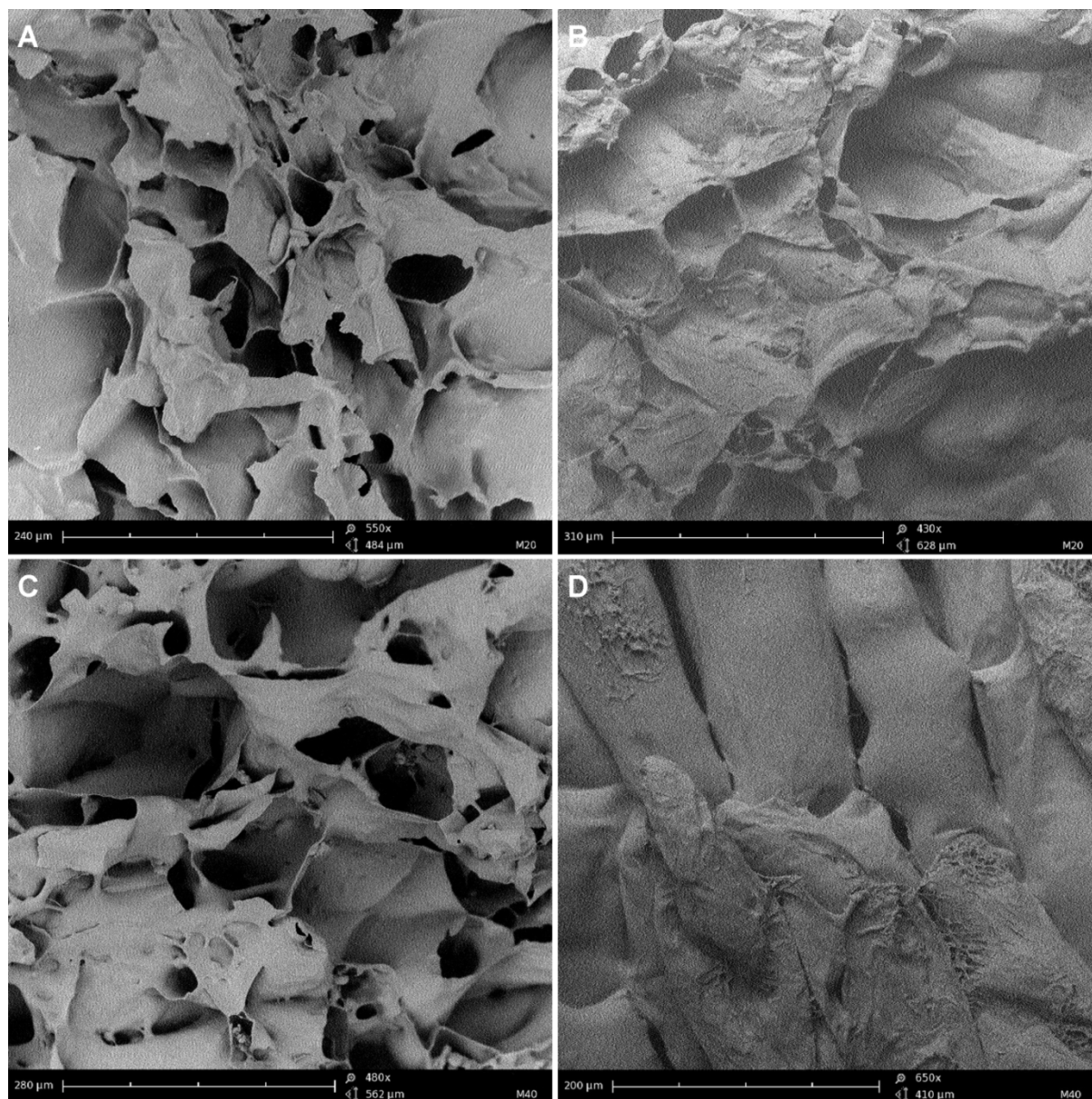
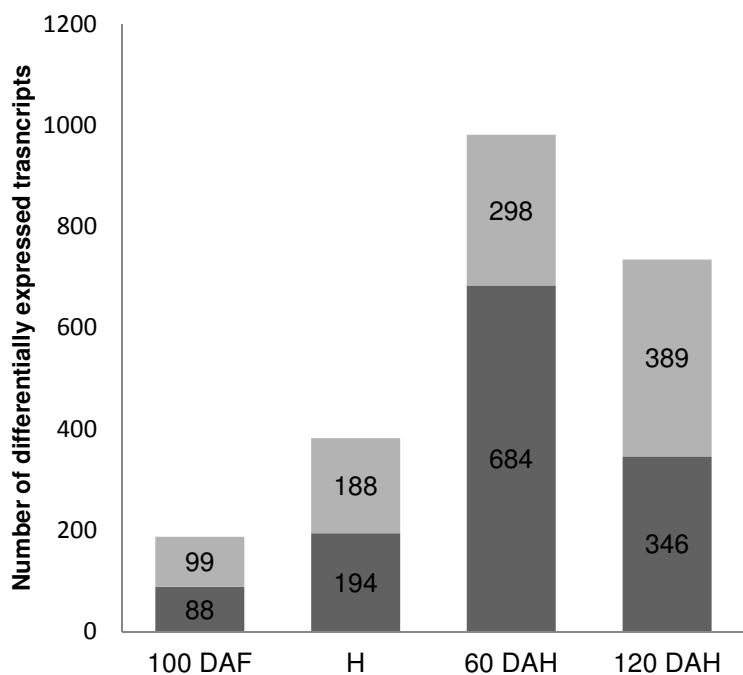


Figure 3 - Distribution of differentially expressed genes between mealy and non-mealy hybrids during kinetic of fruit maturation.

3.A Histogram illustrating the number of significant differentially expressed genes between mealy (M74, M40) and non-mealy (M20, 49) hybrids during the fruit kinetic. In dark gray, genes are up-regulated in non-mealy hybrids; in soft grey, they are up-regulated in mealy hybrids. The number of genes per groups is shown.

3.B Venn diagrams showing the overlap among kinetic time-point of all deregulated genes between mealy and non-mealy hybrids. The square points out the 53 genes deregulated during all kinetic.

A.



B.

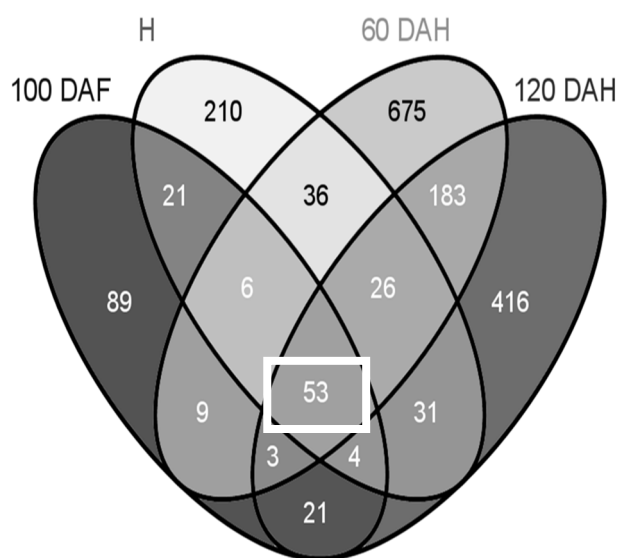


Figure 4 - Selection of differentially expressed genes involved in apple mealiness.

53 differentially expressed genes identified as displaying consistent profiles for the pairs M40/M49 (P1) and M74/M20 (P2) during all apple maturation are shown here. The pair M48/M16 (P3) was used to validate their expression patterns and to select few relevant genes (encircled by squares). Orientation indicates the orientation of the transcribed mRNA strand (S: sense; AS: antisense). The color scale (below) corresponds to log₂ ratios between mealy versus non-mealy parenchyma transcript expression values (Red refers to up-regulated genes in mealy, green in non-mealy hybrids). The short gene annotations are based of Arabidopsis gene homologies.

probe_id	Orientation	Pairs 1 & 2								Pair 3				Gene annotation
		100DAF		H		60DAH		120DAH		P3		P3		
		P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P3	P3	P3	P3	
MDP0000322658_r	S													UDP-glucuronosyl
MDP0000143945_r	S													UDP-glucuronosyl
MDP0000314355_r	S													GDH2 (GLUTAMATE DEHYDROGENASE 2)
MDP0000195089_r	S													QS (QUINOLINATE SYNTHASE)
MDP0000342785_r	S													
MDP0000430892_r	S													
MDP0000342782_r	S													
MDP0000342781_r	S													
MDP0000222620_r	S													ATPME2
MDP0000294082_r	S													En/Spm-like transposon protein
MDP0000279785_r	S													unknown protein
MDP0000814899_r	S													S-locus lectin protein kinase family protein
MDP0000214034	AS													protein kinase family protein
MDP0000729817_r	S													glycosyl hydrolase family 5 protein
MDP0000729817	AS													glycosyl hydrolase family 5 protein
MDP0000169942	AS													WAK5 (WALL ASSOCIATED KINASE 5)
MDP0000457057_r	S													hydrolase, alpha/beta fold family protein
MDP0000155586_r	S													short-chain dehydrogenase
MDP0000155476_r	S													short-chain dehydrogenase
MDP0000294540_r	S													GDSL-motif lipase
MDP0000662096_r	S													integral mb transporter family protein
MDP0000356610_r	S													
MDP0000135936_r	S													NBS-LRR disease resistance protein
MDP0000281697_r	S													unknown protein
MDP0000243873_r	S													ATBAG7
MDP0000634668_r	S													developmental regulator family protein
MDP0000500658_r	S													NTF2 family protein
MDP0000264548_r	S													disease resistance protein (NBS-LRR class)
MDP0000314358_r	S													disease resistance protein, putative
MDP0000676859_r	S													oxidoreductase/ transcriptional repressor
MDP0000204610	AS													WAK3 (WALL ASSOCIATED KINASE 3)
MDP0000200325_r	S													unknown protein
MDP0000166471_r	S													ATCSA-1; nucleotide binding
MDP0000161222_r	S													
MDP0000290186_r	S													disease resistance protein (NBS-LRR class)
MDP0000462276_r	S													

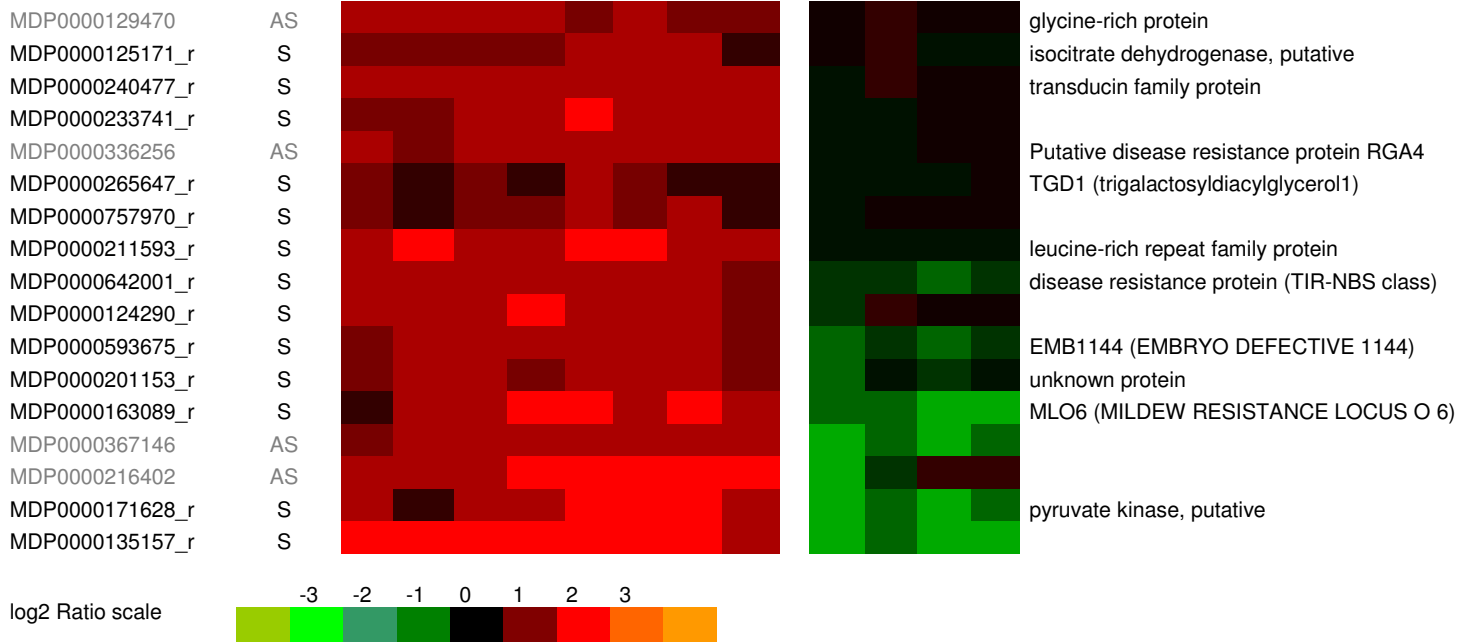


Figure 5 - Expression patterns of *MdPME2* for each individual hybrid as determined by microarray analysis at four developmental stages (100 DAF, H, 60 DAH and 120 DAH).

Hybrids displayed two different expression patterns: high and stable PME gene expression in non-mealy hybrids (bold lines) contrary to lowest and decreasing gene expression in mealy hybrids (dash lines). The transcript levels were normalized with the Lowess method. Normalized intensities (i.e. expression levels) were then subtracted from the background. Table refers to Kruskal-Wallis results between mealy and non-mealy hybrids at each time point.

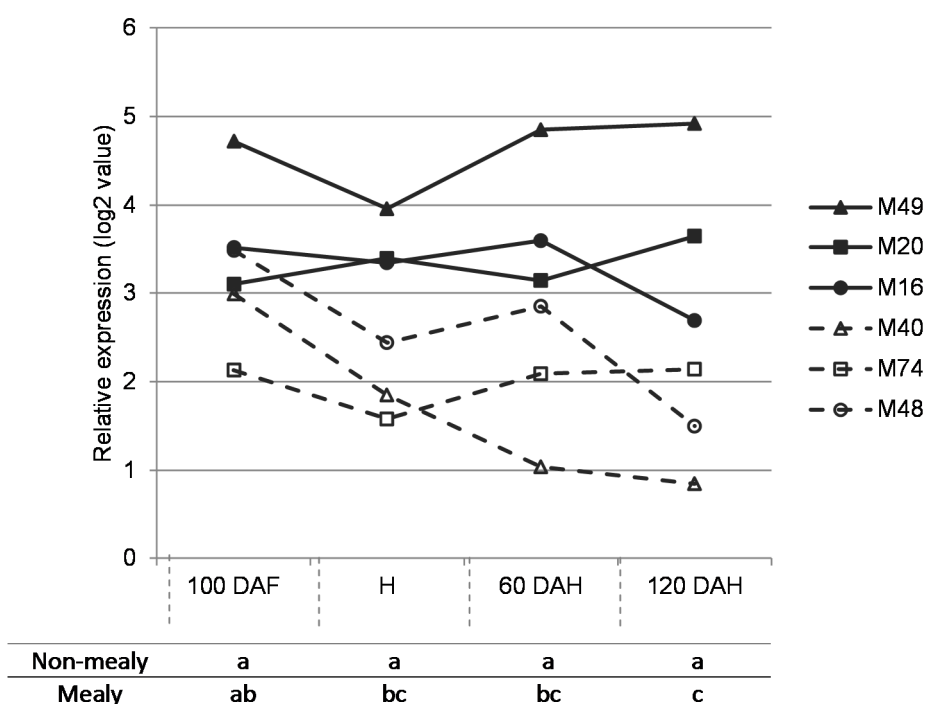


Figure 6 - *MdPME2* cloning and validation by semi-quantitative RT-PCR.

6.A Analysis of MDP0000222620 sequence annotated on *Malus x domestica* genome [22]. *At1g53830* is the *Arabidopsis thaliana* most similar sequence. MDP0000245813 is the complete sequence identified from the 3' RACE analysis. All 3 protein sequences are characterized by the presence of a PRO domain region (PF04043) followed by a putative processing motif [33, 69]. The PME domain (PF01095) of MDP0000222620 is incomplete.

6.B Confirmation of the cloned gene expression profiles with 2 PME specific primer sets by semi-quantitative RT-PCR for 30 cycles. M20 genomic DNA (DNAg) was used as positive control. Genes expression were studied for pair 2 (M20/M74) during complete fruit kinetic. MDP0000245813 could be amplified with clear difference between mealy (M) and non-mealy (N) genotypes, while there was no amplification with MDP0000222620, and GADPH expression remained at a relatively constant level.

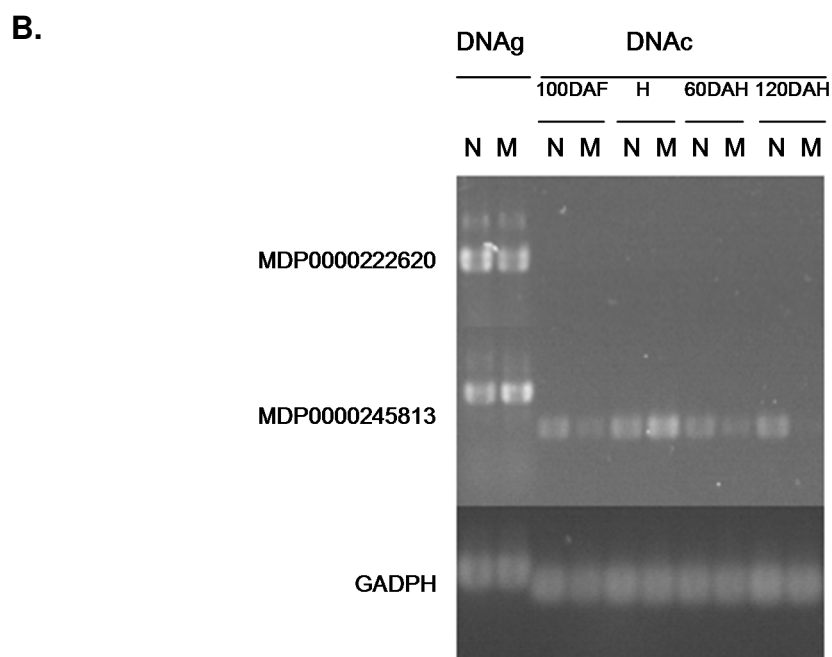
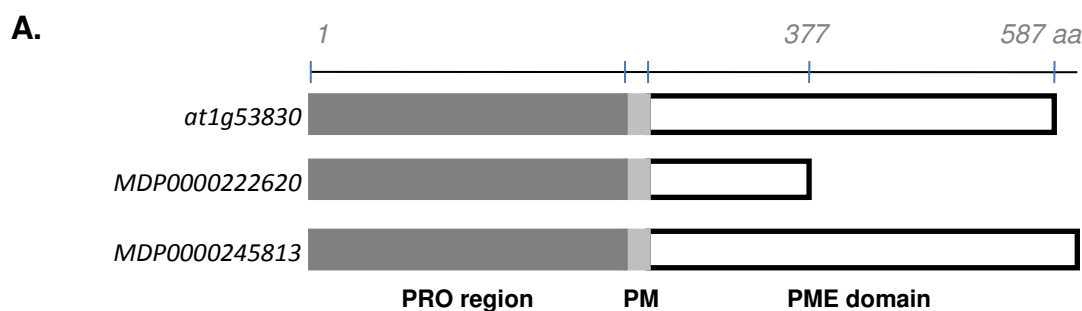


Figure 7 - Hierarchical cluster analysis of the 60 PME genes expressions in both 3 pairs of hybrids during complete fruit kinetic using Genesis software.

Each row represents one PME gene. P1, P2 and P3 correspond to pairs M40/M49, M74/M20 and M48/M16 respectively. The *MdPME2* gene only displayed an expression profile consistent with mealiness development.

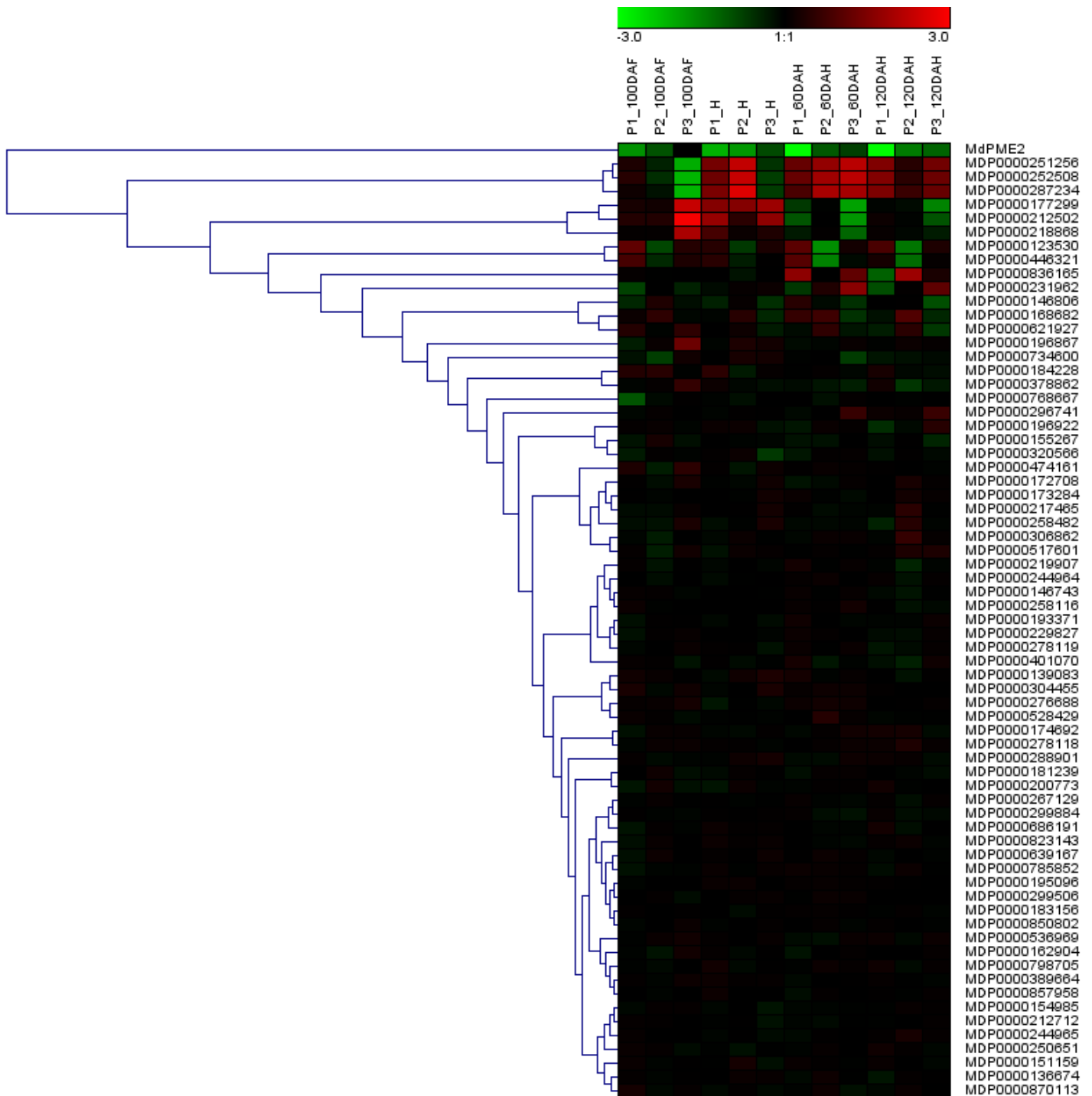


Figure 8 - Subcellular localisation of the *MdPME2*-RFP fusion protein transiently expressed in *Nicotiana tabacum* leaves.

The fluorescence of the 35S-*MdPME2*-mRFP expressed in *N. tabacum* cells construct was visualized using a confocal laser scanning microscope. The cell wall localization was monitored before and after cell plasmolysis confirming the fused protein exportation into the apoplasm. Scale bars = 20 μ m.

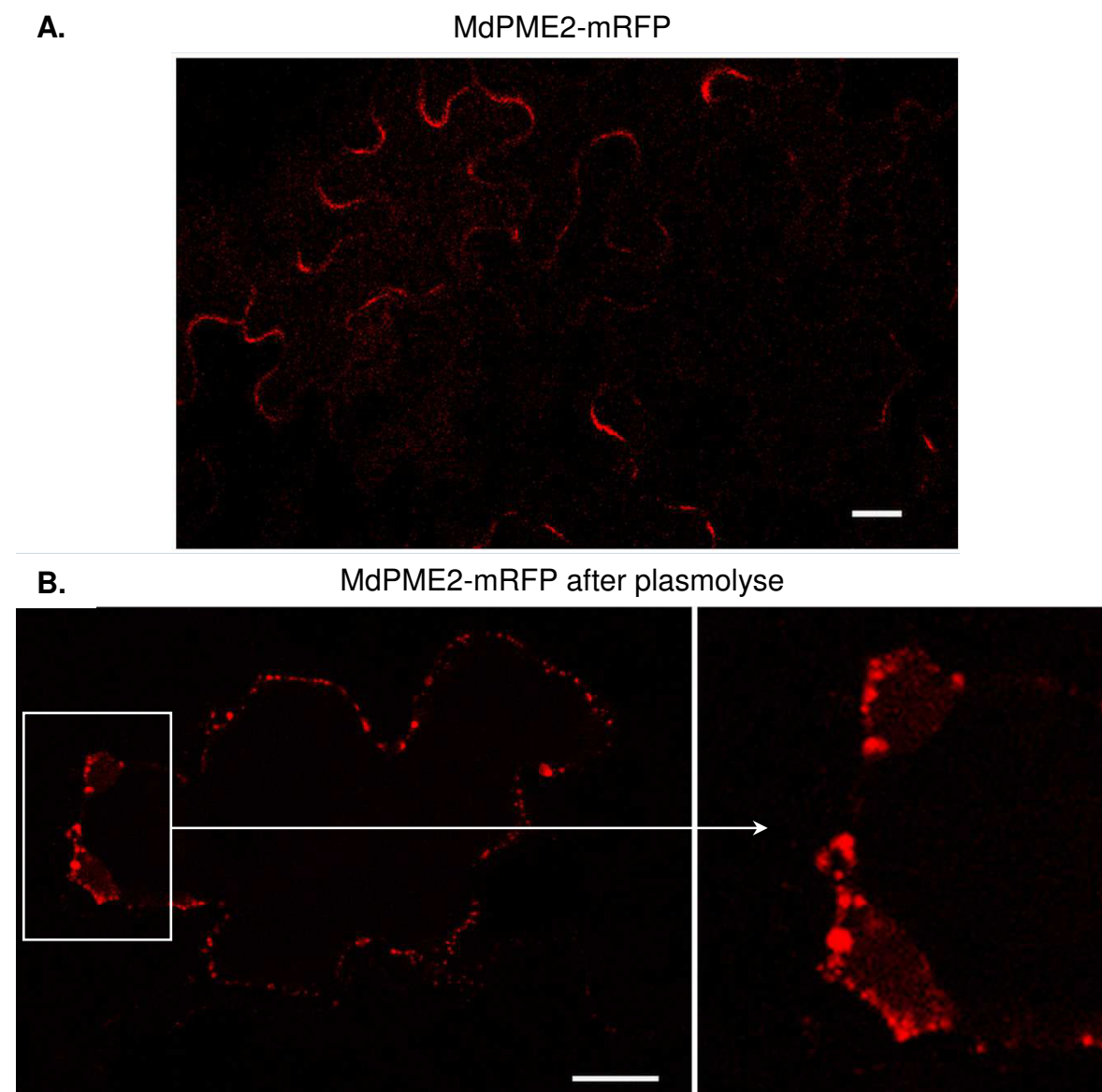


Table 1 - Sensory evaluation of mealiness for individual hybrids.

Scores range from 1 (no mealiness perception) to 5 (very high mealiness perception). Evaluations were carried out during four years (2007 and from 2009 to 2011) at three time points (H: harvest, 60 and 120 DAH: i.e. 2 and 4 months of storage in a cold chamber at 1°C). “Mean 120 DAH” is the mean of the four years for the last time point. Mealy hybrids are highlighted in grey.

	2007			2009			2010			2011			Mean
	H	60DAH	120DAH	H	60DAH	120DAH	H	60DAH	120DAH	H	60DAH	120DAH	
M16	1.0	1.0	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.3	1.2
M20	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.5	1.5	1.0	1.0	1.3	1.2
M49	1.0	1.0	1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.3	1.1	1.0	1.0	1.5	1.2
M40	2.0	1.5	4.3	1.5	2.8	4.0	1.2	2.0	2.4	1.0	3.5	4.5	3.8
M48	1.0	2.0	2.8	1.0	2.5	2.5	1.0	1.3	2.2	1.0	2.3	3.0	2.6
M74	1.0	1.0	3.5	1.5	2.0	3.0	1.3	3.0	3.4	1.0	4.0	4.5	3.6

Additional files

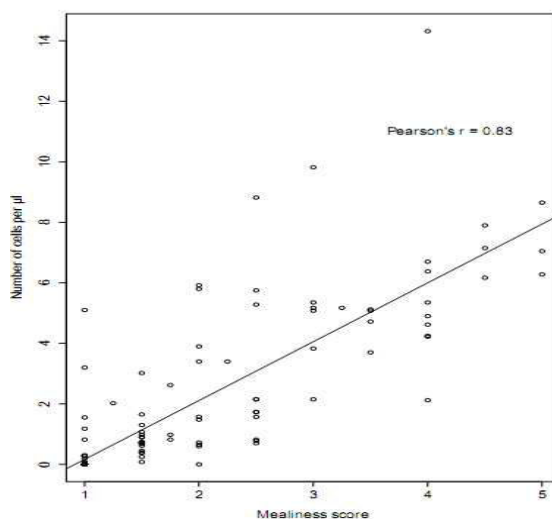
Additional file 1. Results of cell cohesion test.

S1.A Mealiness score and results of the cell cohesion test (number of cell per μl). 158 apples of 10 different genotypes were used to develop this new test in 2012.

Format: XLS

S1.B Dispersion graph of the correlation between mealiness and cell cohesion test results.

The y-axis represents the cell cohesion test results expressed as the number of isolated cells counted by μl . The x-axis represents sensory mealiness. Pearson's correlation coefficient was calculated.



Additional file 2. Differentially expressed genes of pairs 1 and 2 which displayed similar expression patterns at one or more fruit development stages. Pairs are M49/M40 and M74/M20. Time points are 100DAF (100 days after flowering), H (harvest), 60 and 120 DAH (respectively 2 and 4 months of cold storage). The significance level was set at P-value < 0.01.

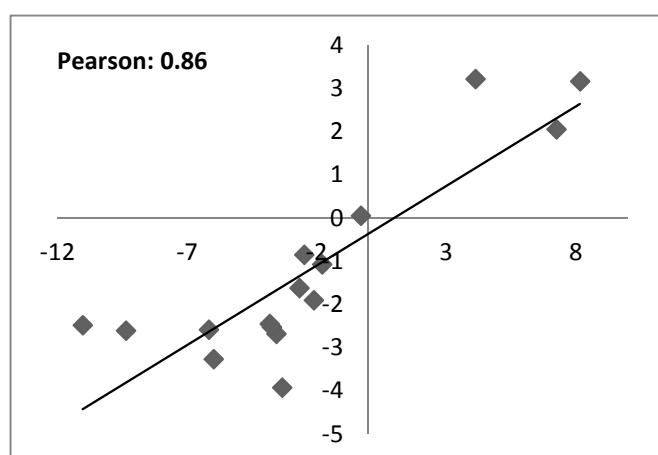
Format: XLS

Additional file 3. Validation of microarrays results by quantitative real-time PCR (RT-qPCR).

S2.A: Validation of microarrays results by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) for selected genes for 2 pairs of genotypes at two time points. Reported ratios were calculated on the basis of normalized data for microarray analyses (log₂ ratio) and as normalized expression for RT-qPCR (Ct ratio). H: harvest, DAH: days after harvest.

stage	Couple	MDP number	Gene annotation	RT-qPCR (Ct Ratio)	Microarray (log ₂ ratio)
H	M74 / M20	MDP0000222620	AtPME2	-2.12	-1.9
H	M74 / M20	MDP0000322658	UDP-glucuronosyl	-6.17	-2.58
H	M74 / M20	MDP0000393227	FQR1	-3.82	-2.45
H	M74 / M20	MDP0000671440	GDH1	-1.8	-1.07
H	M74 / M20	MDP0000303194	CRK10	8.16	3.17
60 DAH	M74 / M20	MDP0000222620	AtPME2	-2.67	-1.62
60 DAH	M74 / M20	MDP0000393227	FQR1	-0.3	0.06
60 DAH	M74 / M20	MDP0000671440	GDH1	-2.49	-0.85
60 DAH	M74 / M20	MDP0000303194	CRK10	7.24	2.06
60 DAH	M74 / M20	MDP0000322658	UDP-glucuronosyl	-11.03	-2.48
H	M40 / M49	MDP0000322658	UDP-glucuronosyl	-9.37	-2.6
H	M40 / M49	MDP0000393227	FQR1	-3.56	-2.68
H	M40 / M49	MDP0000303194	CRK10	4.12	3.22
60 DAH	M40 / M49	MDP0000222620	AtPME2	-3.34	-3.92
60 DAH	M40 / M49	MDP0000393227	FQR1	-3.73	-2.52
60 DAH	M40 / M49	MDP0000322658	UDP-glucuronosyl	-5.99	-3.26

S2.B: Correlation between qRT-PCR ratios and microarray log₂ ratios is shown for the same genes, along with Pearson correlation coefficient.



Additional file 4. Ethylene measurements during storage.

Materials and Methods:

The fruits were sampled in 2010 and 2011 for ethylene quantification during storage. Ten fruits were transferred to a hermetically closed container and ethylene contents were analysed using an Ethylene Atmosphere Sampling Instrument (EASI-1, Absoger France).

To identify any statistical differences between mealy and non-mealy apples, student tests were performed at each time point.

Results:

Ethylene accumulation in fruits from individual hybrids. The values represent the mean of 10 measurements. Results of student test at each time point between mealy and non-mealy are mentioned below.

Phenotype	Hybrid	2010		2011	
		H	60DAH	60DAH	120DAH
NM	M16	0,17	33,92	5,11	44,10
NM	M20	0,88	2,61	-0,64	-1,79
NM	M49	0,65	5,49	0,87	29,71
M	M40	1,94	5,25	0,77	6,81
M	M48	1,41	59,87	27,26	61,12
M	M74	6,89	103,82	31,16	36,14
Results of student test:		0,24	0,38	0,25	0,75

Additional file 5. Sequence alignments.

Format: PDF

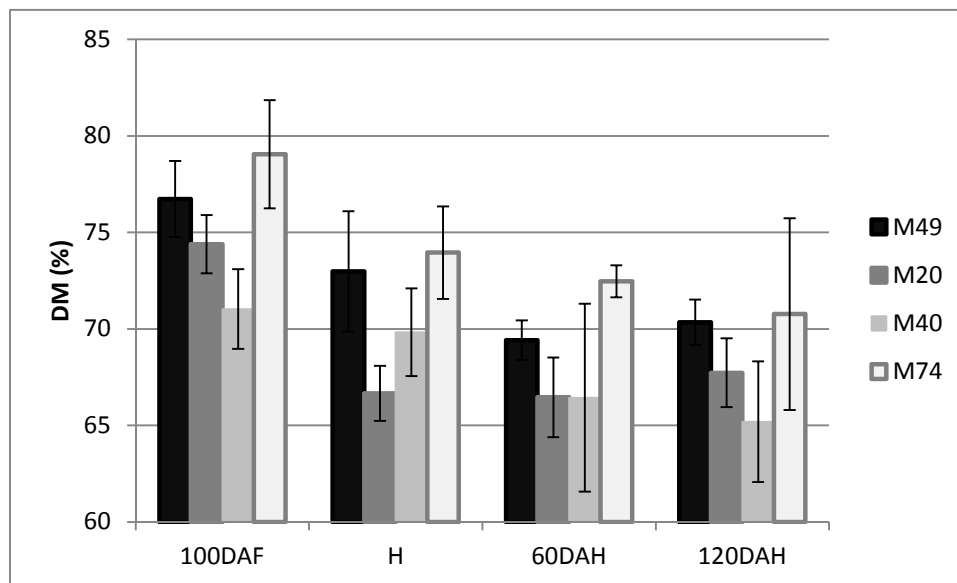
Additional file 6. Evolutionary relationships between 60 apple PME.

The tree is based on the alignment of protein sequences using MUSCLE and it is constructed using the neighbor-joining method and a bootstrap test with 1000 iterations using MEGA5 software. Black lines grouped PME genes of type I, including *MdPME2*, and gray are of type II according to *Arabidopsis thaliana* PME groups [33].



Additional file 7. Degree of methylesterification (DM) of apple cell walls (2009, 2010) for mealy (M40, M74) and non-mealy hybrids (M20, M49) during the kinetic.

Values are the means of 3 technical replicates for both years. Error bars represent the standard deviation.



Additional file 8. Pectin enzymatic profiling results.

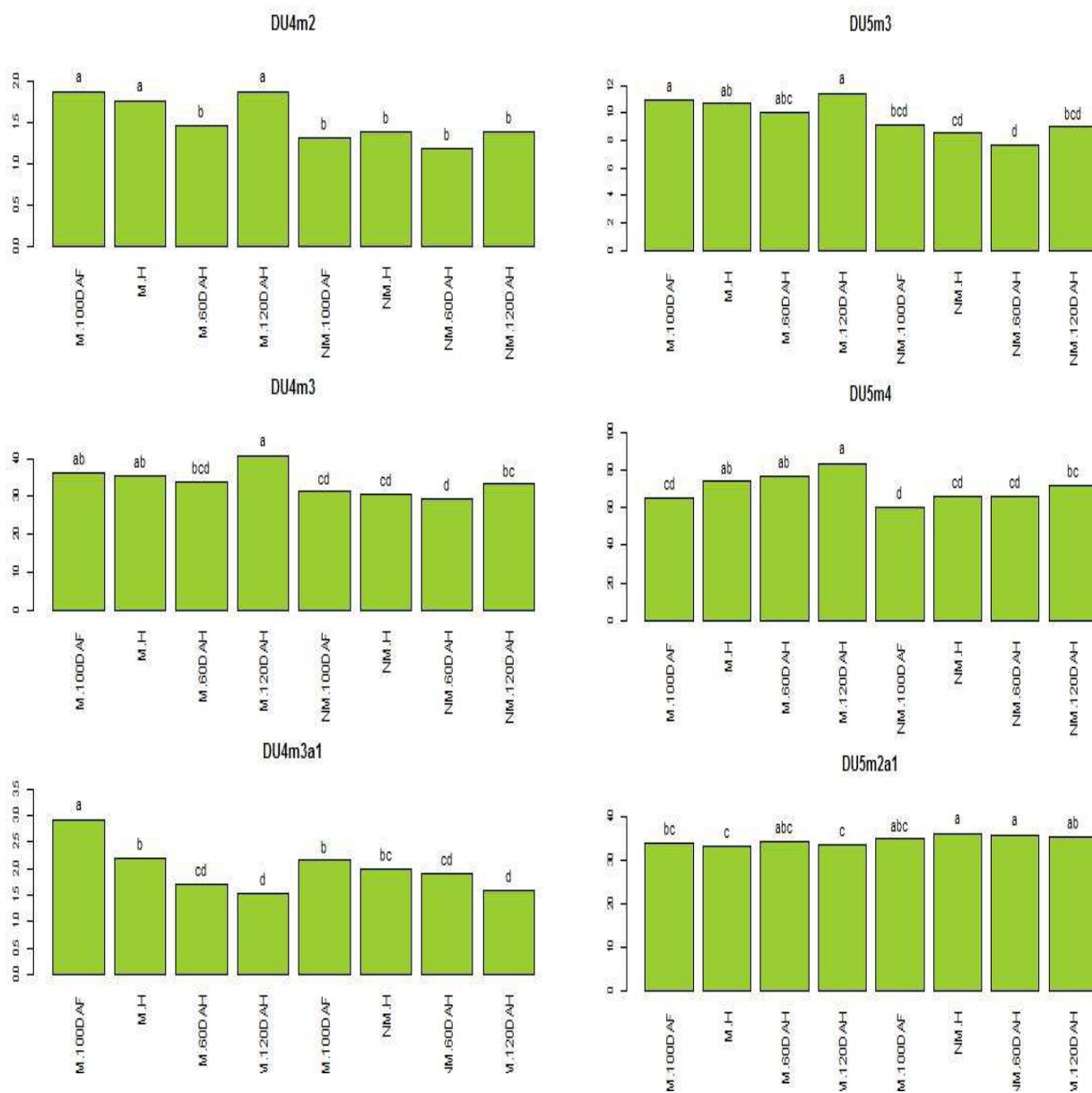
S8.A Sum up of significant differences between mealy and non-mealy fruits for each oligouronide during the complete apple fruit cycle according to Kruskal-Wallis tests.

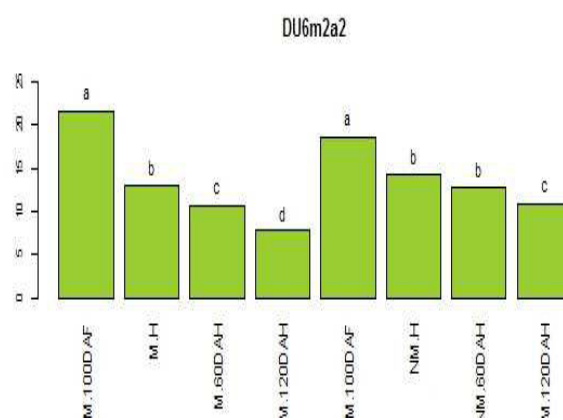
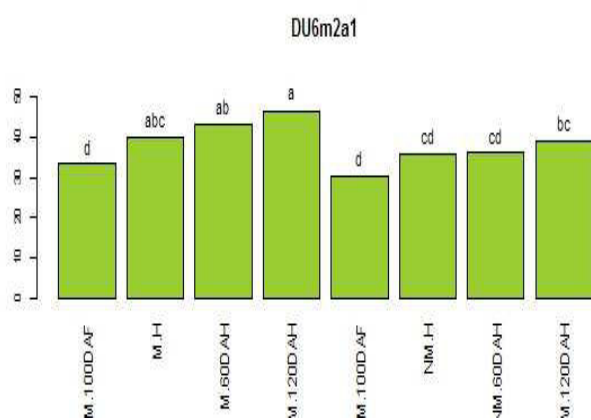
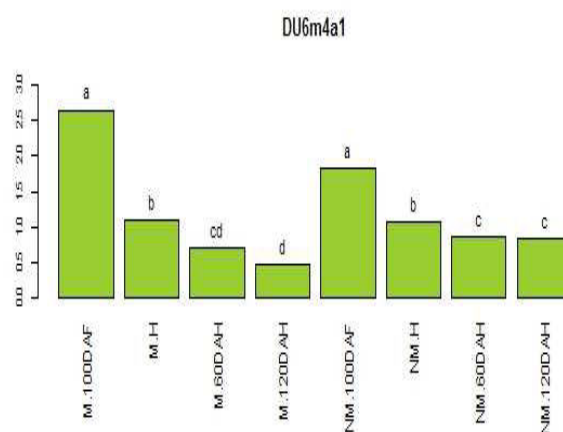
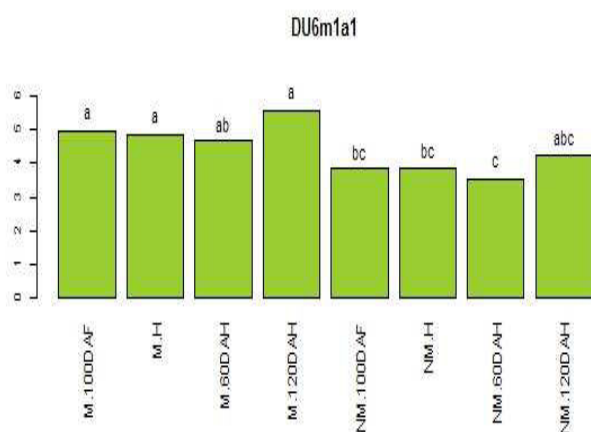
The oligouronides were identified from MALDI-TOF MS spectra after pectin-lyase hydrolysis of cell wall preparations. Oligouronides nomenclature is described in the materials and methods. Colors refer to significant differences (P-value < 0.05) between mealy and non-mealy hybrids: dark grey is for a higher abundance in mealy fruits, light grey: a higher abundance in non-mealy fruits.

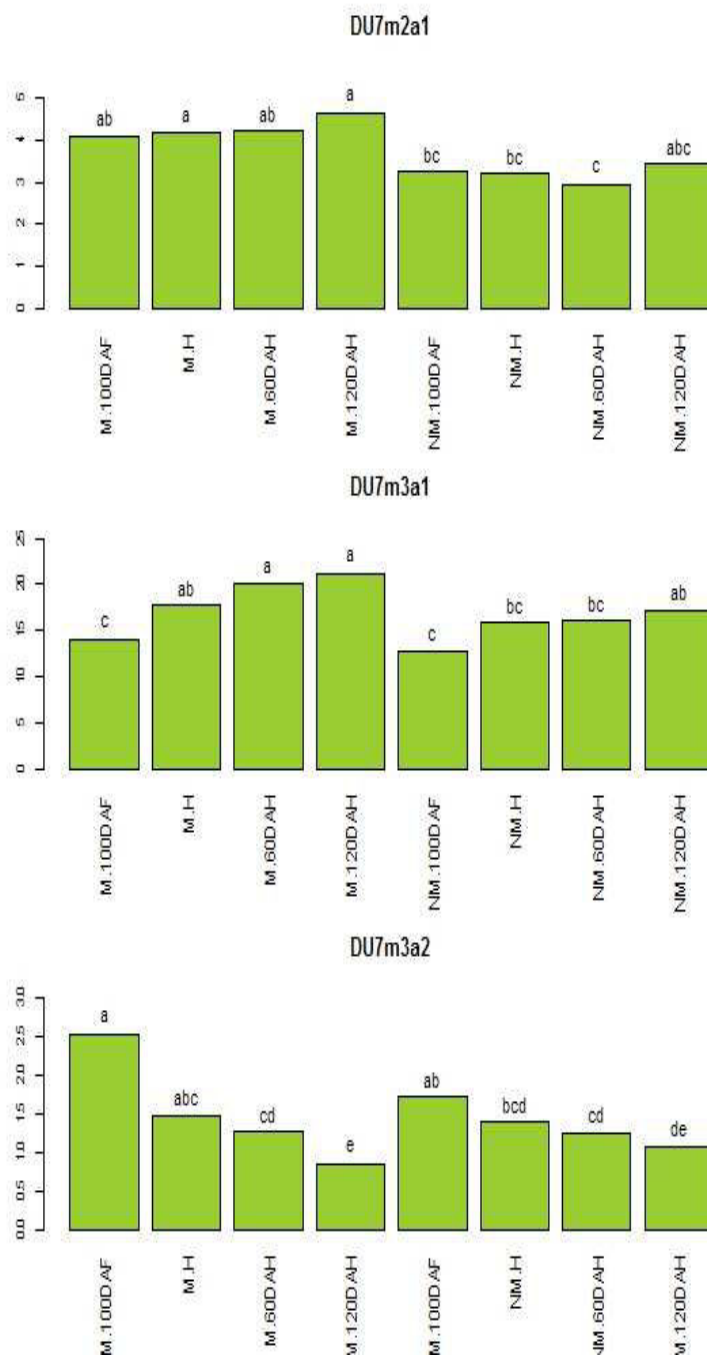
S8.B Bar charts of abundance of each oligouronides for mealy (M40, M74) and non-mealy (M49, M74) hybrids at the four fruit developmental stages obtained from MALDI-TOF MS spectra after pectin-lyase hydrolysis of cell wall preparations. Oligouronides nomenclature is described in the materials and methods. Letters on bar charts indicate groups of significantly different abundance (Kruskal-Wallis test). M: mealy; NM: non-mealy.

oligouronides	100 DAF	H	60 DAH	120 DAH
DU4m2	Dark Grey			Dark Grey
DU4m3	Dark Grey		Dark Grey	Dark Grey
DU5m3	Dark Grey		Dark Grey	Dark Grey
DU5m4		Dark Grey	Dark Grey	Dark Grey
DU4m3a1	Dark Grey			
DU6m1a1	Dark Grey	Dark Grey	Dark Grey	
DU6m2a1			Dark Grey	Dark Grey
DU7m2a1		Dark Grey	Dark Grey	
DU7m3a1			Dark Grey	
DU6m3a1		Light Grey		
DU5m2a1		Light Grey		Light Grey
DU5m4a1			Light Grey	Light Grey
DU6m2a2			Light Grey	
DU6m4a1				Light Grey
DU7m3a2				

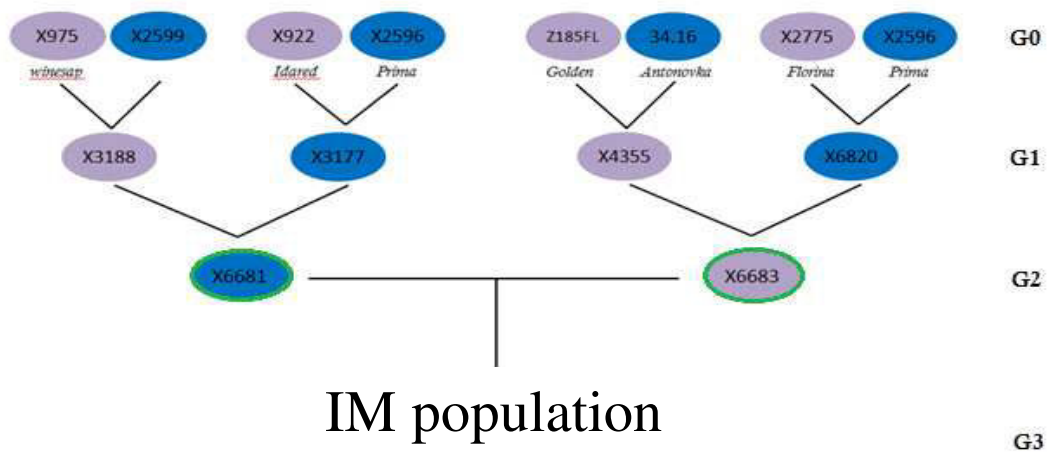
S8.B







Additional file 9. IM population within HIDRAS pedigree [24].



Additional file 10. List of primers used for RT-qPCR and cloning.

S10.A Primers used for the RT-qPCR. For each selected gene, the expression pattern obtained by microarray analysis is specified (up or down in mealy fruits compared to non-mealy). Three housekeeping genes (HK) were used to calculate the normalisation factor.

Application	Expression profil	MDP number	Gene annotation	Size	Sequence (5' → 3')
RT-qPCR	Down	MDP0000222620	AtPME2	104	F: TTGAAAGTTGTGCTGCCATC R: GACGTGCCGAAGAAAAAGAC
RT-qPCR	Down	MDP0000322658	UDP-glucuronosyl	100	F: TTGAATCAGCTTGTGCGAGTTGT R: GGAATCATAAGCTTCCCAGATTT
RT-qPCR	Down	MDP0000393227	FQR1	184	F: GCATAAGTTCCCGCACCATA R: CCGCTGGAATTTTCTACAGC
RT-qPCR	Down	MDP0000671440	GDH1	102	F: GCAAACGCTTGAGATCTTCG R: AGCACAGCTGATGACATGGA
RT-qPCR	Up	MDP0000303194	CRK10	150	F: TGTTGATCTTCCAGTACCCTCA R: CCATGCAGCAGATATTTGACA
RT-qPCR	HK	MDP0000271281	porin, putative	155	F: CGCCCAAATTATTGAAGCA R: ATCCCAGCCATTGATTTTT
RT-qPCR	HK	MDP0000217860	drought-responsive family protein	193	F: ACGCAAGAGGAAGACAAGGA R: GGGTGGCATGCTAACAAAT
RT-qPCR / sqPCR	HK	MDP0000645828	GADPH	165	F: ATCAATGAAGGACTGGAGAGG R: GTCAGGTCAACAACGGAAAC

S10.B Primers used for *MdPME2* cloning.

Application	MDP number	Gene annotation	Sequence (5' → 3')
sq PCR	MDP0000222620	AtPME2	F: TCACGATGCTGTGGAGGAC R: TGAAAGTTGTGCTGCCATCG
sq PCR	MDP0000245813		F: CCACGAGGCTGTGCGAGGAT R: TGAAAGTTGTGCTGCCATCG
3' RACE	MdPME2	PME	F6: CGATGGCAGCACAACCTTTCA
PCR1	MdPME2	PME	F5: AGAATGGCCAAAATCAAAGAGT
nested PCR	MdPME2	PME	F1: CACCAGAATGGCCAAAATCAAAGAG
	MdPME2	PME	R: CAGCGCAAGAGAAAATGGAA

CHAPITRE III

**Les jasmonates contrôlent la
farinosité en modulant les voies du
stress oxydatif et de l'éthylène**

CONTEXTE

La plupart des études réalisées sur la farinosité portent sur un nombre réduit de variétés. Au cours du chapitre précédent, nous avons réalisé une première étude portant sur six hybrides issus d'une même population, ségrégant pour la farinosité. Cette étude nous a permis d'identifier un déterminant précoce de la farinosité dans ce fond génétique. L'étape suivante consiste en une étude des bases moléculaires de la farinosité au sein d'un sous-ensemble de la core-collection constituée sur le site INRA d'Angers. Cette core-collection a été établie à partir d'une des plus grandes collections de *Malus x domestica*. Elle représente la référence nationale de la variabilité française au sein d'un complexe plus large de six core-collections européennes (Lassois *et al*, soumis). L'objectif de cette étude réalisée sur la core-collection est d'identifier les déterminants moléculaires de la farinosité de la pomme qui pourraient être indépendants du fond génétique.

Ainsi, 95 variétés ont été récoltées et décrites, à la récolte et à deux mois de conservation. La caractérisation à la récolte a été réalisée dans le cadre du programme de ressources génétiques ce qui implique qu'une description exhaustive de la morphologie des variétés a été réalisée. Une analyse sensorielle a également été réalisée à la récolte. Après deux mois de conservation au froid, les 95 variétés ont été décrites pour leur farinosité par mesures sensorielle et instrumentale (application du test de cohésion cellulaire développé dans le chapitre précédent). Aucun marqueur phénotypique précoce n'a pu être associé à la farinosité développée au cours du stockage, soulignant l'importance de mieux comprendre le phénotype au niveau moléculaire.

Une analyse transcriptomique a été réalisée sur un sous-ensemble de 40 variétés. A partir d'une approche statistique multivariée, nous avons pu identifier les 34 variétés les plus discriminantes pour la farinosité et ainsi valider trois groupes de phénotypes (les non farineux, les intermédiaires et les farineux). Ces trois groupes ont été utilisés pour identifier les gènes dérégulés entre les différents phénotypes. Cette approche a permis de mettre en évidence une implication de la voie du jasmonate dans la régulation de la farinosité. Le jasmonate a déjà été identifié comme ayant un rôle potentiel dans l'induction du système 2 de l'éthylène chez les fruits climactériques, mais le rôle majeur revient ensuite à l'éthylène considéré comme l'hormone de maturation des fruits climactériques. Dans cette étude, nous proposons un nouveau modèle de la régulation de la farinosité modulée par les jasmonates.

Jasmonate controls apple mealiness during maturation through fine-tuning of ethylene and oxidative stress pathways

Sandrine Mikol Segonne¹, Sandra Pelletier², Arnaud Guyader², François Laurens² and Jean-Pierre Renou^{1,2,3}

¹ AgroCampus-Ouest, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045 Angers, France.

² INRA, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49071 Beaucouzé, France.

³ Université d'Angers, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045 Angers, France.

1 INTRODUCTION

Apple mealiness is a complex phenotype associated to soft, dry and grainy fruits. It is an important texture storage defect causing major economic loss to the profession every year. Despite its significance, this phenotype is still rather poorly characterized at the molecular level.

Mealiness is generally reported to result from cell wall modifications leading to the disassembly of the middle lamella and the primary cell wall (Harker and Hallett, 1992). These events implicate numerous cell wall-related enzymes such as polygalacturonases, expansins or pectin-methylesterases. For instance, *MdPG1*, coding for a polygalacturonase is one of the most studied cell wall-related genes associated with apple softening. Its expression has been associated with softening in various cultivars (Atkinson *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2010) and *PG1*-suppressed apples resulted in firmer fruits (Atkinson *et al.*, 2012). However, it has been described as a late ripening gene (Ireland *et al.*, 2014) which reduces its relevance as a molecular determinant of fruit softening. In addition, unsuccessful attempts to maintain fruit firmness by suppressing the expression of other cell wall-related genes in different species do not support such a simple model (Brummell and Harpster, 2001).

Many of the cell wall-related genes have been shown to be regulated by ethylene, described as the ripening hormone, suppression of which reduces ripening in many fruits (Seymour *et al.*, 2013). A crosstalk between ethylene (ET) and jasmonates (JA) pathways has been reported in fruits. Jasmonate and its derivatives are oxylipin phytohormones that are known to be involved in the regulation of many physiological processes in plants, ranging from growth and development to reproduction and defense. The synthetic pathway and signal transduction of jasmonates have been fully investigated these last few years (Wasternack and Hause, 2013). Besides remarkable improvement of JAs knowledge, their implication in fruit ripening has been clearly established but the associated molecular events are still largely unclear. Applying exogenous MeJA on apples during the pre-climacteric stage resulted in an increased ethylene production (Saniewski *et al.*, 1988), while application at the climacteric stage resulted in a reduction of ethylene production (Miszczak *et al.*, 1995). Similar results were obtained on pear fruits after exogenous application of propyl dihydrojasmonate (PDJ), a synthetic analogue of jasmonic acid (Kondo *et al.*, 2007). In peach, JA application delayed ripening by down-regulating genes coding for ethylene biosynthesis and cell wall remodelling (Ziosi *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2012). By contrast, in non-climacteric fruits, exogenous application of MeJA on unripe *Fragaria chiloensis* fruits accelerated fruit softening by inducing anthocyanin accumulation, cell wall modification and ethylene and JAs biosynthesis (Concha *et al.*, 2013). Therefore, JA exogenous applications can inhibit or enhance fruit ethylene synthesis depending on the species and the fruit ripening stage.

In this study, a genome-wide analysis based on the AryANE-v1 microarray (Celton, Gaillard *et al.*, 2014) was performed on 40 cultivars from the French *Malus x domestica* core collection. Mealiness characterization was investigated after two months of storage by using sensory analyses and the cohesion cell test recently published (Mikol-Segonne *et al.*, 2014). The aim of this study was to identify cultivar-independent molecular determinants of apple mealiness. By combining multivariate and univariate approaches, less than 650 genes were identified as related to mealiness. Amongst these genes, this study shows that the JA pathway appears as a potential key regulator of molecular mechanisms associated with apple mealiness development, upstream of cell wall-related genes.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material and phenotypic analyses

A subset of 95 cultivars (Table 1) was selected in the *Malus* germplasm collection of INRA Angers in order to reflect the maximum of genetic diversity of the French *Malus* collection (Lassois *et al.*, soumis). Fruits were harvested from one tree per cultivar in 2013 at the optimum maturity stage based on taste, ground color and a starch index of 6-7 according to Pitts and Cavalieri (1988). Fruits were stored for 2 months at 1°C under normal atmospheric conditions. They were warmed overnight at room temperature prior analysis. For each cultivar, six fruits were selected for their homogeneity of size, color and mealiness (informal tasting). They were divided into two lots of three fruits subsequently used as biological replicates. Each lot was assessed for quantitative mealiness following the cell cohesion test as described by Mikol-Segonne *et al.* (2014). Parenchyma tissues of each lot were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C prior lyophilization and RNA extraction. Morphological descriptions were performed at harvest. Harvest traits are described in Additional file S1.

2.2 Microarray analysis

2.2.1 RNA extraction, RNA labeling and microarray hybridization

Based on mealiness results, 40 cultivars were selected for transcriptome analysis (Table 1). RNA extraction was carried out using 180 mg of lyophilized fruit flesh powder as described by Rienth *et al.* (2014). All RNA samples were quantified using the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies) and checked for integrity on a 1% agarose gel.

mRNAs were amplified, labeled and co-hybridized according to Celton, Gaillard *et al.* (2014) as follows: aRNAs were produced with Message AmpII aRNA amplification kit (Ambion) from 200 ng of total RNA. Then, 5 µg of each aRNA were retro-transcribed and labeled with either Cyanine-3 or Cyanine-5 fluorescent dye (Interchim, Montluçon, France). Labeled samples were combined as 30 pmol for each dye and concentrated by precipitation. Hybridization to the 4-plex Agilent microarray AryANE v1.0 was performed using the Gene Expression Hybridization kit (Agilent) following manufacturer's instructions. Hybridization was carried out overnight at 65°C. The slides were washed in two successive wash buffers

and dried before scanning. The Agilent AryANE v1.0 arrays were finally scanned with the MS200 microarray scanner (Roche Nimblegen). The Agilent AryANE v1.0 is identical to the NimbleGen AryANE array described by Celton, Gaillard *et al.* (2014) *ie* 126,022 gene-specific probes from apple. Gene annotations were mainly based on *Arabidopsis thaliana* similarities.

2.2.2 Data normalization

Grid alignments of .tiff files issued from the scanning were performed using the Agilent Feature Extraction software. Extracted text files were analyzed in R environment. Data were normalized with the Lowess method using the R package LIMMA (Smyth, 2005) from the Bioconductor project. Then, quantile normalization was carried out using the `normalize.quantiles` function available in the `preprocessCore` package from Bioconductor.

2.3 Statistical analyses

Statistical analyses were carried out in R environment. Sparse Partial Least Square-Discriminant Analysis (sPLS-DA) was performed using the `mixOmics` package. PLS-DA is an exploratory approach looking for the optimal linear combinations of variables (genes) which best separate the sample groups (phenotypic classes). The sparse version developed by Lê Cao *et al.* (2011) used the LASSO-type penalization in order to identify relevant combinations of variables that best discriminate the sample groups. Kruskal-Wallis (P-value < 0.01) analyses were performed using the `agricolae` package.

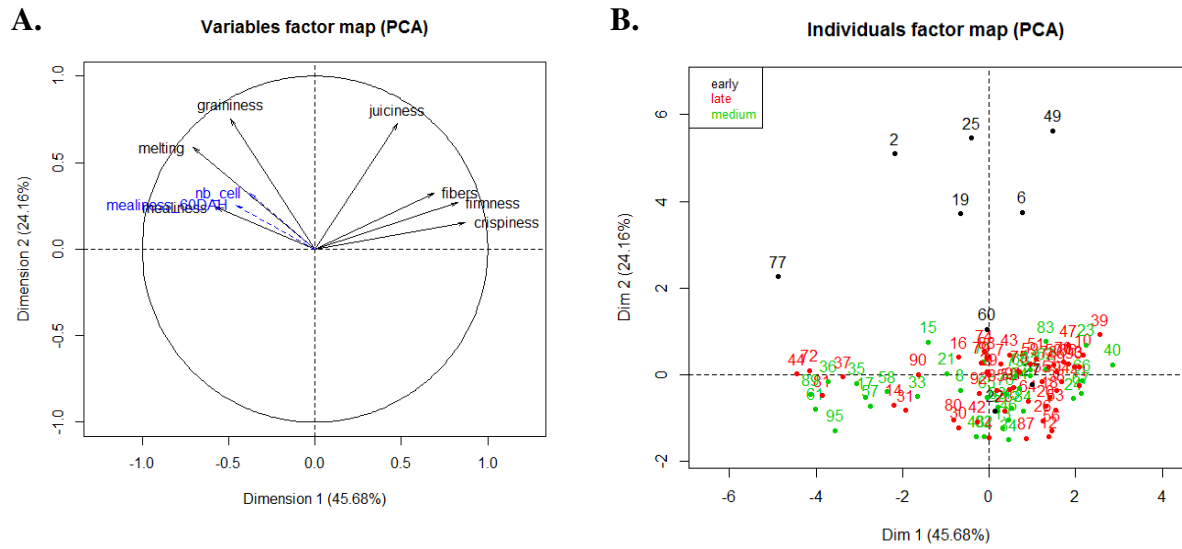


Figure 1 - PCA of sensory data at harvest on the 95 cultivars. A. Variable Map. B. Individual map (cultivars are grouped according to their harvest date. "Early" refers to a harvest in August, "medium" from September to mid-October and "late" from mid-October to November).

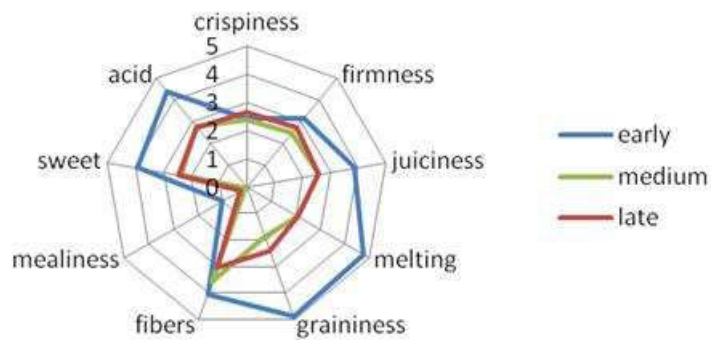


Figure 2 - Sensory profiles of the 95 cultivars at harvest sorted out following their harvest date. "Early" refers to a harvest in August, "medium" from September to mid-October and "late" from mid-October to November.

3 RESULTS

3.1 Phenotypic description of the core collection

3.1.1 Description at harvest stage

Ninety cultivars from the French core collection were described at harvest for various morphological and sensory traits. Variations in phenotypic data were assessed by principal component analyses (PCA) and Spearman correlation coefficients (Additional file S2).

PCA carried out on sensory analyses showed positive correlation between crispiness, firmness and fiber content on the first principal component (PC) which displayed 45.7% of the variability (Figure 1A). These sensory traits appeared negatively correlated with melting, mealiness and graininess. PC2 represented 24.2% of the variability and was correlated with juiciness and graininess. A major group of individuals was correlated only with PC1 which reflected they had firm and crispy textures. A group of six individuals differed from others on PC2; they were more juicy and melting. It appeared that these sensory differences were strongly linked to the harvest date (Figure 1B).

Sensory profiles of the 95 cultivars sorted out following their harvest date confirmed the specific texture of “early” cultivars at harvest (Figure 2). “Early” cultivars, which were harvested in August, displayed juicy and fibrous textures but they were especially characterized by highly grainy and soft texture. We may also notice that this group did not develop mealiness at harvest. However, the “early” class was under-represented with only nine cultivars while the “medium” and “late” classes included respectively 36 and 50 cultivars.

We did not identify any correlation between morphological traits and sensory analyses at harvest (see Spearman correlation in Additional file S2). For this reason, PCA on morphological variables was performed independently (Figure 3). Morphological variables were defined to get a complete fruit description without redundancy between variables. For this reason, several principal components (PC) were necessary to explain the high rate of variability: five PCs were necessary to explain 60% of the variability.

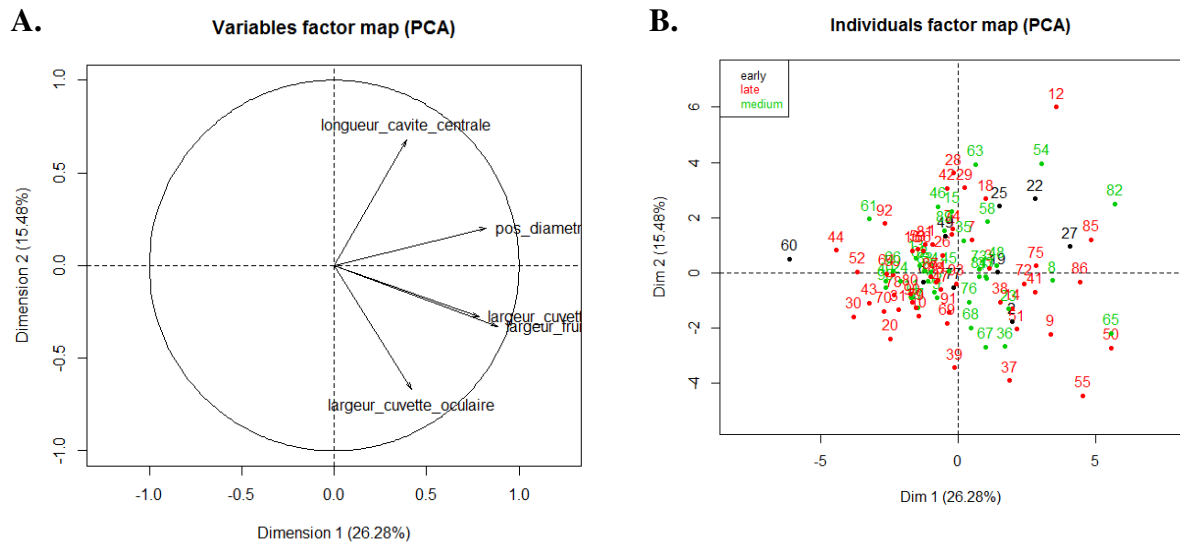


Figure 3 - PCA of morphological traits on 95 cultivars. A. Variable map. B. Individual map (cultivars are grouped according to their harvest date).

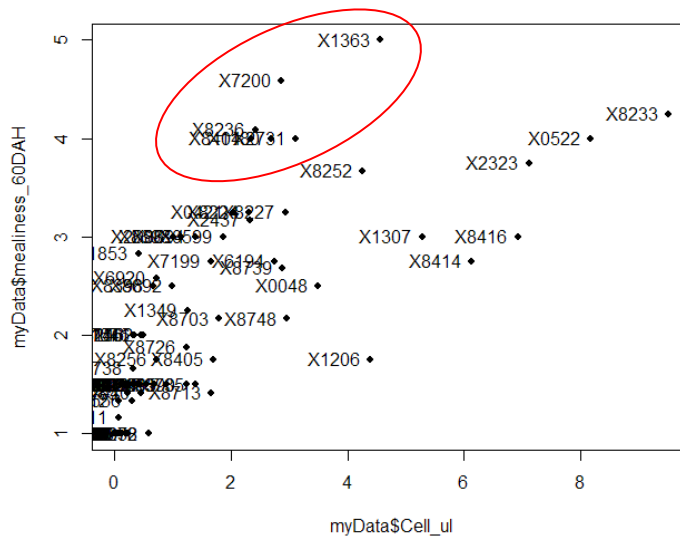


Figure 4 - Dispersion graph of the correlation between mealiness and cell cohesion test results. The y-axis represents the cell cohesion test results expressed as the number of isolated cells counted by μl . The x-axis represents sensory mealiness.

The morphological dataset did not show any specific structuration as shown by the PCA (Figure 3B). The first axis represented 26.3% of the variability and was mainly associated with fruit diameter (correlation of $r^2 = 0.88$, P-value < 0.001) (Additional file S2). It pointed out the cultivar X8233 (N°60) which in fact displayed the smallest fruit diameter (48 mm *versus* mean of 71.71 mm).

3.1.2 Mealiness development after two months of cold storage

Mealiness development mainly appears after two months of cold storage (Nobile *et al.*, 2011; Mikol-Segonne *et al.*, 2014). For this reason, screening was performed at this date. Mealiness was scored by an expert and quantified by using the cell cohesion (CC) test (Mikol-Segonne *et al.*, 2014). The CC test is used to quantify isolated cells detached from apple parenchyma samples soaked into water and mixed using a vortex. Cell detachment is allowed by the degradation of the middle lamella in mealy samples (Harker and Hallet, 1992).

First of all, correlation between sensory scores and the CC test results were confirmed (Spearman coefficient correlation = 0.87, P-value < 0.01). However, the CC test was defective to evaluate individuals with high sensory scores that displayed medium levels of isolated cells (Figure 4). These observations suggested that i) the CC test does not seem sufficient to describe this complex texture trait and/or ii) several unknown ripening mechanisms might lead to mealiness. X7200 and X1363 were “early” cultivars. However, no explanation could be drawn from phenotypic analyses performed at harvest.

From sensory analyses, 32 cultivars developed mealiness, including the six cultivars displaying a grainy texture at harvest and 26 other cultivars which were classified as firm and juicy at harvest. These 32 cultivars could be divided into two classes by considering their sensory score of mealiness. The first class composed of 8 cultivars referred to very mealy apples (score > 4) and the second class of 24 cultivars was developing mealiness (score between 2 and 4). The 66 cultivars left (score < 2) were non mealy after two months of cold storage. We may notice that mealiness developed independently of fruit morphology (Spearman correlations < 0.3, see Additional file S2).

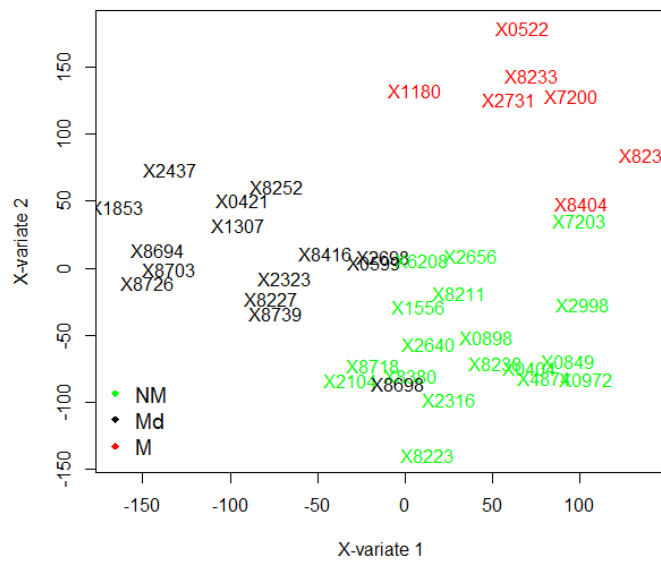


Figure 5 - Graphical representation of the 40 individuals with the two latent variables associated to the expression dataset obtained by PLS-DA. The three classes were defined from their mealiness scores (NM: non mealy, Md: developed mealiness, M: mealy).

3.2 A two steps analysis to identify contrasted clusters for mealiness

3.2.1 Phenotypic selection to perform the transcriptomic analyses

In order to analyze mealiness molecular mechanisms in a large genetic background, global transcriptome analyses were performed on a subset of 40 cultivars. As the CC test results did not correlate perfectly with mealiness, the 40 cultivars were selected according to the sensory scores of mealiness only. The cultivars were hence divided into three main sensory classes: i) non-mealy (score 1, NM), ii) mealy-in-development (score from 2 to 4, Md) and iii) mealy (score > 4, M). The three classes were respectively composed of 18, 15 and 7 cultivars.

3.2.2 Structural grouping based on a supervised multivariate approach

In order to identify the classification which structured the most the transcriptomic data, PLS-DA were conducted using the Mixomics package (R). This package was developed to analyze high dimensional datasets reduced to a small number of samples. The PLS-DA is a regression method where the response variable (class of mealiness) is categorical. The aim was to find discriminative genes that can help separating the different classes of mealiness scores (Lê Cao *et al.*, 2011).

First, a PLS-DA was performed on the 40 cultivars classified according to the previously described classification. Figure 5 displays the representation of the 40 cultivars for the two dimensions of the PLS-DA analysis. The first axis separated NM from Md apples while the second axis separated M from others. However, a few cultivars appeared as transitional between two classes. This either suggests that i) sensory score assignment displays some defects or ii) another grouping pattern may exist amongst these cultivars. For instance, X8698 displayed a score of 3 in sensory mealiness and only 1 cell per μl was counted from the CC test. From the PLS-DA result, this cultivar appeared « closer » to non-mealy samples. In that case, a defect in score assignment seemed the most likely explanation. Similar conclusions could be drawn for X0599. In the case of X8404 and X7203, they resulted from the same dye-swap, suggesting a technical problem. X2656, X6208 and X7203 were non-mealy cultivars with a low number of cells. In that case, this suggests that another cluster of expression patterns interferes with mealiness. To facilitate the analysis and to focus on clear-cut segregating genotypes, further analyses were performed on the 34 cultivars left. The dataset was finally composed of 15 NM, 13 Md and 6 M cultivars. Amongst the six mealy cultivars,

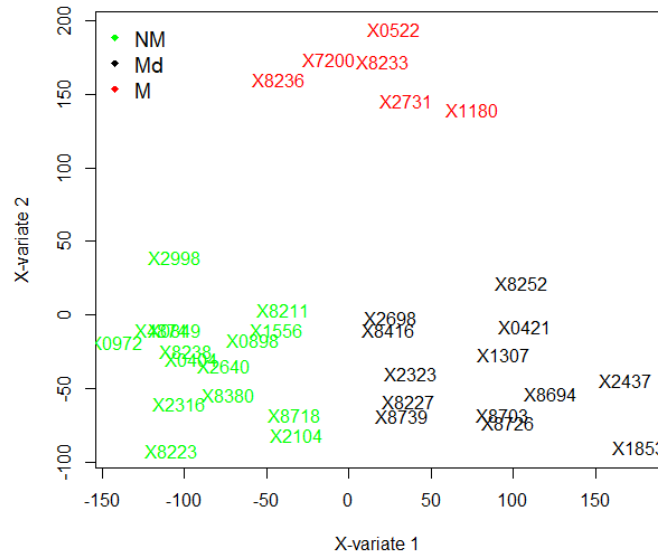


Figure 6 - Graphical representation of the 34 individuals with the two latent variables associated to the expression dataset obtained by PLS-DA. The three classes were defined from their mealiness scores (NM: non mealy, Md: developed mealiness, M: mealy).

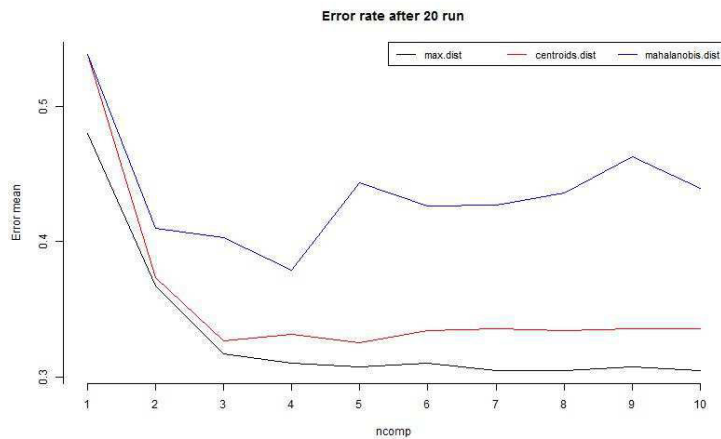


Figure 7 - Classification error rates (10 cross-validation averaged 20 times) with respect to each PLS-DA dimension. The different lines represented three different methods of prediction.

only half was harvested in early season which highlighted the fact that the grouping was not dependent on the harvest date.

A second PLS-DA was carried out on the 34 cultivars and confirmed a complete separation of these three textural groups (Figure 6). The first axis separated the NM from Md, while the second axis separated M from others. The classification performance of the PLS-DA model was evaluated as proposed by Lê Cao *et al.* (2011). The lowest error rate was found between 30 and 40% which was clearly too high to use this model as a predictive tool (Figure 7).

Furthermore, a sparse PLS-DA was performed. By introducing penalties in the model (sPLS-DA), it allowed the selection of a reduced number of genes, leading to the removal of the noise and the improving of the samples clustering (Lê Cao *et al.*, 2011). In our case, it did not improve the error rate but it gave us an indication on the number of genes required to discriminate the three groups. A total of 1,200 genes were necessary to discriminate Md from NM apples on the PC1, whereas 200 genes were sufficient to discriminate the M group. This result confirmed that transcriptomic data allowed the identification of potential clustering expression patterns associated to mealiness and that a small number of genes seemed specifically associated with mealiness. To perform an exhaustive gene selection, further analyses were based on a classical univariate analysis.

3.3 Transcriptional profiling of genes associated with mealiness

The transcriptomic experimental design was chosen to compare the expression profiles of the different phenotypic classes rather than comparing two conditions. For such purposes, Kruskal-Wallis tests were performed to identify the means of transcript expression which were significantly different amongst the three defined groups. In total, we identified 13,049 genes displaying significant differences between NM and M apples (P-value < 0.01). A second selection based on a fold change superior to 0.8 with small standard deviations was further performed and reduced the list to 643 transcripts including 67 up-regulated transcripts and 576 down-regulated transcripts (Additional file S3). Moreover, 102 anti-sense (AS) transcripts (16%) were down-regulated, suggesting a potential important role for post-transcriptional regulation in fruit maturation.

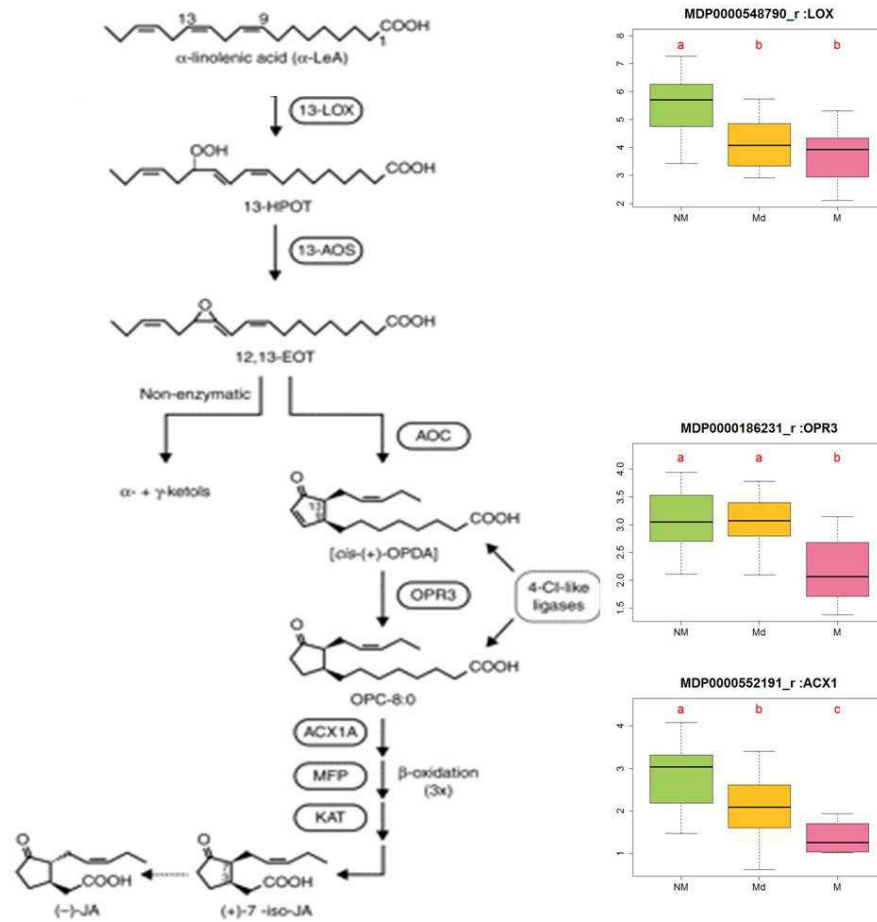


Figure 8 - Schematic representation of the jasmonate biosynthesis pathway (adapted from Wasternack (2007)) with box plots for genes that displayed differential expression patterns between NM, Md and M apples. Red letters refer to KW (P-value < 0.01) results.

3.3.1 Jasmonates biosynthesis pathway-related genes

Several transcripts annotated as genes involved in the biosynthesis of jasmonates were up-regulated in NM apple fruits (Table 2), including a lipoxygenase (MDP0000548790), *OPR3* (MDP0000186231), *ACX1* (MDP0000552191) and *JAR1* (MDP0000193700, MDP0000233483) (Figure 8). 13-LOX is the enzyme associated with the initial step in JA biosynthesis. It is a lipoxygenase which inserts oxygen in the C-13 position of α -linolenic acid (LeA). The resulting (13S)-hydroperxyoctadecatrienoic acid (13-HPOT) is dehydrated by the allene oxide synthase (AOS) into an unstable allene oxide which is catalysed by the allene oxine cyclase (AOC) into cis -(+)-12-oxophytodienoic acid (OPDA). Then, OPDA is catalysed by OPDA reductase (OPR3), followed by a β -oxidation performed by an acyl-CoA oxidase (ACX1) leading to the formation of (+)-7-iso-JA, the jasmonic acid (JA). JA itself has to be conjugated with amino-acid isoleucine (Ile) to form the biologically active form of JA, JA-Isoleucine (JA-Ile). This last step is catalyzed by the JA-amino acid synthase (JAR1).

AOS and *AOC* did not display differential expression patterns between NM and M apples but both were expressed, which suggests that they were not limiting steps in JA biosynthesis in NM apples. The LOX transcript was annotated as *LOX1* which belongs to the 9-LOX subclass and is not involved in JA biosynthesis (Wasternack, 2007). *In silico* analysis confirmed the lipoxygenase domain but did not allow for the distinction between 13-LOX and 9-LOX. However, the number of JA-related genes up-regulated in NM apples supported the hypothesis of a difference in JA biosynthesis.

Moreover, two transcripts annotated as histone deacetylase (*HDA19*), MDP0000261538, and coronatine-insensitive (*COI1*), MDP0000277815, were over-expressed in NM apples. Both genes are described as implicated in the regulation of the JA-signaling pathway. Over-expression of these two genes suggested a positive regulation of JA-signaling pathway in NM apple fruits.

3.3.2 Flavonoid biosynthesis pathway-related genes

Several over-expressed transcripts in NM fruits were associated with phenylpropanoid and flavonoid pathways (Table 2). First, two transcripts annotated cinnamate 4-hydroxylase (C4H), MDP000122830 and MDP0000876184, and two transcripts annotated 4-coumarate-CoA ligase (4CL), MDP0000293578 and MDP0000317962, displayed similar and significant

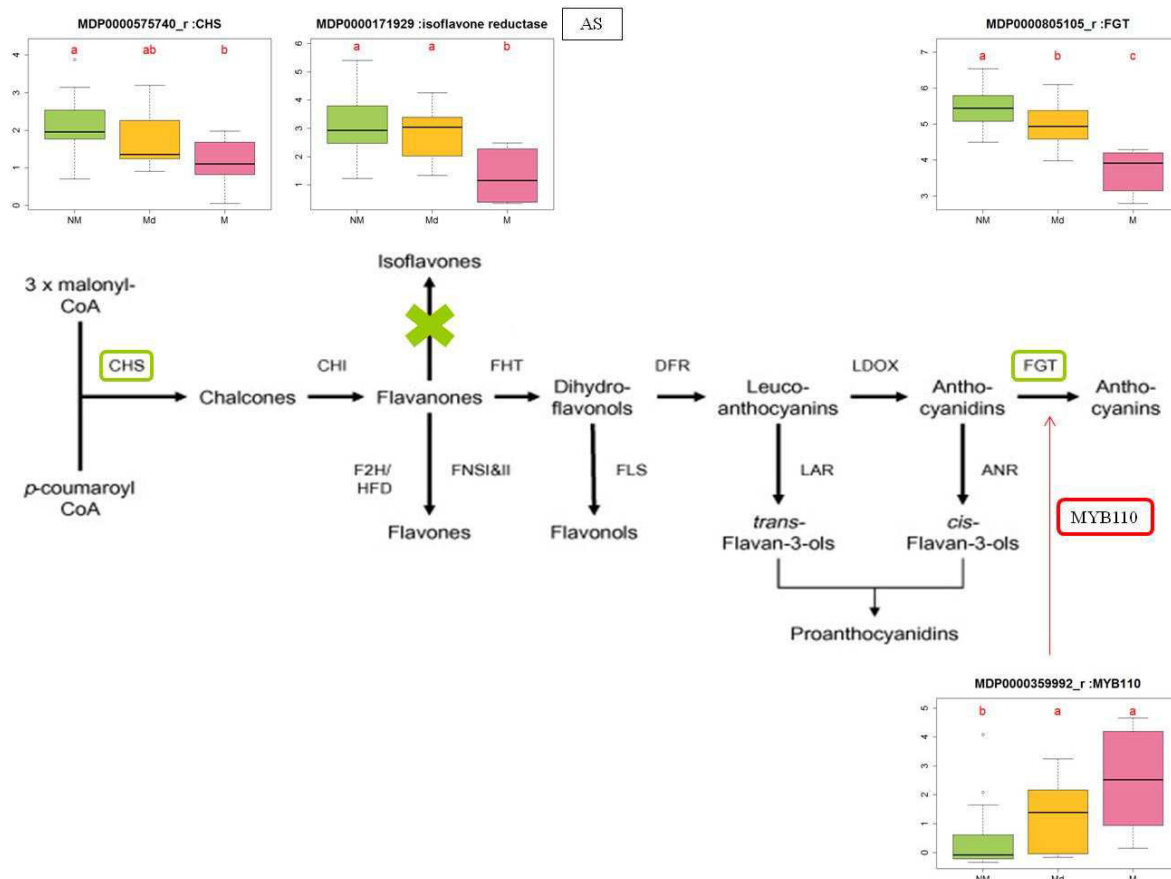


Figure 9 - General framework of the flavonoid pathway adapted from Martens *et al.* (2010). Boxplots indicate mean intensities for each group (1: NM, 2: Md, 3: M). Red letters refer to KW (P-value < 0.01) results.

expression patterns. Both are key enzymes of the phenylpropanoid pathway leading to the formation of 4-coumaroyl-CoA, the intermediate product between the lignin and flavonoid pathways. The conversion of the 4-coumaroyl-CoA by the chalcone synthase (CHS) results in the formation of a chalcone precursor from which all flavonoids derive. A transcript annotated *CHS*, MDP0000575740 tended to be over-expressed in NM fruits but the differences between the three phenotypic groups were not significant (P-value = 0.052). Despite this lack of significance, its expression profile was consistent with an activation of the flavonoid pathway in NM fruits.

Based on the annotations, the flavonoid pathway seemed to be more active in NM apples. A transcript displaying similarities with an anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase, MDP0000805105, was over-expressed in NM apples (Figure 9). This enzyme belongs to the glycosyltransferase family 1 (GT1) that includes several transferases which act at the last step of the flavonoid pathway to add sugars on the flavonoid backbone. We might hypothesize that the identified gene is probably not acting on the anthocyanin pathway but on another flavonoid subclass pathway. Moreover, we identified the over-expression in NM apples of two transcription factors known to form a complex, WD40-bHLH-MYB, that participates in the activation of the anthocyanin pathway. These transcripts were annotated as *WD40* (MDP0000314954, MDP0000193975 and MDP0000154753) and basic helix-loop-helix (bHLH) (MDP0000171697, MDP0000226497). However, *MYB110* (MDP0000359992) displayed over-expression in M apples suggesting an increase of anthocyanins in M fruits. Expression of *MYB110* supports the hypothesis that it is probably not the anthocyanin pathway that is activated in NM apples especially since anthocyanins are concentrated in the apple peel and we performed the analyses on parenchyma tissues. In addition, two AS transcripts annotated as isoflavone reductases (MDP0000171929, MDP0000376285) were overexpressed in NM fruits which suggests a potential post-translational regulation of these transcripts involved in the isoflavonoid biosynthesis. Isoflavones may not be the flavonoids produced in NM apples.

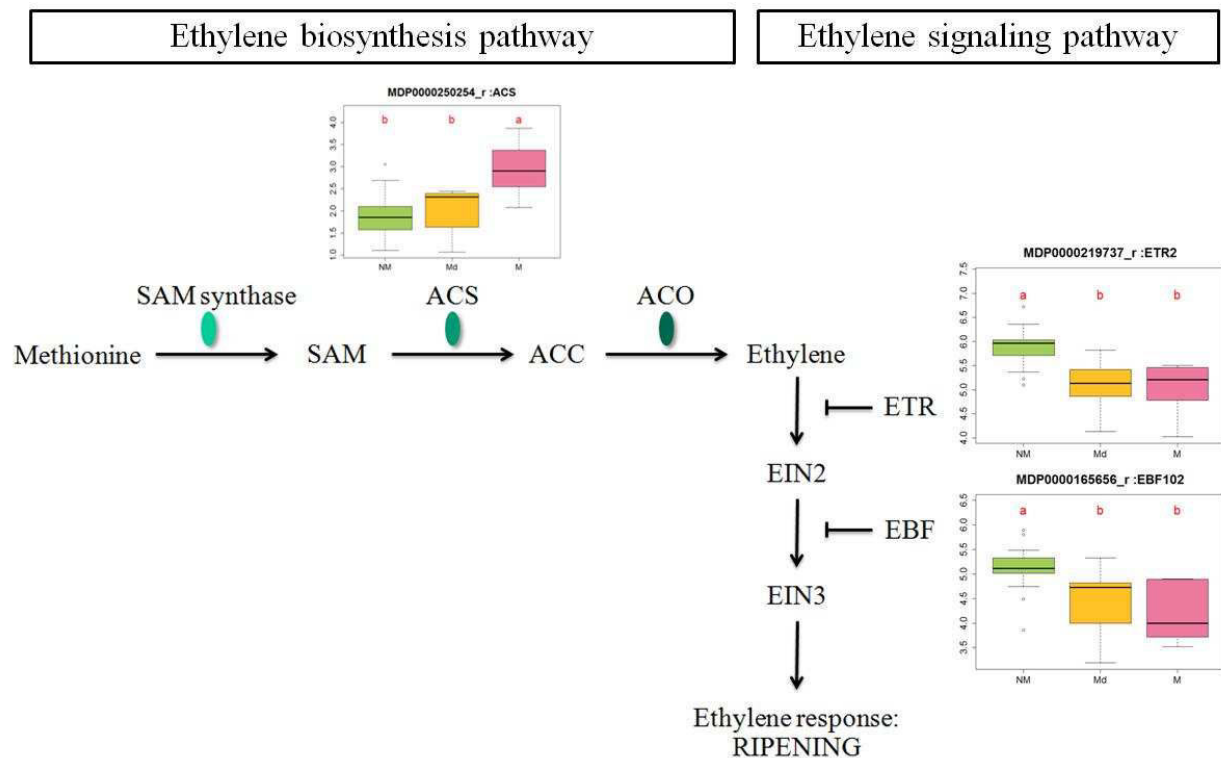


Figure 10 - Schematic representation of the ethylene biosynthesis and signaling pathways with box plots for genes that displayed differential expression patterns between NM, Md and M apples. Red letters refer to KW (P-value < 0.01) results.

3.3.3 Ethylene pathway-related genes

Three transcripts involved in the ethylene pathway exhibited differential expression patterns (Table 2). First, a transcript annotated ACC synthase (*ACS*), MDP0000250254, was down-regulated in NM apples (Figure 10). *ACS* is a key enzyme of the ethylene biosynthesis pathway. In addition, an ethylene response receptor (*ETR*), MDP0000219737, and an EIN3-binding-F-box (*EBF*), MDP0000165656, were up-regulated in NM apple fruits. MDP0000219737 corresponds to *ETR2* validated by Ireland *et al.* (2012); MDP0000165656 corresponds to *EBF102*, one of the four apple EBFs identified by Tacken *et al.* (2012). ETRs and EBFs have been demonstrated to negatively regulate ethylene (Alexander and Grierson, 2002; Yang *et al.*, 2010). The expression patterns of these three genes suggest a negative regulation of the ethylene pathway in NM apples.

3.3.4 Cell wall-related genes

Several transcripts annotated as cell wall-related genes were over-expressed in M apples including transcripts with sequence similarities with a pectate lyase (*PL*), MDP0000539270, a wall-associated-kinase like (*WAKL*), MDP0000426154 and a pectin methylesterase (*PME*), MDP0000621927 (Table 2). *PLs* and *PMEs* are enzymes associated with pectin modifications. *WAKLs* are less known than *WAKs* but both are receptor kinases tightly associated with the pectin fraction of the cell wall. An AS transcript annotated as *WAK5*, MDP0000169942, was over-expressed in NM fruits suggesting a negative regulation in NM apples. The expression patterns of these cell wall-related genes support the hypothesis that an increase of ethylene biosynthesis in M apples induces cell wall modifications, one of the main features of fruit softening.

3.3.5 Calcium channel regulation

A transcript annotated *CPK6*, MDP0000306850, was down-regulated in NM fruits. *CPK6* codes for a calcium-dependant protein kinase which regulates calcium channels (Table 2). The regulation of calcium channels suggests a regulation of ions flux involved in the turgor pressure associated with the NM phenotype.

4 DISCUSSION

4.1 Mealiness unlinked to harvest traits

Morphological traits and sensory analyses displayed no correlation with mealiness development in cold storage. All soft apples at harvest developed mealiness during cold storage but mealy apples were not always soft at harvest. Similarly, mealiness appeared as partially correlated with the period of harvest: early cultivars tended to develop mealiness during storage. But late cultivars can also develop mealiness. This result is in agreement with literature that concludes that the harvest date does not influence the softening development (Johnston *et al.*, 2002). However, our hypothesis is that mealiness is associated with a rapid loss of firmness during storage (Mikol-Segonne *et al.*, 2014). In regard of this thesis, it appears relevant that “early” cultivars which displayed a faster fruit development are also prone to display a faster fruit ripening resulting in mealiness.

Fruit size is also considered to be correlated with the development of apple softening during storage. Larger fruits are considered to be softer than smaller fruits (Harker *et al.*, 1997). Our results did not support this conclusion as no correlation between any of the morphological traits and mealiness was noticed. It has also been suggested that differences in fruit firmness would result from the parenchyma cells organisation. Volz *et al.* (2004) concluded that larger fruits displayed lower firmness, had larger cells and more intercellular airspace than smaller fruits. McAtee *et al.* (2009) showed that apple firmness is independent of cell size. Therefore, morphological fruit characterization at harvest appears as insufficient to predict mealiness development during storage. A better understanding of the molecular events related to mealiness seems clearly necessary to consider any eventual prediction of this negative trait at harvest time.

4.2 The contribution of a multivariate approach

A supervised method like PLS-DA was used to evaluate clustered expression patterns correlated with mealiness. As PLS-DA analyses aim to maximize the covariance between two datasets, it appeared as a useful tool to improve the classification accuracy. Thus, six cultivars were revealed difficult to classify regarding the mealiness. Many reasons could explain this:

either the phenotyping or the normalization was defective or the expression patterns were influenced by another non-identified trait. For obvious reasons, these cultivars have been discarded and further analyses were performed on the 34 remaining cultivars.

PLS or PLS-DA regression are very popular for a prediction purpose in the field of chemometrics and more and more in the medical field. In the frame of medical diagnosis, PLS-DA regressions are performed on two clear-cut segregating populations. In our case, we had three different classes to predict, including the Md class which represents an intermediate phenotype. Segregation was not clear enough. Moreover, the small proportion of M cultivars was insufficient to perform cross-validation and to consider this tool for prediction purposes. In addition, the use of a PLS-DA method to identify genes was difficult considering the complex noise structure of our dataset. This is mainly due to technical problems (a very high number of genes were expressed at various levels, a phenomenon increased by the use of AS transcripts) and due to biological problem (the high level of dependence between all genes involved in coordinated pathways associated with post-transcriptional regulation by AS) (Nguyen and Rocke, 2004). Therefore, the use of PLS-DA appeared relevant for exploratory purposes (Lê Cao *et al.*, 2011) and for refining a relevant dataset. Combining it with a classical approach performed “gene-by-gene” we identified significantly differentially expressed transcripts associated with mealiness.

4.3 Jasmonates as key regulators of mealiness development

4.3.1 Induction of JA pathway in non-mealy apples

JA biosynthesis and signaling are known to be conserved pathways across the plant kingdom (Wasternack and Hause, 2013). First, JA biosynthesis requires the action of several enzymes which are almost all up-regulated in NM apples. Moreover, the up-regulation of *JAR1* suggests the biosynthesis of JA-Ile. JA-Ile is the biologically active form of JA and is the only JA metabolite to play a central role in JA signaling (Fonseca *et al.*, 2009). However, JA-responsive genes are under a tight transcriptional control by Jasmonate Zim Domain (JAZ) which acts as a repressor. Degradation of JAZ is necessary to promote JA-responsive gene expressions. COI1 is the F-box protein that is a part of the SCF^{COI1} complex which functions as an E3 ubiquitin ligase and degrades JAZ proteins. Therefore, COI1 is required for the expression of JA-responsive genes. In the present study, up-regulation of *COI1* in NM apple

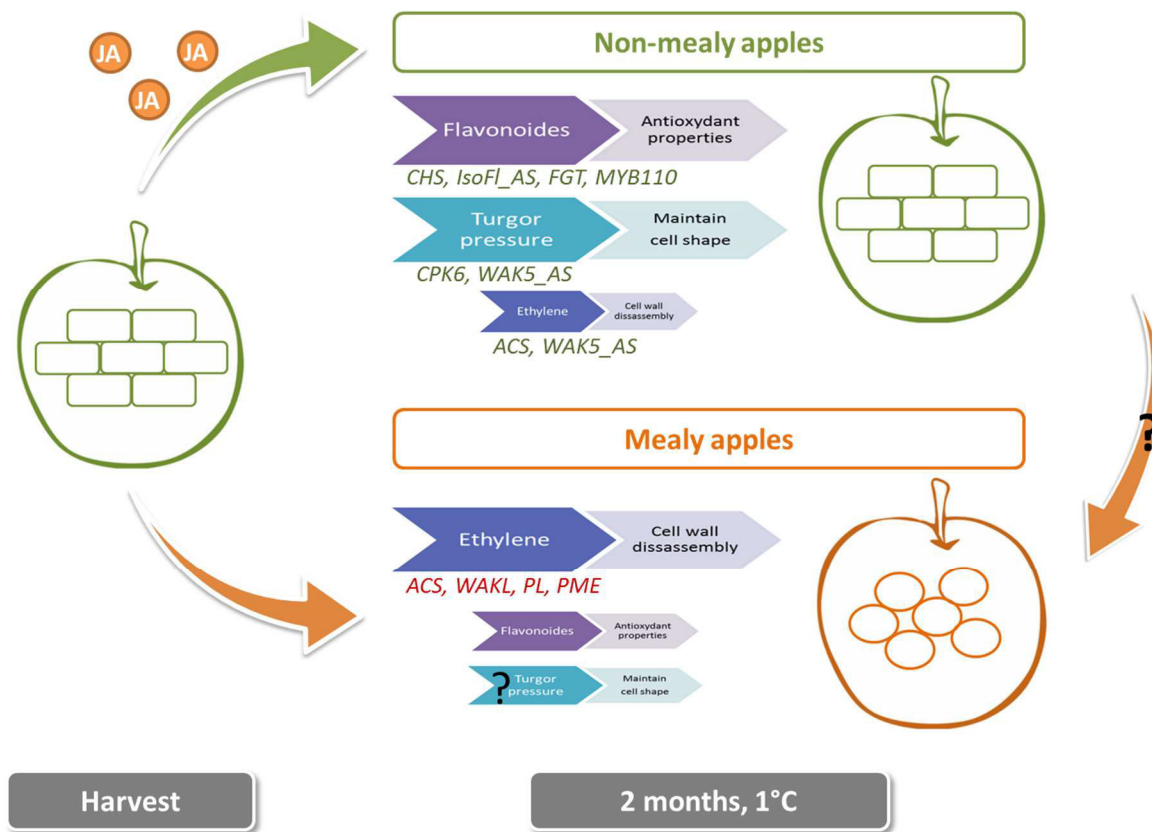


Figure 11 - A model of apple mealiness development with JA as key regulator of mealiness. This model is based on a transcriptomic analysis performed on 34 cultivars. The activation of jasmonates (JA) biosynthesis and signaling pathway leads to i) a negative regulation of ethylene pathway limiting cell wall degradation, ii) a controlling of the turgor pressure which maintains cell shape, iii) the biosynthesis of flavonoids with antioxidant properties keeping cells from damage. The reduction of jasmonates biosynthesis results in an increase of ethylene and cell wall-related genes which induces the loss of cell-to-cell cohesion characteristic of mealy texture. However, results question whether mealiness results from differences in all mentioned pathways or a decrease in JA biosynthesis induced mealiness development.

fruits suggests that COI1 could participate in the repression of eventual JAZ proteins. Moreover, the over-expression of *HDA19* may also support the hypothesis of an activation of JA-responsive genes. HDA19 is involved in the deacetylation of histones resulting in post-transcriptional gene regulation. It has been demonstrated that HDA19 interacts with JAZ proteins and play a role in the transcriptional regulation of JA-responsive genes (Zhou *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2011). Overexpression of *HDA19* may indeed induce the expression of JA-responsive genes (Zhou *et al.*, 2005) which is consistent with our results. However, how histone deacetylation modulates JA-signaling is still unclear as overexpression of *HDA6* may repress the expression of JA-responsive genes (Zhu *et al.*, 2011). Further work will be necessary to investigate the effective role of HDA19 in the regulation of JA-responsive genes expression.

Hereby, an increase in the expression of genes leading to the biosynthesis of JA-Ile and in the expression of *COI1* would allow expression of JA-responsive genes. All JA-responsive genes identified in our study suggest the control of several pathways such as ethylene and flavonoid pathways and turgor maintenance. It underlines a potential key role of JA in the regulation of mealiness development. Figure 11 illustrates the suggested central role of JA in the control of apple mealiness development.

4.3.2 Regulation of ethylene pathway by jasmonates

4.3.2.1 The role of ethylene in mealiness development

ACS is one of the key enzymes controlling the production of ethylene. The lower expression of the *ACS* gene in NM apples suggests a difference of ethylene biosynthesis between NM and M phenotypes. The role of ethylene in the ripening of climacteric fruits is now well established. Ethylene indeed regulates various ripening processes during which the majority of the sensory quality attributes are elaborated including aroma, flavour or texture (Pech *et al.*, 2010). Moreover, the up-regulation of an ethylene receptor gene in NM apples could be associated with negative regulation. Harb *et al.* (2012) displayed similar results with *MdETR1* expression being higher in the non-softening apple cultivar “HoneyCrisp” than in the rapidly softening cultivar “McIntosh”. Transgenic lines of tomato containing antisense *LeETR1* or *LeERT2* showed an accelerated abscission of petioles and flower senescence which demonstrated their roles as negative regulators of tomato growth and development (Wang *et*

al., 2006). Moreover, EBF proteins negatively regulate the ethylene signaling pathway *via* mediating the degradation of EIN3/EIL proteins (Potuschak *et al.*, 2003). In another study, four apple EBFs have been identified including *EBF1* and *EBF102*. *EBF1* displayed constitutive expression over apple ripening and inhibited *EIN3* and ethylene-responsive genes during transient assays performed on *Nicotiana benthamiana*; *EBF102* expression increased as the fruit ripens consistently with ripening-responsive genes (Tacken *et al.*, 2012). They associated apple kinetic of ripening with over-expression of *EBF102* in “Royal Gala” without considering the ripening phenotype. We compared expression profiles of various genotypes at a given time. All cultivars could express *EBF102* as they ripened but we suggest that the more *EBF102* is expressed, the more the ethylene signaling pathway is negatively regulated. Moreover, a proteomic analysis supports our hypothesis as it revealed that highly firm apples displayed a lower expression of ethylene which resulted in the slowing-down of the ripening process (Marondedze and Thomas, 2012). The accumulation of cell wall-related genes in M fruits supports the hypothesis that an increase in ethylene production enhances ripening and cell wall modification. The degradation of the middle lamella results in a loss of cell-to-cell cohesion associated with mealiness. Our results suggest that differences in M and NM apples could be linked to ethylene production, resulting in the well-know cell wall modifications.

4.3.2.2 Ethylene biosynthesis fine-tuned by JA

An important role in the ripening of climacteric fruits has already been assigned to JA. Measurements of endogenous JA displayed high levels before the climacteric stage, which had been proposed to be a key element for the transition in ethylene production from system 1 to system 2 (Fan *et al.*, 1998). It has also been demonstrated that endogenous JA production decreased sharply after the climacteric crisis but increased slowly again during the ripening stage (Kondo *et al.*, 2000). These results suggest a supplemental role of JA during fruit ripening and support our hypothesis.

A synergistic crosstalk between ET and JA is known to occur in response to necrotrophic pathogens. JA and ET usually act synergistically but some antagonistic interactions have also been described (Wasternack and Hause, 2013; Zhu, 2014; Song *et al.*, 2014). Similar crosstalk during fruit ripening has also been evocated. Previous works reported that JA can regulate the ethylene biosynthesis pathway by down-regulating genes such as *ACS* in pear fruits (Kondo *et al.*, 2007) or *ACO* in peach fruits (Ziosi *et al.*, 2008). In these studies, ripening modifications

evaluated by ethylene production and fruit firmness were slowed down. Moreover, an ethylene receptor gene *ETR2* was also strongly down-regulated in JA treated peach fruits (Soto *et al.*, 2012). In our work, up regulation of JA in non-mealy fruits may be related to the differences of expression observed in ethylene-related genes. Furthermore, Soto *et al.* (2012) suggested that inhibitory effects of JA on ethylene production and flesh softening account for a transient slowing down of peach ripening. This conclusion supports the idea that mealiness is not only cultivar-dependant but can be part of the regular transition phase of all apple fruits before senescence. In that case, differences of apple mealiness may result in how fast the ripening process develops, as suggested by our previous work (Mikol-Segonne *et al.*, 2014). Gene expressions of the intermediate phenotypic class Md supports this hypothesis as their expression levels were always between M and NM mean expression levels. Thereby the speed of ripening may be fine-tuned by JA, acting as an important regulator of ethylene and indirectly of cell wall-related genes and hence, of apple mealiness development.

4.3.3 Flavonoids contribute to cell integrity in ripe apple fruit

4.3.3.1 Flavonoids as regulators of fruit ripening

Flavonoids are synthesized *via* a branch of the phenylpropanoid pathway. They are secondary metabolites divided into six major subgroups: chalcones, flavones, flavonols, flavan-diols, anthocyanins and proanthocyanidins (PA). A major part of the differentially expressed transcripts suggests an increase of the flavonoid content in NM apples flesh which might not be isoflavones and anthocyanins. Various studies confirmed the presence of polyphenolic compounds in apple flesh even though most were found in the apple skin (Tsao *et al.*, 2003; McGhie *et al.*, 2005). The two major flavonoid components measured in apple flesh are flavan-3-ols (catechin and epicatechin) and procyanidins (Burda *et al.*, 1990; Tsao *et al.*, 2003; McGhie *et al.*, 2005; Verdu *et al.*, 2014) which is consistent with our hypothesis concerning the subclass of flavonoids probably produced in NM apples. Both components displayed an important decrease during the early stage of development but they remained relatively constant during maturation and storage (Burda *et al.*, 1990). Moreover, concentrations of each of these components have been shown to vary between cultivars (McGhie *et al.*, 2005) but no relation has ever been identified between apple texture and each antioxidant phenolic concentration.

Fruit ripening is also described as an oxidative process, accompanied by an increase of reactive oxygen species (ROS). Excess of ROS can damage cellular components resulting in cell death and potentially fruit senescence (Tian *et al.*, 2013). To counteract this phenomenon, plant cells dispose of various antioxidative defence mechanisms which are based on enzymatic antioxidant systems (*e.g.* catalases, superoxide dismutases (SOD)) or non-enzymatic low molecular metabolites (*e.g.* ascorbic acid (vitamin C), glutathione (GSH), flavonoids) (Gill and Tuteja, 2010). In many climacteric species, an increase of the oxidative stress is followed by an increase of the components of the antioxidant system in order to scavenge an overproduction of ROS. In pear, ROS are required to initiate and promote ripening but their concentration modulate the rate of postharvest senescence (Brennan and Frenkel, 1977). Peach ripening is also associated with an increase of SOD and GSH to cope with the oxidative process (Camejo *et al.*, 2010). Similar changes are described for tomatoes (Jimenez *et al.*, 2002) or climacteric peppers (Tan *et al.*, 2012). Almost all studies focus on enzymatic antioxidant systems. However, all flavonoids displayed antioxidant properties (Agati *et al.*, 2012; Kumar and Pandey, 2013) suggesting they constitute an efficient antioxidant mechanism and that there is no reason to discard flavonoids for such purposes. Therefore, the over-expression of the flavonoid pathway suggests that NM apples develop a cellular machinery able to regulate oxidative stress that can damage cellular components. Similarly to our study, Maronedze and Thomas (2012) identified an accumulation of the enzyme dehydroascorbate reductase in firm apple fruits, which is involved in the formation of ascorbate. Hence, the antioxidant properties of flavonoids could contribute to maintain cell integrity of NM apples. The decrease of the flavonoid content in M apples could be a first step towards a senescence state.

4.3.3.2 Flavonoid pathway induced by jasmonates

It is admitted that JA act as elicitors of the production of secondary metabolites following a conserved mechanism across the plant kingdom. JA-activation of master regulators (transcription factors) could activate expression of many genes involved in a particular pathway, including the flavonoid pathway (De Geyter *et al.*, 2012). Influence of JA on flavonoid production has already been reported in apple fruits. Pre-harvest spray of MeJa on “Cripps Pink” apples induced the accumulation of all known flavonoids in fruit skin (Shafiq *et al.*, 2013) while similar treatment performed on “Fuji” apple did not enhance the

production of catechin and quercetin (Rudell *et al.*, 2002). JA effects in fruit ripening are sometimes associated with anthocyanins accumulation corresponding to an acceleration of ripening (Rudell *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2009).

4.3.3.3 Crosstalk between ROS and hormonal pathways to fine-tune oxidative stress

Crosstalks between ROS and hormonal pathways have been reported but knowledge of their modes of action is still limited.

Firstly, climacteric fruits are characterized by an increase in respiration at the onset of ripening, in concert with an increase of ethylene production. Ethylene seems to regulate this higher respiration rate and to indirectly regulate the associated release of ROS (Perotti *et al.*, 2014). An exogenous application of ethylene on pear indeed increases the peroxide levels (Brennan and Frenkel, 1977); in return, the application of 1-MCP suppresses the accumulation of peroxide (Dong *et al.*, 2014). Therefore, the regulation of ethylene production in NM apples is another way to reduce ROS accumulation. Combined with flavonoid compounds, apple fruit cells insure their integrity and reduce cell damages related to oxidative stress.

Secondly, JA have also been related to ROS in the frame of lignin deposition in response to cell wall damage (Hamann, 2014). In that case, plant cells produce ROS which induce a ROS burst and JA accumulation. Both form a negative feedback loop enabling the repression of each other that modulates the downstream process of lignin deposition (Denness *et al.*, 2011). This represents an example of dynamic signal integration in order to ensure cell wall integrity maintenance. If we consider a similar mechanism in apple fruit cells, we could hypothesize that ethylene induces ROS production that activates JA biosynthesis. Then, JA could act as a key moderator of ripening by orchestrating ethylene, flavonoids and ROS accumulation. By combining these different mechanisms, cells may ensure to reduce oxidative stress and cell wall damages, and hence, delay mealiness and subsequent fruit senescence.

4.3.4 A potential role in turgescence control

Turgor pressure is considered as an important factor associated with textural changes in fruits but current knowledge does not solve whether it plays an active or a passive role (Goulao and Oliveira, 2008). Flesh firmness and turgor have been shown to be positively correlated in apples (Tong *et al.*, 1999). Similarly, Iwanami *et al.* (2008) concluded to a correlation between the rates of reduction in turgor and softening in non-mealy apples but they also concluded that a cultivar with a low reduction rate of turgor can turn mealy. Harker and Hallett (1992) already suggested that turgor in mealy apples could induce the rounding shape of cells. Hence, relative contribution of turgor and associated molecular mechanisms are still far from clear.

In the present study, two genes involved in stomatal aperture of guard cells, *COII* and *CPK6*, were up-regulated in NM apple fruits. A parallel can be drawn between this phenomenon and mealiness as both are related to water flux. Stomatal closure in guard cells can be induced by MeJA. It has been shown that MeJA activates calcium ion channels (Ica) that induce the elevation of cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) (Munemasa *et al.*, 2011b). This increase of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ causes a rapid decrease of turgor pressure and a subsequent closure of stomata (Martinoia *et al.*, 2007). Additionally, Ica activation is abolished both in the MeJA insensitive *Arabidopsis* mutants *COII* (Munemasa *et al.*, 2007) and *CPK6* (Munemasa *et al.*, 2011a). It has been demonstrated that *CPK6* acts directly on the regulation of Ica. A clear role in fruit ripening remains to be elucidated. Nonetheless, we may hypothesize that over-expression of *CPK6* in NM apple fruits stops the Ica opening in response to endogenous JA. Keeping the Ica closed is, in some extent, a way for the cell to limit ions exchange and to maintain cell turgor and hence, fruit firmness.

Moreover, a focus can also be done on WAKs involvement in maintain turgor pressure in apple fruits. WAKs are receptor-kinases of Ser/Thr type. WAK2 has been associated with the induction of invertase activities that modify turgor pressure during cell elongation in *Arabidopsis thaliana* (Kohorn and Kohorn, 2012). In NM apples, Anti Sense WAK transcript was over-expressed suggesting a post-translational regulation of WAK controlling the turgor pressure. Recently, similar results have been demonstrated within apple progenies as AS WAK was also over-expressed in NM apples (Mikol-Segonne *et al.*, 2014).

5 CONCLUSIONS

Full description of apples at harvest did not help to predict an eventual development of apple mealiness during cold storage. Understanding the molecular bases of mealiness appeared as necessary. By using a large transcriptome analysis on 34 cultivars, we deciphered new molecular bases of mealiness. Apple mealiness is usually associated with cell wall disassembly and a loss of turgor pressure controlled by the endogenous ethylene production. JA has already been identified during ripening of climacteric fruits but its role has been neglected for a long time. Here, we identified JA as a potential key regulator of many of these biological pathways involved in apple mealiness (Figure 11). By fine-tuning ethylene biosynthesis, JA regulates the cell wall disassembly. By inducing flavonoid biosynthesis, JA insures cellular antioxidant defense. Associating with an increase of expression of *cpk6*, potential negative effect of JA on pressure turgor is controlled. Consequently, JA turns out as a new driver of apple fruits ripening by keeping cells far away of mealiness. However, the exact mechanisms through which JA regulates the biosynthesis of flavonoids and interacts with ethylene require to be investigated. Functional validation of this model could now to be undertaken using pharmacological approaches and biochemical analyses. Several approaches may be considered as i) the inhibition or activation of JA, ROS or flavonoid pathways, ii) the evaluation of JA and flavonoid amounts in NM and M apples. Finally, the role attributed to JA underlines a useful role in the molecular strategies developed to control apple mealiness.

REFERENCES

- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M.** 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* **196**, 67–76.
- Alexander L, Grierson D.** 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2039–2055.
- Atkinson RG, Bolitho KM, Wright MA, Iturriagagoitia-Bueno T, Reid SJ, Ross GS.** 1998. Apple ACC-oxidase and polygalacturonase: ripening-specific gene expression and promoter analysis in transgenic tomato. *Plant Molecular Biology* **38**, 449–460.
- Atkinson RG, Sutherland PW, Johnston SL, Gunaseelan K, Hallett IC, Mitra D, Brummell DA, Schroder R, Johnston JW, Schaffer RJ.** 2012. Down-regulation of POLYGALACTURONASE1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit. *BMC Plant Biology* **12**, 129.
- Brennan T, Frenkel C.** 1977. Involvement of Hydrogen Peroxide in the Regulation of Senescence in Pear. *Plant Physiology* **59**, 411–416.
- Brummell DA, Harpster MH.** 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **47**, 311–340.
- Burda S, Oleszek W, Lee CY.** 1990. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 945–948.
- Camejo D, Martí MC, Román P, Ortiz A, Jiménez A.** 2010. Antioxidant System and Protein Pattern in Peach Fruits at Two Maturation Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 11140–11147.
- Lê Cao KA, Boitard S, Besse P.** 2011. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics* **12**, 253.
- Celton JM, Gaillard S, Bruneau M, Pelletier S, Aubourg S, Martin-Magniette ML, Navarro L, Laurens F, Renou JP.** 2014. Widespread anti-sense transcription in apple is correlated with siRNA production and indicates a large potential for transcriptional and/or post-transcriptional control. *New Phytologist* **203**, 287–99.
- Concha CM, Figueroa NE, Poblete LA, Oñate FA, Schwab W, Figueroa CR.** 2013. Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* **70**, 433–444.
- Costa F, Alba R, Schouten H, et al.** 2010. Use of homologous and heterologous gene expression profiling tools to characterize transcription dynamics during apple fruit maturation and ripening. *BMC Plant Biology* **10**, 229.
- Denness L, McKenna JF, Segonzac C, Wormit A, Madhou P, Bennett M, Mansfield J, Zipfel C, Hamann T.** 2011. Cell Wall Damage-Induced Lignin Biosynthesis Is Regulated by a Reactive Oxygen Species- and Jasmonic Acid-Dependent Process in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **156**, 1364–1374.

- Dong Y, Liu L, Zhang Y, Guan J.** 2014. Effects of 1-MCP on softening, yellowing and H₂O₂ content in post-harvest 'Jingbaili' pear fruit during and after cold storage. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **55**, 404–409.
- Fan X, Mattheis J., Fellman J.** 1998. A role for jasmonates in climacteric fruit ripening. *Planta* **204**, 444–449.
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R.** 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**, 344–350.
- De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A.** 2012. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science* **17**, 349–359.
- Gill SS, Tuteja N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909–930.
- Goulao LF, Oliveira CM.** 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not a fruit. *Trends in food science & technology* **19**, 4–25.
- Hamann T.** 2014. The Plant Cell Wall Integrity Maintenance Mechanism - Concepts for organization and mode of action. *Plant and Cell Physiology*, pcu164.
- Harb J, Gapper NE, Giovannoni JJ, Watkins CB.** 2012. Molecular analysis of softening and ethylene synthesis and signaling pathways in a non-softening apple cultivar, 'Honeycrisp' and a rapidly softening cultivar, 'McIntosh'. *Postharvest Biology and Technology* **64**, 94–103.
- Harker FR, Hallett IC.** 1992. Physiological changes associated with development of mealiness of apple fruit during cool storage. *HortScience* **27**, 1291–1294.
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G.** 1997. Texture of fresh fruit. *Horticultural Reviews* **20**, 121–224.
- Ireland HS, Guillen F, Bowen J, Tacke EJ, Putterill J, Schaffer RJ, Johnston JW.** 2012. Mining the apple genome reveals a family of nine ethylene receptor genes. *Postharvest Biology and Technology* **72**, 42–46.
- Ireland HS, Gunaseelan K, Muddumage R, Tacke EJ, Putterill J, Johnston JW, Schaffer RJ.** 2014. Ethylene regulates apple (*Malus x domestica*) fruit softening through a dose-by-time dependent mechanism and through differential sensitivities and dependencies of cell wall-modifying genes. *Plant and Cell Physiology* **55**, 1005-1016.
- Iwanami H, Moriya S, Kotoda N, Abe K.** 2008. Turgor Closely Relates to Postharvest Fruit Softening and Can Be a Useful Index to Select a Parent for Producing Cultivars with Good Storage Potential in Apple. *HortScience* **43**, 1377–1381.
- Jimenez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P.** 2002. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* **214**, 751–758.
- Johnston JW, Hewett EW, Hertog MLATM.** 2002. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: A review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **30**, 145–160.
- Kohorn BD, Kohorn SL.** 2012. The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Frontiers in Plant Science* **3**, 88.

- Kondo S, Tomiyama A, Seto H.** 2000. Changes of Endogenous Jasmonic Acid and Methyl Jasmonate in Apples and Sweet Cherries during Fruit Development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **125**, 282–287.
- Kondo S, Yamada H, Setha S.** 2007. Effect of Jasmonates Differed at Fruit Ripening Stages on 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Synthase and ACC Oxidase Gene Expression in Pears. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**, 120–125.
- Kumar S, Pandey AK.** 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* **2013**, 162750.
- Lassois L, Denancé C, Feugey L, Lasserre-Zuber P, Poncet C, Hibrand-Saint-Oyan L, Ravon E, Durel CE.** Genetic diversity, population structure, parentage analysis and construction of nested core collections in the French apple germplasm based on microsatellite markers. *Soumis*.
- Maronedze C, Thomas LA.** 2012. Apple Hypanthium Firmness: New Insights from Comparative Proteomics. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **168**, 306–326.
- Martens S, Preuß A, Matern U.** 2010. Multifunctional flavonoid dioxygenases: Flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry* **71**, 1040–1049.
- Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE.** 2007. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**, 83–102.
- McAtee PA, Hallett IC, Johnston JW, Schaffer RJ.** 2009. A rapid method of fruit cell isolation for cell size and shape measurements. *Plant Methods* **5**, 5.
- McGhie TK, Hunt M, Barnett LE.** 2005. Cultivar and Growing Region Determine the Antioxidant Polyphenolic Concentration and Composition of Apples Grown in New Zealand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 3065–3070.
- Mikol Segonne S, Bruneau M, Celton J, Le Gall S, Francin-Allami M, Juchaux M, Laurens F, Orsel M, Renou J.** 2014. Multiscale investigation of mealiness in apple: an atypical role for a pectin methylesterase during fruit maturation. *BMC Plant Biology* **14**, 1593.
- Miszczak A, Lange E, Saniewski M, Czapski J.** 1995. The effect of methyl jasmonate on ethylene production and CO₂ evolution in Jonagold apples. *Acta Agrobotanica* **48**, 121–128.
- Munemasa S, Hossain MA, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y.** 2011*a*. The *Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein Kinase, CPK6, Functions as a Positive Regulator of Methyl Jasmonate Signaling in Guard Cells1[W][OA]. *Plant Physiology* **155**, 553–561.
- Munemasa S, Mori IC, Murata Y.** 2011*b*. Methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid in guard cells. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 939–941.
- Munemasa S, Oda K, Watanabe-Sugimoto M, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y.** 2007. The coronatine-insensitive 1 Mutation Reveals the Hormonal Signaling Interaction between Abscisic Acid and Methyl Jasmonate in *Arabidopsis* Guard Cells. Specific Impairment of Ion Channel Activation and Second Messenger Production. *Plant Physiology* **143**, 1398–1407.
- Nguyen DV, Rocke DM.** 2004. On partial least squares dimension reduction for microarray-based classification: a simulation study. *Computational Statistics & Data Analysis* **46**, 407–425.
- Nobile PM, Wattedled F, Quecini V, Girardi CL, Lormeau M, Laurens F.** 2011. Identification of a novel α -L-arabinofuranosidase gene associated with mealiness in apple. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4309–4321.

Pech J-C, Latché A, Bouzayen M. 2010. Ethylene Biosynthesis. In: Davies PJ, ed. *Plant Hormones*. Springer Netherlands, 115–136.

Perotti VE, Moreno AS, Podestá FE. 2014. Physiological aspects of fruit ripening: The mitochondrial connection. *Mitochondrion* **17**, 1–6.

Pitts LJ, Cavalieri RP. 1988. Objective assessment of apple maturity based on starch location. *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers* **31**, 962–966.

Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P. 2003. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* **115**, 679–689.

Rienth M, Torregrosa L, Ardisson M, De Marchi R, Romieu C. 2014. Versatile and efficient RNA extraction protocol for grapevine berry tissue, suited for next generation RNA sequencing. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **20**, 247–254.

Rudell DR, Fellman JK, Mattheis JP. 2005. Preharvest Application of Methyl Jasmonate to ‘Fuji’ Apples Enhances Red Coloration and Affects Fruit Size, Splitting, and Bitter Pit Incidence. *HortScience* **40**, 1760–1762.

Rudell DR, Mattheis JP, Fan X, Fellman JK. 2002. Methyl Jasmonate Enhances Anthocyanin Accumulation and Modifies Production of Phenolics and Pigments in ‘Fuji’ Apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**, 435–441.

Saniewski M, Nowacki J, Lange E, Czapski J. 1988. The effect of methyl jasmonate on anthocyanin accumulation, ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in apples. *Fruit Sci. Rpt* **15**, 97–102.

Seymour G, Tucker GA, Poole M, Giovannoni J. 2013. *The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*. John Wiley & Sons.

Shafiq M, Singh Z, Khan AS. 2013. Time of methyl jasmonate application influences the development of ‘Cripps Pink’ apple fruit colour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**, 611–618.

Shan X, Zhang Y, Peng W, Wang Z, Xie D. 2009. Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3849–3860.

Song S, Qi T, Wasternack C, Xie D. 2014. Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene. *Current Opinion in Plant Biology* **21**, 112–119.

Soto A, Ruiz KB, Ziosi V, Costa G, Torrigiani P. 2012. Ethylene and auxin biosynthesis and signaling are impaired by methyl jasmonate leading to a transient slowing down of ripening in peach fruit. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1858–1865.

Smyth GK. 2005. Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R IR, Carey V, Dudoit S, (eds.) HW, eds. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. New York: Springer, 397–420.

Tacken EJ, Ireland HS, Wang Y-Y, Putterill J, Schaffer RJ. 2012. Apple EIN3 BINDING F-box 1 inhibits the activity of three apple EIN3-like transcription factors. *AoB Plants* **2012**, pls034.

Tan CK, Ali ZM, Zainal Z. 2012. Changes in ethylene production, carbohydrase activity and antioxidant status in pepper fruits during ripening. *Scientia Horticulturae* **142**, 23–31.

- Tian S, Qin G, Li B.** 2013. Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity. *Plant Molecular Biology* **82**, 593–602.
- Tong C, Krueger D, Vickers Z, Bedford D, Luby J, El-Shiekh A, Shackel K, Ahmadi H.** 1999. Comparison of Softening-related Changes during Storage of ‘Honeycrisp’ Apple, Its Parents, and ‘Delicious’. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **124**, 407–415.
- Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H.** 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6347–6353.
- Verdu CF, Childebrand N, Marnet N, Lebail G, Dupuis F, Laurens F, Guilet D, Guyot S.** 2014. Polyphenol variability in the fruits and juices of a cider apple progeny. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**, 1305–1314.
- Volz RK, Harker FR, Hallet IC, Lang A.** 2004. Development of texture in apple fruit - a biophysical perspective. *Acta horticulturae* **636**, 473-479.
- Wang Z, Ying T, Zhang Y, Bao B, Huang X.** 2006. Characteristics of transgenic tomatoes antisensed for the ethylene receptor genes LeETR1 and LeETR2. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **7**, 591–595.
- Wasternack C.** 2007. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* **100**, 681–697.
- Wasternack C, Hause B.** 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in. *Annals of Botany* **111**, 1021–1058.
- Yang Y, Wu Y, Pirrello J, Regad F, Bouzayen M, Deng W, Li Z.** 2010. Silencing Sl-EBF1 and Sl-EBF2 expression causes constitutive ethylene response phenotype, accelerated plant senescence, and fruit ripening in tomato. *Journal of Experimental Botany* **61**, 697–708.
- Zhou C, Zhang L, Duan J, Miki B, Wu K.** 2005. HISTONE DEACETYLASE19 Is Involved in Jasmonic Acid and Ethylene Signaling of Pathogen Response in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **17**, 1196–1204.
- Zhu Z.** 2014. Molecular basis for jasmonate and ethylene signal interactions in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5743–5748.
- Zhu Z, An F, Feng Y, et al.** 2011. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 12539–12544.
- Ziosi V, Bonghi C, Bregoli AM, Trainotti L, Biondi S, Sutthiwal S, Kondo S, Costa G, Torrigiani P.** 2008. Jasmonate-induced transcriptional changes suggest a negative interference with the ripening syndrome in peach fruit. *Journal of Experimental Botany* **59**, 563–573.

TABLES

Table 1 - Mealiness results after two months of cold storage for the 95 cultivars. “Expression analyses” specifies if transcriptomic analyses had been performed (y: yes and n: no). "Profil for selection" refers to the phenotypic classification used for the first cultivar selection. “Profil for analyses” refers to the classification used for transcriptome analyses.

	Id_Accession	Cultivar	harvest period	sensory analyses	CC test	Expression analyses	profil for selection	profil for analyses		Id_Accession	Cultivar	harvest period	sensory analyses	CC test	Expression analyses	profil for selection	
1	X0404	CAMUESA VERDE	late	1,0	0,03	y	1	NM		41	X0036	ROSE DE BENAUGE	late	1,0	0,10	n	1
2	X0849	PATUL	medium	1,0	0,04	y	1	NM		42	X0395	ALFRED JOLIBOIS	late	1,0	0,02	n	1
3	X0898	MARAND ROUGE	late	1,0	0,00	y	1	NM		43	X0710	PATTE DE LOUP	late	1,0	0,10	n	1
4	X0972	GOLDEN DELICIOUS	medium	1,0	0,59	y	1	NM		44	X1269	REALE D'ENTRAYGUES	late	1,0	0,10	n	1
5	X1556	REINETTE DE BREDA GRISE	medium	1,0	0,07	y	1	NM		45	X4616	TRELAGE	late	1,0	0,00	n	1
6	X2104	GELADE	late	1,0	0,02	y	1	NM		46	X4898	FRENCH CRAB	late	1,0	0,05	n	1
7	X2316	ROUGE DE CLARON	late	1,0	0,10	y	1	NM		47	X4915	RED DOUGHERTY	late	1,0	0,10	n	1
8	X2640	REINE DES REINETTES	medium	1,4	0,45	y	1	NM		48	X7358	PEPIN MEUNIER	late	1,0	0,09	n	1
9	X2656	JONATHAN	medium	1,3	0,30	y	1	NM		49	X8209	POMME DE SORE	late	1,0	0,07	n	1
10	X2998	DE L'ESTRE	late	1,0	0,07	y	1	NM		50	X8244	POUZARAQUE	medium	1,0	0,02	n	1
11	X4874	API ETOILE	medium	1,0	0,00	y	1	NM		51	X8249	REINETTE BLANCHE DE BEUSSANT	medium	1,0	0,02	n	1
12	X6208	REINETTE PARMENTIER	medium	1,0	0,19	y	1	NM		52	X8607	REINETTE D'HIVER	late	1,0	0,12	n	1
13	X7203	CABARETTE	late	1,0	0,10	y	1	NM		53	X8706	CALVILLE D'ULZEN	late	1,0	0,02	n	1
14	X8211	PERREGUE	medium	1,2	0,07	y	1	NM		54	X8743	REINETTE VAN BERK'S	late	1,0	0,24	n	1
15	X8223	PLATET	late	1,0	0,14	y	1	NM		55	X8212	ELIZON	late	1,3	0,08	n	1
16	X8238	CABANA SAGARRA	medium	1,0	0,59	y	1	NM		56	X8713	FENOUILLET DE RIBOURS	late	1,4	1,67	n	1
17	X8380	CABUSSE	late	1,0	0,14	y	1	NM		57	X0585	FAUROT	late	1,4	0,24	n	1
18	X8718	GAZERAU	late	1,0	0,00	y	1	NM		58	X0666	POMME CITRON	late	1,5	0,55	n	1
19	X8726	POMME ROYALE	medium	1,9	1,23	y	1	Md		59	X1095	FRANKLIN	medium	1,5	0,90	n	1
20	X8703	CALVILLE DE DOUE	medium	2,2	1,80	y	1	Md		60	X1314	GROS API	late	1,5	0,32	n	1
21	X0421	BELLE DE MAGNI	medium	3,3	2,05	y	2	Md		61	X1682	CHAILLEUX	late	1,5	0,12	n	1
22	X0599	POUZAC	medium	3,0	1,87	y	2	Md		62	X1894	ROMARIN BLANC	late	1,5	0,14	n	1
23	X1853	CHARLES ROSS	early	2,8	0,42	y	2	Md		63	X2949	BERAUD	late	1,5	0,35	n	1
24	X2437	ALKMENE	medium	3,2	2,34	y	2	Md		64	X4975	PILETTE	late	1,5	0,12	n	1
25	X2698	COURT PENDU PLAT	medium	3,0	1,02	y	2	Md		65	X7198	REINETTE DE CHAMPAGNE	late	1,5	0,40	n	1
26	X8694	BELLE DE FRANCE	late	3,0	1,39	y	2	Md		66	X8200	NEGU SAGARRA	late	1,5	0,22	n	1
27	X8698	BELLE-FILLE NORMANDE	medium	3,0	1,15	y	2	Md		67	X8232	BEAUSOLEIL	late	1,5	0,24	n	1
28	X1307	DIRECTEUR LESAGE	early	3,0	5,29	y	3	Md		68	X8247	REINETTE DE SEGUIN	medium	1,5	0,69	n	1
29	X2323	REINETTE DOREE	late	3,8	7,12	y	3	Md		69	X8390	FEUILLEMORTE	late	1,5	1,24	n	1
30	X8227	TROMPE GELEE	medium	3,3	2,94	y	3	Md		70	X8409	REINETTE DE MAURS	late	1,5	0,20	n	1
31	X8252	MERCIER	medium	3,7	4,27	y	3	Md		71	X8411	REINETTE SANGUINE DU RHIN	late	1,5	0,17	n	1
32	X8416	TRANSPARENT DE BOIS GUILLAUME	early	3,0	6,93	y	3	Md		72	X8693	BEBE ROSE	late	1,5	0,25	n	1
33	X8739	REINETTE DE RAFFRAY	late	2,7	2,89	y	3	Md		73	X8699	BELLE-FLEUR DE SAINT-BENOIT	medium	1,5	0,43	n	1
34	X1180	REINETTE DE MULTHAUP	late	4,0	2,69	y	2	M		74	X8725	POMME DE FEU (INDRE)	late	1,5	0,14	n	1
35	X2731	INGRID MARIE	medium	4,0	3,12	y	2	M		75	X8735	REINETTE DE LUCAS	late	1,5	1,39	n	1
36	X7200	TRANSPARENT BLANCHE	early	4,6	2,87	y	2	M		76	X8738	REINETTE DE PLUVIGNE	late	1,7	0,32	n	1
37	X8236	SAINT MICHEL	medium	4,1	2,42	y	2	M		77	X1206	CALVILLE DU ROI	medium	1,8	4,40	n	1
38	X8404	MICHOTTE	late	4,0	2,35	y	2	M		78	X8256	DE BONDE	medium	1,8	0,73	n	1
39	X0522	POMME D'ETE ROUGEUR DE PECHE	early	4,0	8,18	y	3	M		79	X8405	NONPAREIL	medium	1,8	1,70	n	1
40	X8233	PETITE MADELEINE	early	4,3	9,52	y	3	M		80	X1071	REINETTE DE CAUX	late	2,0	0,45	n	1
										81	X1552	REINETTE DANIEL	medium	2,0	0,50	n	1
										82	X1646	SAINT GERMAIN	early	2,0	0,45	n	1
										83	X8246	GUEULE DE MOUTON	late	2,0	0,35	n	1
										84	X8746	ROSE ROUGE	late	2,0	0,32	n	1
										85	X8748	ROUGET	medium	2,2	2,97	n	1
										86	X1349	ROXBURY RUSSET	medium	2,3	1,25	n	2
										87	X8398	MARGIL	medium	2,5	0,67	n	2
										88	X8692	BARRAUDE	late	2,5	1,00	n	2
										89	X6920	LA PAIX	medium	2,6	0,72	n	2
										90	X7199	ROSE DE BERNE	medium	2,8	1,65	n	2
										91	X0048	BOROWITSKY	early	2,5	3,50	n	3
										92	X6194	BARBE	late	2,8	2,75	n	3
										93	X8414	ROUGET	medium	2,8	6,14	n	3
										94	X8224	CACHAO SAGARRA	medium	3,3	2,32	n	3
										95	X1363	CALVILLE D'AOUT	early	5,0	4,57	n	3

Table 2 - List of identified genes and their functional annotations.

	Seq.Id	Sense	Spec	Annotation	Pathway	means1	means2	means3	KW results		Ratio
									Pvalue	KW groups	
1	MDP0000261538_r	S	1	HDA19	jasmonates signaling	5,49	4,83	3,84	0,00011	abc	-1,65
2	MDP0000277815_r	S	2	COI1	jasmonates signaling	4,11	3,29	2,66	0,00015	abc	-1,46
3	MDP0000548790_r	S	4	LOX	jasmonates biosynthesis	5,47	4,23	3,76	0,00682	abb	-1,71
4	MDP0000186231_r	S	2	OPR3	jasmonates biosynthesis	3,08	3,03	2,18	0,03162	aab	-0,90
5	MDP0000552191_r	S	2	ACX1	jasmonates biosynthesis	2,80	2,03	1,37	0,00169	abc	-1,43
6	MDP0000193700_r	S	4	JAR1	jasmonates signaling	5,66	4,98	4,25	0,02297	abb	-1,41
7	MDP0000233483_r	S	4	JAR1	jasmonates signaling	6,12	5,44	4,74	0,02689	abb	-1,38
8	MDP0000122830_r	S	2	C4H	Phenylpropanoid synthesis	3,63	3,57	2,17	0,00669	aab	-1,45
9	MDP0000876184_r	S	1	C4H	Phenylpropanoid synthesis	2,88	2,36	1,55	0,00801	aab	-1,33
10	MDP0000293578_r	S	1	4CL	Phenylpropanoid synthesis	2,99	2,81	1,54	0,00566	aab	-1,45
11	MDP0000317962_r	S	1	4CL	Phenylpropanoid synthesis	5,49	4,62	4,55	0,00581	abb	-0,94
12	MDP0000575740_r	S	2	CHS	Flavonoid pathway	2,14	1,78	1,13	0,05157	aabb	-1,01
13	MDP0000805105_r	S	2	anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase	Flavonoid pathway	5,50	4,98	3,71	0,00034	abc	-1,79
14	MDP0000171929	AS	4	isoflavone reductase	Flavonoid pathway	3,10	2,81	1,30	0,01456	aab	-1,80
15	MDP0000376285	AS	4	isoflavone reductase	Flavonoid pathway	3,06	2,84	1,44	0,02349	aab	-1,62
16	MDP0000250254_r	S	1	ACS	ethylene biosynthesis	1,92	1,99	2,94	0,00727	abb	1,03
17	MDP0000219737_r	S	4	ETR2	ethylene biosynthesis	5,87	5,13	5,03	0,00056	abb	-0,84
18	MDP0000165656_r	S	2	EBF102	ethylene biosynthesis	5,10	4,48	4,17	0,00324	abb	-0,93
19	MDP0000539270_r	S	3	PL	Cell wall-related genes	2,34	2,37	3,34	0,00422	bba	1,00
20	MDP0000426154_r	S	4	WAKL	Cell wall-related genes	1,53	1,16	2,97	0,00690	abb	1,44
21	MDP0000621927_r	S	1	PME	Cell wall-related genes	4,96	5,54	5,88	0,00660	aab	0,92
22	MDP0000169942	AS	1	WAK5	Signalisation	2,79	2,15	0,52	0,00722	aab	-2,27
23	MDP0000306850_r	S	1	cpk6	turgor pressure	6,72	6,24	5,63	0,00687	abb	-1,09

Additional file S1 - List of all phenotypic traits analyzed at H and 60DAH.

Sensory traits at H

crispiness
firmness
juiciness
melting
graininess
fibers
mealiness

Morphological traits at H

Longueur du fruit
Position du diamètre maximum
Profondeur de la cuvette oculaire
Profondeur de la cavité sous oculaire
Longueur du cœur
Longueur de la cavité centrale
Largeur de la cavité centrale
Longueur des faisceaux post-pédonculaires
Longueur du pédoncule
Profondeur de la cuvette pédonculaire
Largeur de la cuvette oculaire
Largeur de l'œil
Largeur du fruit
Largeur du cœur
Largeur de la cuvette pédonculaire
Largeur du pédoncule
Longueur des loges
Largeur des loges
Longueur des sépales
Longueur des pépins
Largeur des pépins

Mealiness at 60 DAH

mealiness_60DAH
Cell_μl

Additional file S3 – 643 selected genes based on kruskal-wallis results (P-value < 0.01). Number associated with “means” refers to 1 = NM, 2 = Md, 3 = M. KW profil refers to the statistical differences between each phenotypic class (respectively NM, Md, M). "Ratio 3-1" refers to the mean difference between NM and M apples (M-NM). "Sense" refers to sense or anti-sense probes.

Seqid	means1	means2	means3	KW results		Ratio 3-1	Sense	Spec	Id.TAIR	Functional annotation	
				Pvalue	KW groups						
1	MDP0000140294_r	5,73	4,63	2,79	0,0002	abc	-2,94	S	2	AT5G54960	PDC2 (PYRUVATE DECARBOXYLASE-2); pyruvate decarboxylase
2	MDP0000299766_r	6,58	5,68	3,65	0,002	aab	-2,94	S	4	AT5G23880	CPSF100 (ENHANCED SILENCING PHENOTYPE 5)
3	MDP0000267614_r	6,44	5,49	3,51	0,0017	aab	-2,92	S	4	AT1G64940	.
4	MDP0000287416_r	5,14	4,13	2,41	0,0005	abc	-2,73	S	1	AT5G54960	PDC2 (PYRUVATE DECARBOXYLASE-2); pyruvate decarboxylase
5	MDP0000398616_r	3,38	2,42	0,74	0,0009	abc	-2,64	S	1	AT1G64940	.
6	MDP0000288715_r	4,80	4,24	2,17	0,0009	aab	-2,63	S	2	AT3G16520	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
7	MDP0000686885_r	6,15	5,32	3,56	0,0009	abc	-2,59	S	1	AT2G24580	sarcosine oxidase family protein
8	MDP0000546593_r	4,85	4,10	2,40	0,0025	aab	-2,45	S	1	AT1G64940	.
9	MDP0000276541_r	7,13	5,99	4,70	0,0002	abc	-2,42	S	1	AT1G71110	unknown protein
10	MDP0000895476_r	4,22	3,31	1,81	0,0013	abc	-2,41	S	1	AT1G64940	.
11	MDP0000156753_r	4,08	2,55	1,73	6,52E-05	abb	-2,35	S	2	AT5G49900	unknown protein
12	MDP0000213291_r	4,69	3,90	2,34	0,0006	abc	-2,35	S	4	AT4G02500	ATXT2; UDP-xylosyltransferase/ transferase/ transferase
13	MDP0000628100_r	4,73	3,96	2,39	0,0006	abc	-2,34	S	4	AT4G02500	ATXT2; UDP-xylosyltransferase/ transferase/ transferase
14	MDP0000272284_r	4,65	3,94	2,31	0,0031	aab	-2,34	S	2	AT5G54960	PDC2 (PYRUVATE DECARBOXYLASE-2); pyruvate decarboxylase
15	MDP0000781878_r	6,05	4,71	3,75	0,0001	abb	-2,30	S	3	AT4G05160	4-coumarate-CoA ligase, putative / 4-coumaroyl-CoA synthase, putative
16	MDP0000266665_r	4,43	3,21	2,14	3,93E-05	abc	-2,29	S	1	AT5G02500	HSC70-1 (heat shock cognate 70 kDa protein 1); ATP binding
17	MDP0000169942	2,79	2,15	0,52	0,0072	aab	-2,27	AS	1	AT1G21230	WAK5 (WALL ASSOCIATED KINASE 5); kinase/ protein serine/threonine kinase
18	MDP0000219282_r	5,47	4,86	3,20	0,0004	abc	-2,27	S	4	AT3G16520	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
19	MDP0000512420_r	4,30	3,56	2,04	0,0006	abc	-2,25	S	4	AT4G02500	ATXT2; UDP-xylosyltransferase/ transferase/ transferase
20	MDP0000628100	5,61	5,15	3,40	0,0008	aab	-2,21	AS	4	AT4G02500	ATXT2; UDP-xylosyltransferase/ transferase/ transferase
21	MDP0000224713_r	5,38	4,37	3,18	0,0006	abc	-2,20	S	1	AT5G01810	CIPK15 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 15); kinase
22	MDP0000922614_r	3,86	3,09	1,67	0,001	abc	-2,19	S	2	AT5G54960	PDC2 (PYRUVATE DECARBOXYLASE-2); pyruvate decarboxylase
23	MDP0000307691_r	3,83	1,91	1,64	7,42E-05	abb	-2,18	S	4	AT3G16150	L-asparaginase, putative / L-asparagine amidohydrolase, putative
24	MDP0000213291	5,21	4,81	3,06	0,0011	aab	-2,16	AS	4	AT4G02500	ATXT2; UDP-xylosyltransferase/ transferase/ transferase
25	MDP0000512420	5,51	5,06	3,37	0,0011	aab	-2,15	AS	4	AT4G02500	ATXT2; UDP-xylosyltransferase/ transferase/ transferase
26	MDP0000052862_r	5,16	4,55	3,04	0,0009	abc	-2,11	S	4	AT3G16520	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
27	MDP0000277672_r	5,32	4,14	3,21	0,0002	abc	-2,11	S	2	AT4G30960	CIPK6 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 6); kinase
28	MDP0000897255_r	4,25	3,58	2,15	0,0003	abc	-2,09	S	2	AT1G20080	C2 domain-containing protein
29	MDP0000123354_r	4,62	3,52	2,53	0,0008	abb	-2,09	S	1	AT3G46970	ATPHS2/PHS2 (ALPHA-GLUCAN PHOSPHORYLASE 2)
30	MDP0000193270_r	8,35	7,70	6,26	0,0007	abc	-2,08	S	2	AT5G01810	CIPK15 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 15); kinase
31	MDP0000951961_r	3,88	3,08	1,80	0,0013	abc	-2,08	S	1	AT1G10760	SEX1 (STARCH EXCESS 1)
32	MDP0000481989_r	5,46	5,77	3,38	0,0015	aab	-2,08	S	1	AT1G42430	unknown protein
33	MDP0000361449_r	4,78	4,21	2,70	0,0008	aab	-2,08	S	4	AT3G16520	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
34	MDP0000685413_r	5,97	4,92	3,90	0,0002	abc	-2,08	S	4	AT5G01810	CIPK15 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 15); kinase
35	MDP0000231050_r	6,62	5,49	4,54	0,0002	abc	-2,07	S	1	AT3G61580	delta-8 sphingolipid desaturase (SLD1)
36	MDP0000184960_r	4,33	3,30	2,26	0,0011	abc	-2,06	S	2	AT2G20190	CLIP-associating protein (CLASP) -related
37	MDP0000501238_r	4,95	3,94	2,90	0,0017	abb	-2,04	S	3	AT4G33070	pyruvate decarboxylase, putative
38	MDP0000235673_r	3,40	2,20	1,37	0,0001	abc	-2,03	S	4	AT4G24040	ATTRE1 (TREHALASE 1); trehalase
39	MDP0000286104_r	6,36	5,37	4,34	0,0002	abc	-2,02	S	4	AT5G01810	CIPK15 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 15); kinase
40	MDP0000128045_r	3,52	2,44	1,52	0,0007	abc	-2,00	S	2	AT5G49900	unknown protein
41	MDP0000688415_r	4,49	3,95	2,50	0,0019	aab	-1,99	S	4	AT3G16520	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
42	MDP0000162391	6,21	5,62	4,22	0,0001	abc	-1,99	AS	1		
43	MDP0000375160_r	4,54	3,99	2,56	0,0018	aab	-1,98	S	4	AT3G16520	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
44	MDP0000262412_r	3,75	2,59	1,80	4,74E-05	abc	-1,95	S	1	AT4G02440	EID1 (EMPFINDLICHER IM DUNKELROTEN LICHT 1)
45	MDP0000145690_r	5,17	4,62	3,24	0,0018	abc	-1,94	S	1		
46	MDP0000315187_r	3,18	1,98	1,26	0,0002	abb	-1,92	S	4	AT4G24040	ATTRE1 (TREHALASE 1); trehalase
47	MDP0000165487_r	6,18	5,45	4,26	0,0022	abc	-1,92	S	3	AT3G08590	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative
48	MDP0000688712_r	5,99	5,36	4,08	0,0015	abc	-1,91	S	4		
49	MDP0000686885	4,36	4,14	2,46	0,0057	aab	-1,90	AS	1	AT2G24580	sarcosine oxidase family protein
50	MDP0000181169	3,62	3,18	1,73	0,0009	aab	-1,88	AS	2	AT4G33070	pyruvate decarboxylase, putative
51	MDP0000692823_r	4,24	3,88	2,36	0,0004	aab	-1,88	S	4	AT5G50420	unknown protein
52	MDP0000218246_r	3,59	3,05	1,74	0,0017	aab	-1,85	S	4	AT5G40610	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) / GPDH
53	MDP0000297771_r	3,67	2,68	1,83	2,34E-05	abc	-1,85	S	2	AT3G59970	MTHFR1 (METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE 1)
54	MDP0000482268_r	4,23	3,33	2,39	0,0064	abb	-1,84	S	4	AT3G12110	ACT11 (ACTIN-11); structural constituent of cytoskeleton
55	MDP0000854922_r	4,88	4,55	3,05	0,0029	aab	-1,83	S	2	AT2G26110	unknown protein
56	MDP0000214692_r	4,26	4,13	2,43	0,0015	aab	-1,83	S	4	B5TXD2_PRUPI	Lipoxygenase
57	MDP0000197017_r	3,85	3,27	2,04	0,0007	abc	-1,81	S	2	AT1G47128	cysteine proteinase (RD21A) / thiol protease
58	MDP0000210303_r	3,20	2,59	1,40	0,0004	abc	-1,81	S	2	AT2G30520	RPT2 (ROOT PHOTOTROPISM 2)
59	MDP0000277672	5,47	4,93	3,67	0,0033	aab	-1,80	AS	2	AT4G30960	CIPK6 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 6); kinase
60	MDP0000805105_r	5,50	4,98	3,71	0,0003	abc	-1,79	S	2	AT5G26310	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
61	MDP0000146571_r	4,28	4,56	2,50	0,0031	aab	-1,79	S	2		
62	MDP0000302198_r	6,89	6,22	5,11	0,0004	abc	-1,78	S	2	AT4G27720	unknown protein
63	MDP0000175141_r	5,11	3,94	3,34	0,0007	abb	-1,78	S	2	AT5G49900	unknown protein
64	MDP0000287321_r	3,62	3,27	1,84	0,0014	aab	-1,77	S	2	AT5G41920	scarecrow transcription factor family protein
65	MDP0000212857_r	3,89	3,90	2,12	0,002	aab	-1,77	S	4	B5TXD2_PRUPI	Lipoxygenase
66	MDP0000276541	3,67	2,93	1,91	0,0007	abc	-1,77	AS	1	AT1G71110	unknown protein
67	MDP0000251652_r	3,37	3,06	1,62	0,0022	aab	-1,75	S	2		
68	MDP0000170162_r	3,58	2,85	1,83	0,0027	abc	-1,75	S	2	AT3G16520	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
69	MDP0000186363_r	3,96	3,94	2,21	0,002	aab	-1,75	S	4	B5TXD2_PRUPI	Lipoxygenase

Chapitre III : Les jasmonates contrôlent la farinosité

	Seq.id	means1	means2	means3	KW results		Ratio 3-1	Sense	Spec	Id.TAIR	Functional annotation
					Pvalue	KW groups					
610	MDP0000534808_r	1,08	0,96	2,12	0,0008	bba	1,04	S	4	AT5G18370	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative
611	MDP0000143585_r	4,01	3,94	5,07	0,0026	bba	1,06	S	2	AT3G07050	GTP-binding family protein
612	MDP0000308711_r	2,35	2,56	3,42	0,0055	bba	1,07	S	4		
613	MDP0000349364_r	2,37	2,41	3,45	0,0012	bba	1,07	S	1		
614	MDP0000189013_r	3,46	3,54	4,54	0,0027	bba	1,08	S	4	AT1G56300	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
615	MDP0000562306_r	1,34	1,57	2,45	0,0062	bba	1,11	S	1	AT5G66860	unknown protein
616	MDP0000190008_r	3,48	3,62	4,60	0,0022	bba	1,12	S	2	AT1G23100	10 kDa chaperonin, putative
617	MDP0000655277_r	0,91	1,18	2,04	0,0069	bba	1,13	S	3	AT5G64040	PSAN (photosystem I reaction center subunit PSI-N); calmodulin binding
618	MDP0000123555_r	2,88	3,02	4,02	0,0019	bba	1,14	S	4	AT2G35900	unknown protein
619	MDP0000296063_r	2,41	2,29	3,57	0,005	bba	1,15	S	1	AT3G26890	unknown protein
620	MDP0000312143_r	5,17	5,29	6,33	0,0017	bba	1,15	S	1	AT5G54730	AtATG18f (Arabidopsis thaliana homolog of yeast autophagy 18 (ATG18) f)
621	MDP0000287645_r	1,80	1,46	2,96	0,0014	bba	1,15	S	2	AT2G39260	RNA binding
622	MDP0000136922_r	1,32	1,15	2,51	0,001	bba	1,19	S	2	AT5G04040	SDP1 (SUGAR-DEPENDENT1); triacylglycerol lipase
623	MDP0000719275_r	3,65	3,88	4,85	0,0072	bba	1,21	S	1	AT3G49240	EMB1796 (EMBRYO DEFECTIVE 1796); binding
624	MDP0000335727_r	1,52	1,54	2,73	0,005	bba	1,21	S	1		
625	MDP0000548607_r	0,69	1,16	1,89	0,0011	cba	1,21	S	3	AT4G23240	protein kinase family protein
626	MDP0000135482_r	1,66	2,25	2,92	0,0021	baa	1,26	S	4	AT3G29310	calmodulin-binding protein-related
627	MDP0000897915_r	1,89	1,78	3,17	0,0035	bba	1,28	S	4	AT5G04040	SDP1 (SUGAR-DEPENDENT1); triacylglycerol lipase
628	MDP0000148887_r	4,99	5,40	6,35	0,0008	cba	1,36	S	1	AT1G43890	ATRAB18 (Arabidopsis Rab GTPase homolog C1)
629	MDP0000320796_r	0,89	1,07	2,29	0,0072	bba	1,40	S	1	AT2G34410	O-acetyltransferase, LHB1B2 (Photosystem II light harvesting complex gene 1.5); chloro
630	MDP0000426154_r	1,53	1,16	2,97	0,0069	bba	1,44	S	4	AT1G16150	WAKL4 (WALL ASSOCIATED KINASE-LIKE 4); kinase
631	MDP0000612208_r	0,54	0,92	1,98	0,0022	cba	1,44	S	1	AT5G46330	FLS2 (FLAGELLIN-SENSITIVE 2); ATP binding / kinase / protein binding / protein serine/thr
632	MDP0000899816_r	3,99	4,09	5,49	0,0029	bba	1,50	S	1	AT2G46680	ATHB-7 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 7)
633	MDP0000282203_r	1,89	2,53	3,43	0,0016	cba	1,54	S	1	AT2G30900	unknown protein
634	MDP0000289391_r	1,49	1,38	3,05	0,0053	bba	1,56	AS	1	AT2G24960	DNA binding
635	MDP0000137271_r	2,23	2,77	3,84	0,0048	bba	1,61	S	2	AT5G64040	PSAN (photosystem I reaction center subunit PSI-N); calmodulin binding
636	MDP0000145361_r	2,03	3,20	3,64	0,0002	baa	1,61	S	1		
637	MDP0000357690_r	1,27	1,84	2,88	0,0022	cba	1,61	AS	1		
638	MDP0000153378_r	3,00	3,56	4,69	0,0006	cba	1,69	S	1	AT2G24390	unknown protein
639	MDP0000130023_r	4,64	4,81	6,36	0,0022	bba	1,72	S	2		
640	MDP0000349171_r	4,09	5,27	6,07	0,0011	baa	1,98	S	1		
641	MDP0000141372_r	0,52	1,35	2,77	0,0014	cba	2,25	AS	2	AT5G41770	crooked neck protein, putative / cell cycle protein, putative
642	MDP0000223355_r	1,28	1,32	3,77	0,0007	bba	2,49	S	2	AT1G11340	S-locus lectin protein kinase family protein
643	MDP0000736915_r	0,20	0,61	3,32	0,0064	bba	3,12	S	1	AT5G36930	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative

CHAPITRE IV

Discussion Générale

Ce chapitre reprend les principaux points de discussion abordés au cours des chapitres précédents. Une première discussion sera axée sur le développement d'un nouveau test de phénotypage de la farinosité et les limites rencontrées. Une deuxième discussion s'attachera à proposer une nouvelle définition de la farinosité. Une troisième partie portera sur les mécanismes moléculaires associés à la farinosité. La difficulté à trouver des marqueurs moléculaires de la farinosité, malgré un processus de maturation commun aux individus, sera discutée. Le rôle éventuel des ARNs anti-sens au cours de la maturation de la pomme sera également évoqué. Une dernière partie s'attachera à discuter les limites de notre approche.

1 Evaluation quantitative de la farinosité

Le test développé au cours de cette thèse a pour but de quantifier la farinosité. Il repose sur les propriétés physiologiques associées à la farinosité. Les pommes farineuses présentent une dégradation importante de la lamelle moyenne, conduisant à une séparation des cellules lorsqu'une force y est appliquée. Ainsi, le test de cohésion cellulaire consiste à mélanger un fragment de parenchyme de pomme dans une solution aqueuse et à dénombrer le nombre de cellules isolées. Ce test s'est avéré efficace avec les premiers échantillons testés en 2011 et 2012 (résultats présentés dans le chapitre II). Dix génotypes différents avaient été utilisés. Ces génotypes présentaient principalement des phénotypes très contrastés pour la farinosité. Cependant, une fois élargi à un nombre conséquent de cultivars (les 95 cultivars de la core-collection), ce test s'est avéré moins efficace pour prédire des degrés de farinosité intermédiaires. Une première limite technique peut être associée à un manque de coloration des cellules de certains échantillons. En effet, quelque soit la quantité de colorant ajoutée, certains génotypes présentaient toujours une coloration très faible. Le comptage alors réalisé à l'aide du logiciel ImageJ est probablement sous-évalué. Une seconde limite repose sur l'hypothèse retenue qui est de ne considérer que les cellules isolées qui résultent d'une dégradation importante de la lamelle moyenne. Lors de l'application de ce test, on se rend compte que les cellules peuvent soit être isolées indépendamment, soit en amas cellulaires. Ces amas n'ont pas été pris en compte dans l'analyse car ils ne traduisent pas une dégradation importante de la lamelle moyenne des cellules. Cependant, il n'est pas exclu que ces amas aient un rôle notable dans la sensation de farinosité et que leur prise en compte permettrait une corrélation plus fine avec la farinosité.

Par ailleurs, le temps nécessaire à l'analyse d'un échantillon avec le test de cohésion cellulaire peut s'avérer contraignant par rapport à l'analyse sensorielle. Le temps passé pour réaliser le test de cohésion cellulaire comprend la préparation de l'échantillon, les deux minutes de vortex, le montage entre lame et lamelle, la prise de photos sous la loupe binoculaire puis l'analyse d'image. Ce test permet malgré tout l'analyse de plus de 50 génotypes par jour (avec au moins 2 répétitions techniques par génotype). A l'inverse, l'analyse sensorielle donne un résultat immédiat mais accapare 4 personnes quotidiennement, et le nombre d'échantillons analysés par jour est généralement limité à une vingtaine. De plus, l'analyse sensorielle reste une analyse subjective malgré la formation des dégustateurs. Un biais peut s'insinuer dans les

résultats en fonction du « palais » des dégustateurs, lié par exemple aux échantillons dégustés (*e.g.* très acide).

Enfin, le test de cohésion cellulaire s'avère à ce jour efficace pour différencier les échantillons farineux des non farineux. Ceci constitue un atout indispensable pour le développement de nouvelles méthodes de validation reposant sur des approches de type pharmacologique. L'application de méthyl jasmonate sur des pommes permettrait par exemple de valider la voie des jasmonates, à condition que le phénotype puisse alors être évalué autrement que par des analyses sensorielles. De plus, le nombre d'échantillons analysables par jour et l'absence de subjectivité présentent également un intérêt en sélection ou en production, dans une optique de « sélection négative » ou de classification rapide. Par exemple, le criblage d'un grand nombre d'échantillons permet d'éliminer facilement et rapidement les individus farineux, déclassés dans les programmes d'amélioration.

2 Une nouvelle définition de la farinosité

L'ensemble de la communauté scientifique travaillant sur la qualité de la pomme s'accorde à définir la farinosité comme un phénotype caractéristique décrivant des fruits ayant une texture granuleuse et peu juteuse. En parallèle, de nombreuses études portent sur le « softening » qui ne fait normalement référence qu'à la perte de fermeté en cours de conservation. Cependant, les observations microscopiques de ces deux phénotypes révèlent deux phénotypes histologiques très similaires, à savoir des cellules de parenchyme qui sont plus rondes et qui ne sont pas éclatées (Harker et Hallett, 1992; Ng *et al.*, 2013). Ainsi, les deux phénotypes sont clairement distincts d'un point de vue sensoriel, mais rarement d'un point de vue microscopique. Ce premier constat souligne une frontière parfois floue entre ces deux phénotypes. Ceci nous amène alors à la question suivante : « Est-ce que la farinosité est une phase de développement ultime ou peut-on la qualifier de défaut physiologique post-récolte ? ». Malgré tout, des différences variétales existent, ce qui souligne un contrôle génétique de ce caractère.

2.1 La maturation, un processus à deux vitesses

Au cours du chapitre II, nous avons montré que la différence de farinosité entre les hybrides IM est associée à une perte de fermeté rapide chez les individus farineux en cours de conservation ; elle n'est en revanche pas corrélée à la fermeté absolue. Nous avons également validé le phénotype histologique des pommes farineuses. Ainsi, la vitesse de maturation des fruits en cours de conservation semble un facteur important conduisant à une séparation des cellules au niveau de la lamelle moyenne. Iwanami et coll. (2005) identifient plusieurs profils de ramollissement basés sur la perte de fermeté et sur le développement de la farinosité. Cette étude confirme également un lien entre la perte de fermeté rapide et le développement de la farinosité. Ces résultats supportent l'hypothèse d'une différence de vitesse de maturation entre les groupes étudiés.

Par ailleurs, les études transcriptomiques présentées dans ce mémoire constituent les premières études publiées à ce jour sur la farinosité de la pomme. Deux constats majeurs en découlent. D'une part, très peu de gènes différentiellement exprimés sont sur-exprimés chez les individus farineux par rapport aux non farineux, en regard du nombre de gènes sous-

exprimés. D'autre part, aucune voie métabolique particulière n'a pu être identifiée comme activée chez les individus farineux. Ainsi, la farinosité ne semble pas résulter de l'activation d'un processus biologique spécifique, mais plutôt de l'inactivation de certains processus. On notera également que la sous-expression des gènes ne résulte pas d'une baisse générale de l'activité cellulaire chez les individus farineux. Cette hypothèse est écartée de par l'absence de différence entre les rendements d'extraction d'ARN des individus farineux et non-farineux et de par l'absence de différence sur l'ensemble des gènes associés au métabolisme primaire aux stades analysés. La pomme farineuse présente donc toujours une activité métabolique.

De plus, le modèle de régulation génique proposé dans ce mémoire repose en partie sur la mise en place de voies métaboliques ayant pour but de contrer le stress oxydatif subi par les cellules en cours de conservation. La mise en place de ces mécanismes permettrait alors un retard du vieillissement cellulaire, autrement dit le maintien de l'état du parenchyme et de la qualité texturale associée. Il serait intéressant de réaliser une étude cinétique du transcriptome des pommes farineuses pour vérifier notre hypothèse reposant sur une différence de vitesse de maturation. Il serait alors possible de vérifier si ces mécanismes sont absents chez les individus farineux ou s'ils se mettent en place plus précocement. Dans tous les cas, l'ensemble des résultats réfute l'hypothèse soutenant que la farinosité est un défaut physiologique.

2.2 Maturation ou sénescence

Les mécanismes de défense vis-à-vis des stress oxydatifs sont souvent associés à l'établissement de la sénescence. Or, la sénescence a été décrite par Sacher en 1973 comme étant l'état final d'un organe soumis à une série d'événements irréversibles qui entraînent la dégradation cellulaire et ainsi la mort de l'organe. Les différences d'expression de ces voies métaboliques chez les individus farineux supposeraient soit l'absence de mécanisme de défense expliquant une dégradation rapide des cellules, soit l'inactivation de ces mécanismes. Dans ce dernier cas, la farinosité apparaît alors comme un état transitoire avant la pourriture du fruit. Peut-on alors parler de sénescence ?

Le terme de sénescence dans le cas des fruits charnus pose souvent question. La sénescence est décrite, au même titre que la maturation des fruits, comme un ensemble de processus irréversibles impliquant notamment une importante désorganisation de la paroi cellulaire.

Cependant, l'importance des processus métaboliques se déroulant au cours de la maturation des fruits (conversion de l'amidon en sucres simples, production de composés volatils...) tend à la dissociation de ces deux processus, alors présentés comme deux phases successives dans la maturation des fruits charnus (Gapper *et al.*, 2013). Une récente étude s'est intéressée à comparer les programmes moléculaires mis en jeu au cours de la sénescence des fruits secs déhiscent (*Arabidopsis*) et au cours des phases de maturation et de sur-maturation des fruits charnus (tomate) (Gómez *et al.*, 2014). Ils ont démontré que les deux types de fruits présentent plusieurs processus biologiques communs, indépendants du stade de maturité de la tomate, soulignant une forte similitude entre les programmes de sénescence des fruits secs et de maturation des fruits charnus. Malgré tout, quelques processus ne sont communs qu'entre les stades de sénescence d'*Arabidopsis* et de maturation de la tomate, à savoir les processus associés à la sénescence, à la régulation négative des programmes de mort cellulaire et à la régulation positive de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Les différentes classes identifiées au cours de cette étude présentent une forte analogie avec nos propres résultats. Les pommes non-farineuses se caractérisent également par la mise en place de processus contribuant à retarder le vieillissement cellulaire ; les pommes farineuses rappellent le stade de sur-maturité des tomates. Cette analogie renforce notre hypothèse associant la farinosité comme le stade ultime des pommes avant pourriture. Cependant, cela souligne également la distinction entre la sénescence et la farinosité, le processus de sénescence semblant correspondre à l'ensemble du processus de maturation des fruits charnus.

2.3 Proposition d'une nouvelle définition de la « farinosité »

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de préciser la définition de la farinosité qui apparaît comme « l'étape ultime de maturation de la pomme résultant d'un processus de maturation accéléré, conduisant à une désorganisation rapide de la paroi végétale, se traduisant par le phénotype sensoriel et histologique connu jusqu'alors ».

La maturation de la pomme est associée à une déshydratation impliquant des modifications de la pression de turgescence du fruit pouvant induire des modifications pariétales et texturales. Ainsi, des pommes mûrissant lentement se verront plus affectées par la déshydratation, ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi la sensation farineuse n'est pas perçue pour toutes les variétés. Cependant, de plus amples investigations seront nécessaires pour vérifier ces hypothèses.

3 Nouveau contour moléculaire de la farinosité

3.1 Les gènes de paroi, un rôle sur-estimé ?

Les modifications pariétales constituent un des processus majeurs associé aux changements texturaux lors de la maturation des fruits charnus. Cependant, peu de gènes impliqués dans le remodelage de la paroi ont été identifiés au cours de ces deux études. Un gène codant pour une pectine méthylestérase, *MdPME2*, a été identifié dans le fond génétique de la famille IM et contribue à la cohésion cellulaire chez les individus non farineux. Toutefois, *MdPME2* ne présente pas un profil d'expression pertinent dans la core-collection, rapprochant ainsi son rôle d'un contexte génétique donné. Inversement, les gènes de paroi identifiés dans la core-collection n'étaient pas différenciellement exprimés dans la première étude. L'ensemble de ces résultats appuient le constat récemment réalisé par Karlova et coll. (2014), soulignant le fait que les modifications pariétales impliquées dans la maturation des fruits charnus ne peuvent se résumer à l'action d'un seul et unique gène. En effet, il s'agit d'un processus impliquant l'expression coordonnée d'un grand nombre de gènes de paroi, évalué à plus de 50 dans le cas du développement de la tomate (Tomato Genome Consortium, 2012). Par ailleurs, chaque famille enzymatique comprend de nombreuses isoformes, ajoutant un degré de complexité aux mécanismes de régulation des modifications pariétales. Par exemple, nous avons identifié 60 gènes codants pour des PME chez le pommier. Bien que peu de gènes codant pour des PME soient exprimés dans le fond génétique de la famille IM, il n'est pas dit que ce soient les mêmes PME qui soient actives dans un autre fond génétique, comme le laissent supposer les résultats obtenus à partir de la core-collection. L'expression des différentes isoformes est souvent organe-spécifique ou en réponse à un stress particulier et peut parfois présenter des redondances de fonctionnalités (Pelloux *et al.*, 2007). Ceci peut expliquer en partie la difficulté à identifier un transcrite en particulier. Ainsi, les gènes de paroi ne semblent pas être les déterminants de la farinosité et l'identification des gènes régulateurs mis en jeu présente un intérêt grandissant.

3.2 Les jasmonates, nouvel acteur majeur de la maturation ?

L'étude transcriptomique réalisée sur la core-collection a permis de proposer un modèle moléculaire contribuant à la régulation fine de la maturation des pommes et qui contribuerait

à ralentir le processus de maturation. Dans ce modèle, un rôle central est accordé aux jasmonates qui apparaissent comme un « chef d'orchestre » de la maturation. En effet, il semblerait que les jasmonates permettent de réduire le stress oxydatif, en régulant l'accumulation des ROS, et en induisant la synthèse de flavonoïdes. Ils permettraient également de réguler la voie de biosynthèse de l'éthylène. On peut alors se demander « comment a-t-on pu passer à côté de ce mécanisme s'il présente un rôle si important ? »

Les études moléculaires réalisées à ce jour portent principalement sur le « softening » que l'on propose être un stade précédent la farineuxité. Dans un premier temps, cette étude constitue la première étude globale du transcriptome de pommier à considérer la maturation de la pomme en cours de conservation. Cette étude représente également la première étude à s'intéresser au transcriptome de pommes farineuses. Ainsi, le problème n'avait jamais été abordé sous cet angle. La comparaison des pommes farineuses - non farineuses a permis de cibler deux phénotypes extrêmes, probablement plus tranchés que la comparaison non farineux – « soft ». Ainsi, cette approche nous a permis de mettre en exergue les différences majeures entre les pommes farineuses et non farineuses, qui semblent correspondre au stade de maturation et de sur-maturité de la tomate. Ces différences reposent sur des mécanismes qui permettent de réguler finement la vitesse de maturation. Ainsi, ce phénotype fait réponse à de faibles différences d'expression génique, ce qui expliquerait principalement pourquoi il n'a jamais été identifié. Cependant, il est nécessaire de compléter cette analyse par d'autres approches afin de valider nos résultats sur le plan fonctionnel.

3.3 L'importance des mécanismes post-transcriptionnels

Il est important de mentionner qu'au cours des deux analyses conduites, un nombre important de transcrits antisens sont dérégulés entre les individus farineux et non farineux. Celton, Gaillard et coll. (2014) ont récemment souligné l'accumulation des ARNs AS dans certains organes du pommier. Ils ont validé l'accumulation des ARNs AS par RT-qPCR directionnelle, suivie d'un reséquençage par séquençage Illumina directionnel. Ils ont montré qu'elle corrélait avec la production co-localisée de siRNA de 21-23 nt dans des échantillons de pomme. Les ARNs AS, transcrits à partir du brin complémentaire, sont censés intervenir dans les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle (PTGS) en réprimant spécifiquement le gène sens *via* l'action des si-RNA produits. Ainsi, nos résultats suggèrent

un rôle potentiel d'ARNs AS dans la régulation post-transcriptionnelle au cours de la maturation du fruit sur certains loci.

Parmi les différents transcrits AS exprimés, le transcrit AS de MDP0000169942, annoté *WAK5*, est sur-exprimé dans les deux analyses. L'analyse *in silico* de la séquence protéique confirme la présence d'un domaine Ser/Thr protéine-kinase uniquement. Aucun domaine transmembranaire ni domaine extracytoplasmique de type EGF-like nécessaire à valider l'annotation *WAK* (He *et al.*, 1999) n'a pu être identifié (Annexe 2). Le clonage du gène permettrait de vérifier la séquence complète et de préciser la fonction putative de ce gène. Malgré tout, la présence d'un domaine kinase suppose un rôle dans les mécanismes de signalisation. Le transcrit AS étant différentiellement exprimé suggère une régulation négative. Il est nécessaire de cloner et de valider le gène en question afin de mieux comprendre le rôle éventuel de ce transcrit dans la maturation de la pomme.

De plus, peu de données sont actuellement disponibles quant à l'importance du RNA silencing dans les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle en cis (nat-siRNAs). De nombreux efforts restent à fournir afin de pouvoir intégrer les gènes AS dans les réseaux de régulation génique. Mais, la grande proportion de transcrits AS différentiellement exprimés entre les pommes farineuses et non-farineuses encourage à creuser cette voie et à préciser leur rôle potentiel.

4 Une hétérogénéité de maturation dès la récolte

Une limite aux études portant sur la qualité de la pomme reste l'hétérogénéité du fruit sur l'arbre. En effet, il existe des variations dans la qualité des fruits issus d'un même arbre qui est fonction des conditions environnementales, de l'orientation ou de la position du fruit dans l'arbre. La récolte est effectuée selon un critère primordial qui est la régression d'amidon qui assure une récolte au même stade pour toutes les variétés. Cependant, que la récolte soit basée sur un critère visuel ou à l'aide d'un amidomètre, il s'agit d'une méthode destructive. Elle ne permet donc pas d'évaluer le stade de maturité de chaque fruit récolté et ainsi de pallier ce problème d'hétérogénéité sur l'arbre. L'utilisation de méthodes non-destructives comme la spectroscopie infra-rouge pourrait présenter un intérêt pour ce type d'étude. D'ailleurs, beaucoup d'attention est accordée à cette technique mais son efficacité semble encore limitée (Peirs *et al.*, 2004 ; Nicolai *et al.*, 2007 ; Ignat *et al.*, 2014). En effet, plus la variabilité phénotypique est grande, moins la prédiction sera précise (Ignat *et al.*, 2014). Or, le but des études de diversité est justement d'augmenter la variabilité inter-génotypique. Par conséquent, le moyen le plus sûr de s'assurer d'une bonne représentativité de l'arbre est d'augmenter le nombre de pommes analysées. Pour diverses raisons, telles que la quantité de fruits disponibles ou le nombre d'analyses à réaliser, ceci n'a pas été possible. Après deux mois de conservation, une dizaine de fruits a systématiquement été phénotypée afin de ne conserver que les six fruits les plus représentatifs et les plus homogènes de la série. Cependant, rien ne permet de confirmer le stade précis de ces fruits à la récolte. Or, plus le processus de maturation est avancé à la récolte, plus la vitesse de maturation sera importante. Malgré tout, les différences de qualité texturale restent intrinsèques au cultivar et l'« état » textural en fin de conservation sera spécifique à chacun. De plus, nous nous sommes attardés à comparer des individus farineux – non farineux à un instant donné ; ce point devient alors majeur dans une problématique de cinétique en conservation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a eu pour but d'appréhender les réseaux de régulation impliqués dans l'élaboration de la farineuse de la pomme en cours de conservation. Il constitue la première étude transcriptomique exhaustive de ce caractère. La farineuse est un caractère textural négatif refusé par le consommateur et ainsi par toute la filière de production. Malgré son importance, la complexité et le flou autour de ce caractère ont souvent constitué un frein à son étude. Au cours de ces travaux, une nouvelle définition de la farineuse a été proposée. La farineuse de la pomme ne renvoie pas à un défaut textural, comme cela a pu être proposé, mais à un stade de sur-maturité des pommes résultant d'un processus de maturation rapide. L'étude de la cinétique du transcriptome de pommes farineuses permettrait de valider cette définition.

L'étude globale du transcriptome par la technique des puces à ADN nous a permis de mettre en évidence le rôle majeur des jasmonates dans la régulation fine de la maturation des pommes. Les jasmonates joueraient un rôle central dans la régulation du stress oxydatif associé à la maturation. Par le biais de plusieurs mécanismes (induction de la voie des flavonoïdes, régulation des ROS et de la voie de biosynthèse de l'éthylène), les jasmonates apparaissent comme un candidat pertinent dans le contrôle et le ralentissement de la maturation des pommes. L'inactivation ou l'extinction de la voie de biosynthèse de l'éthylène aurait pour effet d'augmenter le stress oxydatif et d'induire la farineuse, étape finale de la maturation des pommes. Cette étude nous a également permis de confirmer que les gènes de paroi sont régulés par les différentes voies hormonales (ici directement par l'éthylène et indirectement par les jasmonates) et ne présentent pas des candidats pertinents dans le contrôle de la farineuse. Par ailleurs, il semblerait qu'un niveau de contrôle supplémentaire de régulation post-transcriptionnelle *via* les nat-siRNAs pourrait également jouer un rôle considérable dans la maturation de la pomme.

Les résultats acquis ont permis de progresser sur la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'élaboration de la farineuse. Il est maintenant nécessaire de poursuivre et de valider ces résultats. Plusieurs approches peuvent être envisagées : des approches pharmacologiques ou fonctionnelles contribueraient à affiner les voies de régulation identifiées. Le test de cohésion cellulaire développé au cours ce travail présente alors un intérêt majeur pour évaluer le caractère farineux, indépendamment des analyses sensorielles. Il serait également intéressant de compléter l'étude sur la core-collection par des

analyses protéomiques afin de confirmer des différences d'accumulation de flavonoïdes, de ROS ou de jasmonates entre les pommes non farineuses et farineuses.

Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent le maintien de la qualité des pommes post-récolte constituent un atout pour les sélectionneurs. Ils ont alors une vision plus précise des interactions géniques à l'origine de l'expression du caractère farineux. Elle représente également un atout pour les professionnels de la filière. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques sous-jacents pourrait également déboucher vers une évolution des itinéraires culturaux ou vers de nouvelles technologies de conduite de conservation des fruits.

Par ailleurs, cette étude nous a permis d'identifier un gène précoce de la farinosité dans un fond génétique donné. Bien que ce marqueur n'ait pas pu être validé au sein de la core-collection, ces résultats présagent d'une utilisation possible d'outils moléculaires de prédiction qui contribueraient à une meilleure gestion de la production et de la conservation des pommes. Prévoir à la récolte l'évolution future de la farinosité permettrait aux producteurs ou aux metteurs en marché de limiter les pertes liées à une baisse de qualité texturale en conservation. Cela nécessite malgré tout de réitérer cette étude à chaque variété sujette à développer ce caractère farineux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott J, Watada A, Massie D. 1984. Sensory and instrument measurement of apple texture. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **109**, 221–229.

Agrimer, 2014. Les filières des fruits et légumes, données 2013. Edition provisoire. *eds* in *Les cahiers de FranceAgrimer*.

Alspach PA, Oraguzie NC. 2002. Estimation of genetic parameters of apple (*Malus domestica*) fruit quality from open-pollinated families. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **30**, 219–228.

Andani Z. 1999. Development of mealiness in apples under shelf-life conditions. *Food science & technology today* **13**, 203–204.

Archbold DD. 1992. Regulation of Apple Fruit Growth Rate by Turgor Pressure? *HortScience* **27**, 625–625.

Atkinson RG, Gunaseelan K, Wang MY, Luo L, Wang T, Norling CL, Johnston SL, Maddumage R, Schröder R, Schaffer RJ. 2011. Dissecting the role of climacteric ethylene in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) ripening using a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase knockdown line. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3821–3835.

Atkinson RG, Johnston SL, Yauk Y-K, Sharma NN, Schröder R. 2009. Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple. *Postharvest Biology and Technology* **51**, 149–157.

Atkinson RG, Schröder R, Hallett IC, Cohen D, MacRae EA. 2002. Overexpression of Polygalacturonase in Transgenic Apple Trees Leads to a Range of Novel Phenotypes Involving Changes in Cell Adhesion. *Plant Physiology* **129**, 122–133.

Atkinson RG, Sutherland PW, Johnston SL, Gunaseelan K, Hallett IC, Mitra D, Brummell DA, Schroder R, Johnston JW, Schaffer RJ. 2012. Down-regulation of POLYGALACTURONASE1 alters firmness, tensile strength and water loss in apple (*Malus x domestica*) fruit. *BMC Plant Biology* **12**, 129.

Bai S, Wang A, Igarashi M, Kon T, Fukasawa-Akada T, Li T, Harada T, Hatsuyama Y. 2012. Distribution of MdACS3 null alleles in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and its relevance to the fruit ripening characters. *Breeding Science* **62**, 46–52.

Barreiro P, Ortiz C, Ruiz-Altisent M, Schotte S, Andani Z, Wakeling I, Beyt PK. 1998. Comparison Between Sensory and Instrumental Measurements for Mealiness Assessment in Apples. a Collaborative Test. *Journal of Texture Studies* **29**, 509–525.

De Belie N, De Smedt V, De Baerdemaeker J. 2000. Principal component analysis of chewing sounds to detect differences in apple crispness. *Postharvest Biology and Technology* **18**, 109–119.

Billy L, Mehinagic E, Royer G, Renard CMGC, Arvisenet G, Prost C, Jourjon F. 2008. Relationship between texture and pectin composition of two apple cultivars during storage. *Postharvest Biology and Technology* **47**, 315–324.

Bondoux P. 1992. Storage diseases of pome fruits: apples and pears. , 173 pp.

- Bonnin E, Lahaye M.** 2013. Contribution of cell wall modifying enzymes on the texture of fleshy fruits: The example of apple. *Journal of the Serbian Chemical Society* **78**, 417–427.
- Botondi R, DeSantis D, Bellincontro A, Vizovitis K, Mencarelli F.** 2003. Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low- and high-aroma varieties of apricots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 1189–200.
- Bourne M.** 1979. Texture of temperate fruits. *Journal of Texture Studies*, 25–44.
- Bourne M.** 1982. *Food texture and viscosity*. New York.
- Bräutigam K, Vining KJ, Lafon-Placette C, et al.** 2013. Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology and Evolution* **3**, 399–415.
- Brummell DA, Cin VD, Crisosto CH, Labavitch JM.** 2004. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2029–2039.
- Brummell DA, Harpster MH.** 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **47**, 311–340.
- Camps C, Guillermin P, Mauget JC, Bertrand D.** 2005. Data analysis of penetrometric force/displacement curves for the characterization of whole apple fruits. *Journal of texture studies* **36**, 387–401.
- Carpita NC, Gibeaut DM.** 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **3**, 1–30.
- Carpita N, McCann MC.** 2000. The cell wall. *In* W Buchanan, W Gruissem, R Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Washington DC, pp 52-108.
- Celton JM, Gaillard S, Bruneau M, Pelletier S, Aubourg S, Martin-Magniette ML, Navarro L, Laurens F, Renou JP.** 2014. Widespread anti-sense transcription in apple is correlated with siRNA production and indicates a large potential for transcriptional and/or post-transcriptional control. *New Phytologist* **203**, 287–99.
- Chagné D, Dayatilake D, Diack R, Oliver M, Ireland H, Watson A, Gardiner SE, Johnston JW, Schaffer RJ, Tustin S.** 2014. Genetic and environmental control of fruit maturation, dry matter and firmness in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Horticulture Research* **1**, 14046.
- Concha CM, Figueroa NE, Poblete LA, Oñate FA, Schwab W, Figueroa CR.** 2013. Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* **70**, 433–444.
- Costa F, Alba R, Schouten H, et al.** 2010. Use of homologous and heterologous gene expression profiling tools to characterize transcription dynamics during apple fruit maturation and ripening. *BMC Plant Biology* **10**, 229.
- Costa F, Stella S, Van de Weg WE, Guerra W, Cecchin M, Dallavia J, Koller B, Sansavini S.** 2005. Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Euphytica* **141**, 181–190.

- Costa F, Weg WE, Stella S, Dondini L, Pratesi D, Musacchi S, Sansavini S.** 2008. Map position and functional allelic diversity of Md-Exp7, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). *Tree Genetics & Genomes* **4**, 575–586.
- Crowe ML, Serizet C, Thareau V, et al.** 2003. CATMA: a complete Arabidopsis GST database. *Nucleic Acids Research* **31**, 156–158.
- Daillant-Spinnler B, MacFie HJH, Beyts PK, Hedderley D.** 1996. Relationships between perceived sensory properties and major preference directions of 12 varieties of apples from the Southern Hemisphere. *Food Quality and Preference* **7**, 113–126.
- Dandekar A, Teo G, Defilippi B, Uratsu S, Passey A, Kader A, Stow J, Colgan R, James D.** 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Research* **13**, 373–384.
- Devoghalaere F, Doucen T, Guitton B, et al.** 2012. A genomics approach to understanding the role of auxin in apple (*Malus x domestica*) fruit size control. *BMC Plant Biology* **12**, 7.
- Fan X, Mattheis J., Fellman J.** 1998. A role for jasmonates in climacteric fruit ripening. *Planta* **204**, 444–449.
- Fry SC, York WS, Albersheim P, et al.** 1993. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum* **89**, 1–3.
- Galvez-Lopez D, Laurens F, Devaux M, Lahaye M.** 2012. Texture analysis in an apple progeny through instrumental, sensory and histological phenotyping. *Euphytica* **185**, 171–183.
- Galvez-Lopez D, Laurens F, Quémener B, Lahaye M.** 2011. Variability of cell wall polysaccharides composition and hemicellulose enzymatic profile in an apple progeny. *International Journal of Biological Macromolecules* **49**, 1104–1109.
- Gapper NE, McQuinn RP, Giovannoni JJ.** 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology* **82**, 575–591.
- Gómez MD, Vera-Sirera F, Pérez-Amador MA.** 2014. Molecular programme of senescence in dry and fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4515–4526.
- Gorny J, Kader A.** 1997. Low oxygen and elevated carbon dioxide atmospheres inhibit ethylene biosynthesis in preclimacteric and climacteric apple fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**, 542–546.
- Goulao LF.** 2010. Pectin de-esterification and fruit softening: revisiting a classical hypothesis. *Stewart Postharvest Review* **6**, 1–12.
- Goulao L, Cosgrove D, Oliveira C.** 2008. Cloning, characterisation and expression analyses of cDNA clones encoding cell wall-modifying enzymes isolated from ripe apples. *Postharvest Biology and Technology* **48**, 37–51.
- Goulao LF, Oliveira CM.** 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not a fruit. *Trends in food science & technology* **19**, 4–25.
- Goulao LF, Santos J, de Sousa I, Oliveira CM.** 2007. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biology and Technology* **43**, 307–318.

Guis M, Botondi R, Ben-Amor M, Ayub R, Bouzayen M, Pech J-C, Latché A. 1997. Ripening-associated Biochemical Traits of Cantaloupe Charentais Melons Expressing an Antisense ACC Oxidase Transgene. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**, 748–751.

Gwanpua SG, Van Buggenhout S, Verlinden BE, Christiaens S, Shpigelman A, Vicent V, Kermani ZJ, Nicolai BM, Hendrickx M, Geeraerd A. 2014. Pectin modifications and the role of pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples. *Food Chemistry* **158**, 283–91.

Handa AK, Tiznando-Hernandez ME, Mattoo AK. 2011. *Fruit development and ripening: a molecular perspective*. San Diego: Academic Press.

Harholt J, Suttangkakul A, Scheller HV. 2010. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology* **153**, 384–395.

Harker FR, Hallett IC. 1992. Physiological changes associated with development of mealiness of apple fruit during cool storage. *HortScience* **27**, 1291–1294.

Harker FR, Maindonald J, Murray SH, Gunson FA, Hallett IC, Walker SB. 2002. Sensory interpretation of instrumental measurements 1: texture of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* **24**, 225–239.

Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G. 1997*a*. Texture of fresh fruit. *Horticultural Reviews* **20**, 121–224.

Harker FR, Stec MGH, Hallett IC, Bennett CL. 1997*b*. Texture of parenchymatous plant tissue: a comparison between tensile and other instrumental and sensory measurements of tissue strength and juiciness. *Postharvest Biology and Technology* **11**, 63–72.

He ZH, Cheeseman I, He D, Kohorn BD. 1999. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **39**, 1189–96.

Ignat T, Lurie S, Nyasordzi J, Ostrovsky V, Egozi H, Hoffman A, Friedman H, Weksler A, Schmilovitch Z. 2014. Forecast of Apple Internal Quality Indices at Harvest and During Storage by VIS-NIR Spectroscopy. *Food and Bioprocess Technology* **7**, 2951–2961.

Ireland HS, Gunaseelan K, Muddumage R, Tacken EJ, Putterill J, Johnston JW, Schaffer RJ. 2014. Ethylene regulates Apple (*Malus x domestica*) fruit softening through a dose x time-dependent mechanism and through differential sensitivities and dependencies of cell wall-modifying genes. *Plant & Cell Physiology* **55**, 1005–1016.

Ireland HS, Yao J-L, Tomes S, Sutherland PW, Nieuwenhuizen N, Gunaseelan K, Winz RA, David KM, Schaffer RJ. 2013. Apple SEPALLATA1/2-like genes control fruit flesh development and ripening. *The Plant Journal* **73**, 1044–1056.

Iwanami, Hiroshi, Moriya, Shigeki, Kotoda, Nobuhiro, Takahashi, Sae, Abe, Kazuvuki. 2005. Influence of mealiness on the firmness of apples after harvest. *HortScience* **40**, 2091–2095.

Iwanami H, Moriya S, Kotoda N, Takahashi S, Abe K. 2008. Estimations of heritability and breeding value for postharvest fruit softening in apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **133**, 92–99.

Jaeger SR, Andani Z, Wakeling IN, MacFie HJH. 1998. Consumer preferences for fresh and aged apples: a cross-cultural comparison. *Food Quality and Preference* **9**, 355–366.

Janssen B, Thodey K, Schaffer R, et al. 2008. Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit. *BMC Plant Biology* **8**, 16.

Jarvis MC. 1998. Intercellular separation forces generated by intracellular pressure. *Plant, Cell & Environment* **21**, 1307–1310.

Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP. 2003. Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment* **26**, 977–989.

Johnston JW, Gunaseelan K, Pidakala P, Wang M, Schaffer RJ. 2009. Co-ordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2689–2699.

Johnston JW, Hewett EW, Banks NH, Harker FR, Hertog MLATM. 2001. Physical change in apple texture with fruit temperature: effects of cultivar and time in storage. *Postharvest Biology and Technology* **23**, 13–21.

Johnston JW, Hewett EW, Hertog MLATM. 2002. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: A review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **30**, 145–160.

Karlova R, Chapman N, David K, Angenent GC, Seymour GB, Maagd RA de. 2014. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4527–4541.

Kenis K, Keulemans J, Davey M. 2008. Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple. *Tree Genetics & Genomes* **4**, 647–661.

Khan AA, Vincent JFV. 1990. Anisotropy of apple parenchyma. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **52**, 455–466.

Khan AA, Vincent JFV. 1993. Anisotropy in the fracture properties of apple flesh as investigated by crack-opening tests. *Journal of Materials Science* **28**, 45–51.

King GJ, Maliepaard C, Lynn JR, et al. 2000. Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 1074–1084.

Klee HJ, Giovannoni JJ. 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review of Genetics* **45**, 41–59.

Kondo S, Tomiyama A, Seto H. 2000. Changes of Endogenous Jasmonic Acid and Methyl Jasmonate in Apples and Sweet Cherries during Fruit Development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **125**, 282–287.

Kondo S, Yamada H, Setha S. 2007. Effect of Jasmonates Differed at Fruit Ripening Stages on 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Synthase and ACC Oxidase Gene Expression in Pears. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**, 120–125.

Lee YP, Yu GH, Seo YS, Han SE, Choi YO, Kim D, Mok IG, Kim WT, Sung SK. 2007. Microarray analysis of apple gene expression engaged in early fruit development. *Plant Cell Reports* **26**, 917–926.

Lefever G, Vieuille M, Delage N, ?harlingue A, de Montclerc J, Bompeix G. 2004. Characterization of Cell Wall Enzyme Activities, Pectin Composition, and Technological Criteria of Strawberry Cultivars (*Fragaria×ananassa* Duch). *Journal of Food Science* **69**, FCT221–FCT226.

- Lelièvre J, Latché A, Jones B, Bouzayen M, Pech J.** 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum* **101**, 727–739.
- Lerouxel O, Cavalier DM, Liepman AH, Keegstra K.** 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 621–630.
- Liu Y-X, Wang M, Wang X-J.** 2014. Endogenous Small RNA Clusters in Plants. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **12**, 64–71.
- Longhi S, Hamblin MT, Trainotti L, Peace CP, Velasco R, Costa F.** 2013. A candidate gene based approach validates Md-PG1 as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus x domestica* Borkh). *BMC Plant Biology* **13**, 37.
- Longhi S, Moretto M, Viola R, Velasco R, Costa F.** 2012. Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Journal of Experimental Botany* **63**, 1107–1121.
- Louvet R, Cavel E, Gutierrez L, Guenin S, Roger D, Gillet F, Guerineau F, Pelloux J.** 2006. Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224**, 782–91.
- Maliepaard, C, Sillanp, M J, Van O, J W, Jansen, R C, Arjas, E.** 2001. Bayesian versus frequentist analysis of multiple quantitative trait loci with an application to an outbred apple cross. Heidelberg, ALLEMAGNE: Springer.
- Malmström E, Carlmark A.** 2012. Controlled grafting of cellulose fibres – an outlook beyond paper and cardboard. *Polymer Chemistry* **3**, 1702–1713.
- Mavroudis NE, Dejmek P, Sjöholm I.** 2004. Studies on some raw material characteristics in different Swedish apple varieties. *Journal of Food Engineering* **62**, 121–129.
- McAtee P, Karim S, Schaffer R, David K.** 2013. A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science* **4**, 79.
- Mccann MC, Wells B, Roberts K.** 1990. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science* **96**, 323–334.
- Mehinagic E, Royer G, Symoneaux R, Bertrand D, Jourjon F.** 2004. Prediction of the sensory quality of apples by physical measurements. *Postharvest Biology and Technology* **34**, 257–269.
- Miszczak A, Lange E, Saniewski M, Czapski J.** 1995. The effect of methyl jasmonate on ethylene production and CO₂ evolution in Jonagold apples. *Acta Agrobotanica* **48**, 121–128.
- Mohnen D.** 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 266–277.
- Morris ER, Powell DA, Gidley MJ, Rees DA.** 1982. Conformations and interactions of pectins: I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *Journal of Molecular Biology* **155**, 507–516.
- Muñoz-Bertomeu J, Miedes E, Lorences EP.** 2013. Expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) genes and XET activity in ethylene treated apple and tomato fruits. *Journal of Plant Physiology* **170**, 1194–1201.
- Murayama H, Arikawa M, Sasaki Y, Dal Cin V, Mitsuhashi W, Toyomasu T.** 2009. Effect of ethylene treatment on expression of polyuronide-modifying genes and solubilization of polyuronides

during ripening in two peach cultivars having different softening characteristics. *Postharvest Biology and Technology* **52**, 196–201.

Newcomb RD, Crowhurst RN, Gleave AP, et al. 2006. Analyses of Expressed Sequence Tags from Apple. *Plant Physiology* **141**, 147–166.

Ng JK, Schroder R, Sutherland PW, Hallett IC, Hall MI, Prakash R, Smith BG, Melton LD, Johnston JW. 2013. Cell wall structures leading to cultivar differences in softening rates develop early during apple (*Malus x domestica*) fruit growth. *BMC Plant Biology* **13**, 183.

Nicolai BM, Beullens K, Bobelyn E, Peirs A, Saeys W, Theron KI, Lammertyn J. 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology* **46**, 99–118.

Nishiyama K, Guis M, Rose JKC, et al. 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1281–1290.

Nobile PM, Wattedled F, Quecini V, Girardi CL, Lormeau M, Laurens F. 2011. Identification of a novel α -L-arabinofuranosidase gene associated with mealiness in apple. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4309–4321.

Oraguzie NC, Iwanami H, Soejima J, Harada T, Hall A. 2004. Inheritance of the Md-ACS1 gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Theoretical and Applied Genetics* **108**, 1526–1533.

Ortiz A, Graell J, Lara I. 2010. Preharvest Calcium Sprays Improve Volatile Emission at Commercial Harvest of ‘Fuji Kiku-8’ Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 335–341.

Pech JC, Bouzayen M, Latché A. 2008. Climacteric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science* **175**, 114–120.

Peirs A, Schenk A, Nicolai BM. 2005. Effect of natural variability among apples on the accuracy of VIS-NIR calibration models for optimal harvest date predictions. *Postharvest Biology and Technology* **35**, 1–13.

Pelloux J, Rusterucci C, Mellerowicz EJ. 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* **12**, 267–77.

Peña MJ, Carpita NC. 2004. Loss of Highly Branched Arabinans and Debranching of Rhamnogalacturonan I Accompany Loss of Firm Texture and Cell Separation during Prolonged Storage of Apple. *Plant Physiology* **135**, 1305–1313.

Percy AE, Melton LD, Jameson PE. 1997. Xyloglucan and hemicelluloses in the cell wall during apple fruit development and ripening. *Plant Science* **125**, 31–39.

Pérez S, Rodríguez-Carvajal MA, Doco T. 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* **85**, 109–121.

Phan TD, Bo W, West G, Lycett GW, Tucker GA. 2007. Silencing of the Major Salt-Dependent Isoform of Pectinesterase in Tomato Alters Fruit Softening. *Plant Physiology* **144**, 1960–1967.

Poel BV de, Bulens I, Markoula A, et al. 2012. Targeted Systems Biology Profiling of Tomato Fruit Reveals Coordination of the Yang Cycle and a Distinct Regulation of Ethylene Biosynthesis during Postclimacteric Ripening. *Plant Physiology* **160**, 1498–1514.

- Potter D, Eriksson T, Evans RC, et al.** 2007. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* **266**, 5–43.
- Ralet M-C, Dronnet V, Buchholt HC, Thibault J-F.** 2001. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research* **336**, 117–125.
- Renard CMGC, Lomax JA, Boon JJ.** 1992. Apple-fruit xyloglucans: a comparative study of enzyme digests of whole cell walls and of alkali-extracted xyloglucans. *Carbohydrate Research* **232**, 303–320.
- Renard CMGC, Thibault J-F, Voragen AGJ, van den Broek LAM, Pilnik W.** 1993. Studies on apple protopectin VI: extraction of pectins from apple cell walls with rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Polymers* **22**, 203–210.
- Rose JKC.** 2003. *The Plant Cell Wall*. CRC Press.
- Sacher JA.** 1973. Senescence and Postharvest Physiology. *Annual Review of Plant Physiology* **24**, 197–224.
- Saei A, Tustin DS, Zamani Z, Talaie A, Hall AJ.** 2011. Cropping effects on the loss of apple fruit firmness during storage: The relationship between texture retention and fruit dry matter concentration. *Scientia Horticulturae* **130**, 256–265.
- Saladié M, Matas AJ, Isaacson T, et al.** 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology* **144**, 1012–1028.
- Schaffer RJ, Friel EN, Souleyre EJJ, et al.** 2007. A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiology* **144**, 1899 – 1912.
- Schaffer RJ, Ireland HS, Ross JJ, Ling TJ, David KM.** 2013. SEPALLATA1/2-suppressed mature apples have low ethylene, high auxin and reduced transcription of ripening-related genes. *AoB Plants* **5**, pls047.
- Scheller HV, Ulvskov P.** 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 263–289.
- Seymour GB, Manning K, Eriksson EM, Popovich AH, King GJ.** 2002. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2065–2071.
- Sitrit Y, Bennett AB.** 1998. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: A Re-examination. *Plant Physiology* **116**, 1145–1150.
- De Smedt V, Pauwels E, De Baerdemaeker J, Nicolai B.** 1998. Microscopic observation of mealiness in apples: a quantitative approach. *Postharvest Biology and Technology* **14**, 151–158.
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, et al.** 2004. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science* **306**, 2206–2211.
- Soto A, Ruiz KB, Ziosi V, Costa G, Torrigiani P.** 2012. Ethylene and auxin biosynthesis and signaling are impaired by methyl jasmonate leading to a transient slowing down of ripening in peach fruit. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1858–1865.

- Symoneaux R, Galmarini MV, Mehinagic E.** 2012. Comment analysis of consumers likes and dislikes as an alternative tool to preference mapping. A case study on apples. *Food Quality and Preference* **24**, 59–66.
- Tacken E, Ireland H, Gunaseelan K, et al.** 2010. The role of ethylene and cold temperature in the regulation of the apple POLYGALACTURONASE1 gene and fruit softening. *Plant Physiology* **153**, 294–305.
- Thareau V, Déhais P, Serizet C, Hilson P, Rouzé P, Aubourg S.** 2003. Automatic design of gene-specific sequence tags for genome-wide functional studies. *Bioinformatics* **19**, 2191–2198.
- Thompson JE, Fry SC.** 2000. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* **211**, 275–286.
- Tong C, Krueger D, Vickers Z, Bedford D, Luby J, El-Shiekh A, Shackel K, Ahmadi H.** 1999. Comparison of Softening-related Changes during Storage of ‘Honeycrisp’ Apple, Its Parents, and ‘Delicious’. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **124**, 407–415.
- Tu K, Nicolai B, De Baerdemaeker J.** 2000. Effects of relative humidity on apple quality under simulated shelf temperature storage. *Scientia Horticulturae* **85**, 217–229.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, et al.** 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics* **42**, 833–839.
- Volz RK, Harker FR, Hallet IC, Lang A.** 2004. Development of texture in apple fruit - a biophysical perspective. *Acta horticulturae* **636**, 473-479.
- Voragen AGJ, Coenen G-J, Verhoef RP, Schols HA.** 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* **20**, 263–275.
- Voragen FGJ, Schols HA, Pilnik W.** 1986a. Structural features of the hemicellulose polymers of apples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **183**, 105–110.
- Voragen AGJ, Schols HA, Pilnik W.** 1986b. Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c. *Food Hydrocolloids* **1**, 65–70.
- De Vries JA, Rombouts FM, Voragen AGJ, Pilnik W.** 1983. Distribution of methoxyl groups in apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers* **3**, 245–258.
- Wakasa Y, Kudo H, Ishikawa R, Akada S, Senda M, Niizeki M, Harada T.** 2006. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. *Postharvest Biology and Technology* **39**, 193–198.
- Waldron KW, Parker ML, Smith AC.** 2003. Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2**, 128–146.
- Watkins CB.** 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances* **24**, 389–409.
- Wei J, Ma F, Shi S, Qi X, Zhu X, Yuan J.** 2010. Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* **56**, 147–154.
- Wills RHH, Lee TH, Graham D.** *Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables and Ornamentals.* ed. 2007, Sydney, Australia: UNSW Press.

Wolf S, Greiner S. 2012. Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* **249**, 169–175.

Wünsche JN, Lakso AN. 2000. Apple tree physiology - implications for orchard and tree management **33**, 82–88.

Yamaki S. 1984. Isolation of Vacuoles from Immature Apple Fruit Flesh and Compartmentation of Sugars, Organic Acids, Phenolic Compounds and Amino Acids. *Plant and Cell Physiology* **25**, 151–166.

Zhu Y, Zheng P, Varanasi V, Shin S, Main D, Curry E, Mattheis J. 2012. Multiple plant hormones and cell wall metabolism regulate apple fruit maturation patterns and texture attributes. *Tree Genetics & Genomes* **8**, 1389–1406.

Ziosi V, Bonghi C, Bregoli AM, Trainotti L, Biondi S, Sutthiwal S, Kondo S, Costa G, Torrigiani P. 2008. Jasmonate-induced transcriptional changes suggest a negative interference with the ripening syndrome in peach fruit. *Journal of Experimental Botany* **59**, 563–573.

Zykwinska AW, Ralet M-CJ, Garnier CD, Thibault J-FJ. 2005. Evidence for In Vitro Binding of Pectin Side Chains to Cellulose. *Plant Physiology* **139**, 397–407.

Zykwinska A, Thibault J-F, Ralet M-C. 2008. Competitive binding of pectin and xyloglucan with primary cell wall cellulose. *Carbohydrate Polymers* **74**, 957–961.

Sites internet :

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>

ANNEXES

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1. Protocole du test de cohésion cellulaire.

ANNEXE 2. Analyses *in silico* des séquences protéiques des gènes annotés « WAK ».

ANNEXE 3. Poster RGC6, 2012.

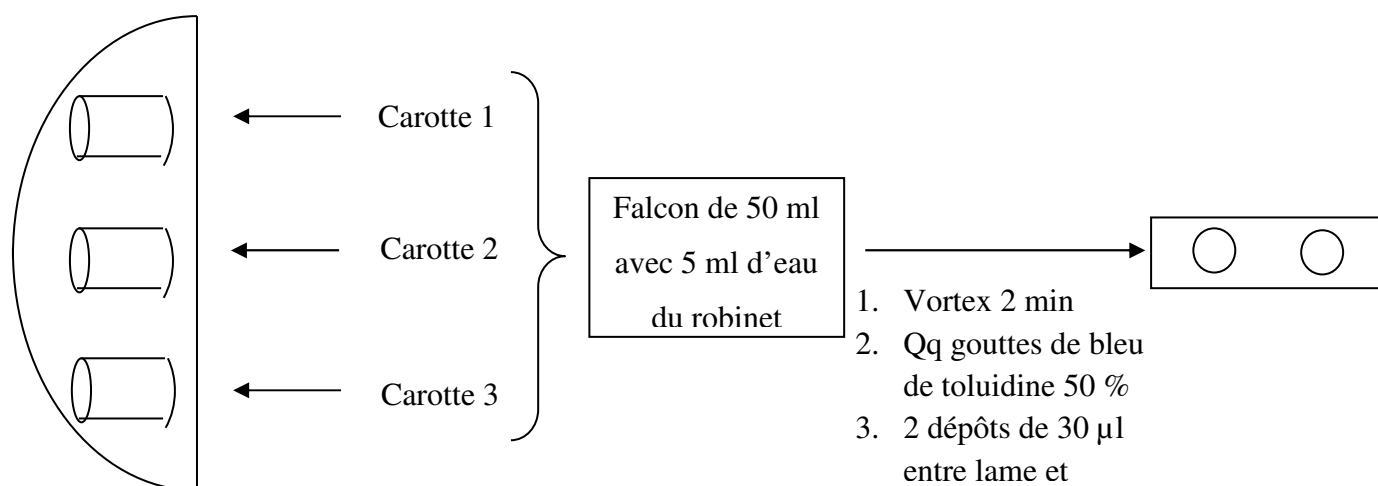
ANNEXE 4. Poster CWMXVIII, 2013.

ANNEXE 5. Poster RGC7, 2014.

Annexe 1. Protocole du « Test de cohésion cellulaire »

Prélèvement :

Sur 1 quartier de fruit :



Protocole :

1. Prélever 3 carottes réalisées à l'aide d'un emporte-pièce d'1 cm de diamètre. Couper quelques mm sous la cuticule et conserver 1 cm dans le parenchyme.
2. Mettre les 3 fragments dans un falcon de 50 ml contenant 5 ml d'eau du robinet.
3. Vortexer pendant 2 minutes (toujours utiliser le même vortex).
4. Ajouter 5 gouttes de bleu de toluidine dilué à 50 %.
5. Prélever immédiatement 30 μ l de la solution, les déposer sur une lame. Monter entre lame et lamelle. Faire un deuxième dépôt. (Marquer les lamelles 24*24 mm afin de les diviser en 4 et faciliter la prise des photos).
6. Observer à la loupe binoculaire (grossissement 0.7X). Prendre 4 photos pour chaque dépôt.

Analyse des images sous ImageJ

1. Plugins \rightarrow Macro \rightarrow Run \rightarrow Sélectionner la macro « comptage_macro.ijm »
2. Dans la fenêtre Results : Files \rightarrow Save As

Macro ImageJ:

```
run("Make Binary"); run("Analyze Particles...", "size=320-1500 circularity=0.10-1.00 show=Nothing display clear include add")
```

Annexe 2. Analyses *in silico* des gènes identifiés annotés « WAK »

Plusieurs transcrits annotés « WAK » ont été identifiés au cours des deux analyses présentées. Une analyse *in silico* a été réalisée afin de vérifier les annotations. Il s'est avéré que le séquençage et les alignements de séquences présentés sous GDR sont souvent imparfaits concernant ces séquences. Des essais d'amplification rapide de type RACE ont été réalisés mais sans succès. Cette annexe a pour unique but de présenter les séquences WAKs identifiées et les problèmes d'annotations associés.

Matériels et méthodes

Les résultats présentés ci-dessous correspondent aux domaines identifiés à partir de l'outil « Conserved Domain Search » disponible sous NCBI (Marchler-Bauer *et al.*, 2011) et à partir de la base de données Phytozome (www.phytozome.net).

Résultats

La séquence “type” d'un gène annoté WAK chez *Arabidopsis thaliana* a été ajoutée pour présenter la structure des WAKs. Les WAKs présentent trois domaines caractéristiques (He *et al.*, 1999). Une partie codant pour la région extracellulaire présente un domaine WAK (Pfam: 08488 ou Pfam: 13947), et un ou plusieurs domaines « facteur épidermique de croissance » (EFG, Pfam: 07645). Cette région peut participer à la liaison avec d'autres molécules. Elle présente un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine tyrosine kinase cytosolique intracellulaire pouvant participer aux voies de signalisation (PKc, Pfam: 07714).

Seq.ID	Length (cds)	Annotation	WAK	EFG	PKc
AT1G21270	2199	WAK2	1	2	1
MDP0000228203	1185	WAK2	1	1	0
MDP0000169942	1404	WAK5	0	0	1
MDP0000308826	1404	WAK2	1	1	0
MDP0000196672	2199	WAK2	1	1	1

Liste des domaines identifiés à partir des séquences protéiques des WAKs différenciellement exprimés dans la famille IM.

Ainsi, la plupart des séquences sont incomplètes ou ne codent pas spécifiquement pour des WAKs (*e.g.* MDP000169942). Les essais RACE n'ont pas permis de compléter les séquences.

He ZH, Cheeseman I, He D, Kohorn BD. 1999. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, *Wak1-5*, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **39**, 1189–96.

Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, et al. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research* **39**, D225–9.



Deciphering apple fruit mealliness: A transcriptional approach



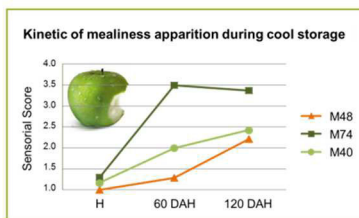
Mikol S¹, Bruneau M¹, Gourdon C¹, Celton J-M¹, Orsel M¹, Laurens F¹ & Renou J-P¹.

1- UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, INRA / AgroCampus-Ouest / Université d'Angers, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045 Angers, France.

Apple mealliness: from chewing to cell counting

1. Sensory evaluation

Based on the Breakdown of flesh in **small pieces in the mouth** which tend to be dry.

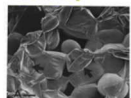


2. Physiological description of mealliness

Harker *et al.*, 1992 described mealliness as **loss of cell to cell adhesion** but maintenance of cell wall strength: the cells are less liable to rupture and break down into small clumps of undamaged cells when chewing.

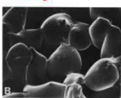
Fracture surface of fruits after tensile strength test:

Not Mealy



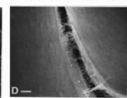
- Collapse of the cell wall
- Rupture of individual cells
- Release of cell contents

Mealy

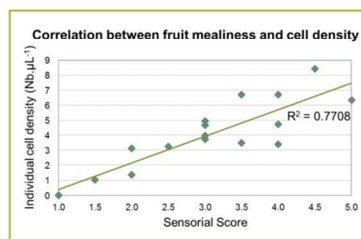
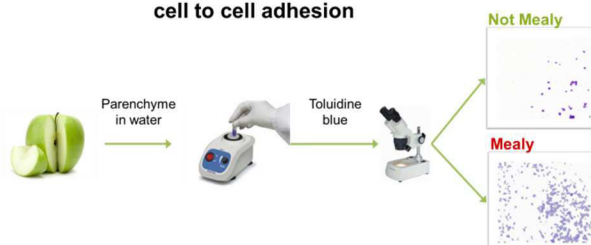


- Undamaged or distorted cells
- More air space
- More rounded and slightly extended cells
- Middle lamina stretched

Harker *et al.*, 1992



3. Developing a test based on rapid evaluation of cell to cell adhesion

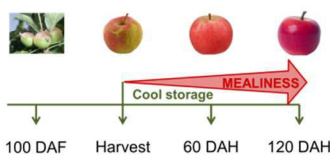


> **Good correlation** between sensory evaluation of mealliness and individual cell density after challenging the cells adhesion.
 > A new rapid **not subjective test** to evaluate apple fruit mealliness.

Which genes and which control? Transcriptome analysis

1. Kinetic of mealliness apparition during cool storage

- 6 hybrids IM, descendants from the same cross, with **contrasted phenotype** for mealliness.
- Samples collected over **2 years** (2009 and 2010) at several developmental stages and during cool storage.



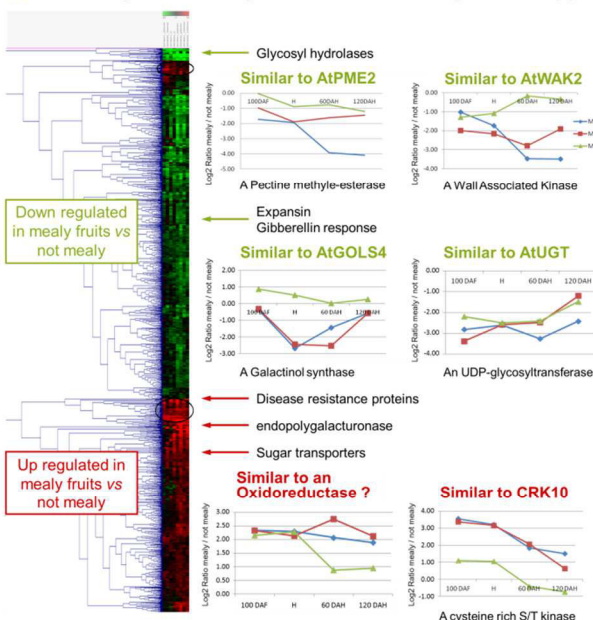
Mealy vs Not Mealy
 M40 vs M49
 M74 vs M20
 M48 vs M16

AryANE-v1 microarray (NimbleGen): 2 x 60,000 specific probes designed on predicted apple coding sequences.

- > 18,000 genes up or down regulated at one or more kinetic point for at least one contrasted couple (P-value 1%).
- > 1,462 genes are similarly regulated in couple 1 and 2.
- > 204 genes are similarly regulated within the 3 couples.
- > Transcriptome profile in accordance with the observed modification of cell wall properties and middle lamina composition.

Reference: Harker and Hallet, 1992, *HORTSCIENCE* 27(12):1291-1294.

2. Selecting candidate genes for functional genomic approach



> Expression profiles **validated** by qPCR



Genome wide analysis reveals WAK and PME implications in textural default of apple fruit

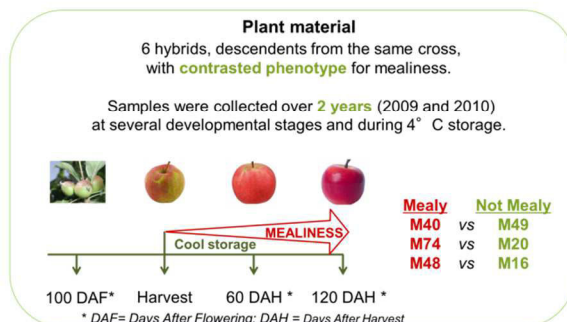
Mikol S¹, Bruneau M¹, Celton J-M¹, Orsel M¹, Delaire M¹, Juchaux M², Laurens F¹ & Renou J-P¹.

1- UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, INRA / AgroCampus-Ouest / Université d'Angers, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045 Angers, France.
2- Université d'Angers, SFR 4207 QUASAV, IMAC, rue Georges Morel, F-49071 Beaucozè, France

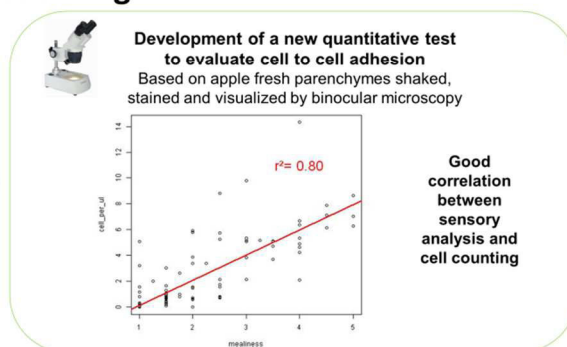
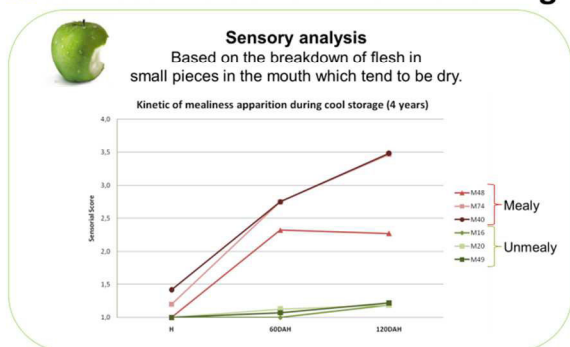
What is Mealiness ?

Fruit maturation involves many physiological and biochemical changes including cell wall modifications. Some cultivars show undesirable ripening process leading to mealiness, which is characterized by texture deterioration resulting in soft, grainy and dry fruit (Harker *et al.*, 1992). So far, sensory analysis is the most common way to estimate mealy texture.

To better understand fruit development and ripening process, we have integrated phenotypic, transcript profiling and pectin structural analyses to gain insight into gene-regulatory events associated with these processes.



Mealiness Evaluation: From Chewing to Cell Counting



Transcriptome Analysis reveals potential key regulators

AryANE-v1 microarray (NimbleGen): 120,000 specific probes designed from predicted apple coding sequences (1 sense and 1 antisense by gene).

Comparison of transcript expression between mealy and unmealy phenotypes during fruit ripening:

Sense	Function_TAIR.Interpro.Trembl	M40/M49		M74/M20		M48/M16	
		100d H	60DAH	120DAH	100d H	60DAH	120DAH
S	UDP-galactose 4-epimerase	0.44	0.41	0.44	0.42	0.42	0.4
S	QS (QUINOLINATE SYNTHASE); quinolinate synthetase A	0.34	0.32	0.34	0.32	0.32	0.3
S	UDP-galactose 4-epimerase	0.34	0.32	0.34	0.32	0.32	0.3
S	ATP1ME2 (Arabidopsis thaliana pectin methyltransferase 2)	0.19	0.16	0.19	0.16	0.16	0.15
S	glycosyl hydrolase family 5 protein / cellulase family protein	0.11	0.1	0.11	0.1	0.1	0.1
S	hydrolase, alpha/beta fold family protein	0.11	0.1	0.11	0.1	0.1	0.1
S	integral membrane transporter family protein	0.11	0.1	0.11	0.1	0.1	0.1
AS	WAK3 (WALL ASSOCIATED KINASE 3)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
AS	WAK2 (wall-associated kinase 2)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
AS	WAK2 (wall-associated kinase 2)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Log ratio of selected genes that showed a statistically significant p-value of 0.01. In green, genes which are down regulated in mealy fruits, in red, genes up regulated in mealy fruits. S = sense, AS = Antisense.

MEB observations
Performed on fresh apple parenchymes

Unmealy sample
At harvest

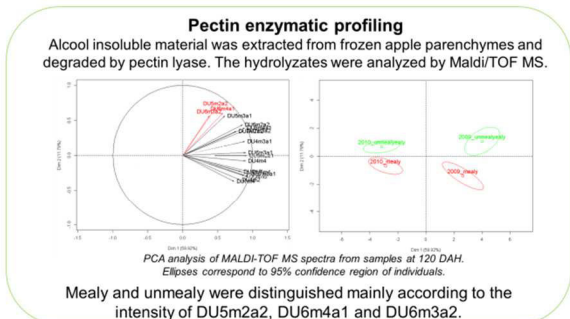
Unmealy sample
120 DAH

Unmealy
Collapse of the cell wall
Rupture of individual cells
Release of cell contents

Mealy sample

Mealy sample

Mealy
Undamaged or distorted cells
More rounded or slightly extended cells
Middle lamina stretched



References: Lally *et al.*, 2001, *The Plant Cell*, Vol. 13, 1317-1331.
Harker *et al.*, 1992, *HortScience* 27(12):1291-1294.

Thanks to Experimental unit of Bois l'Abbé-La Rétuzière.

Conclusion

Over 15,000 genes were differentially expressed. Among them, just a few displayed similar expression patterns between mealy or unmealy genotypes and during kinetic of ripening and might play a key role in mealiness development. These genes are such as cell wall, hormones and defense annotated genes.

WAKs are involved in cell elongation in *Arabidopsis* (Lally *et al.*, 2001). WAK antisense expression might affect cell expansion and contribute to wall stiffening in mealy fruits. Associated with different pectin structures of the middle lamella, these could explain MEB observations.

A causal relationship could be established between PME transcript accumulation and wall collapse in unmealy genotypes. PME activity in the wall, and not in the middle lamella, might modulate methyl-esterified epitopes and impact wall weakness (softening) leading to cell disruption during chewing.





Global transcriptome analysis reveals the implication of one PME gene in apple mealiness development

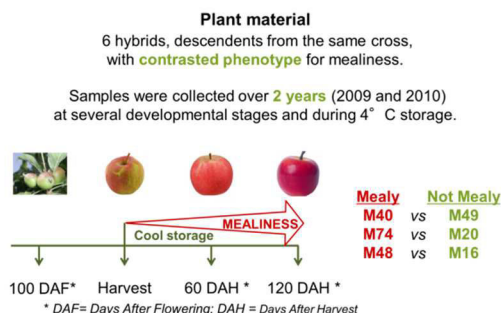
Mikol S², Bruneau M¹, Celton J-M¹, Le Gall S⁴, Boudier A⁵, Francin-Allami M⁵, Juchaux M³, Orsel M¹, Laurens F¹ & Renou J-P¹.

1. INRA, UMR1345, IRHS (INRA, Agrocampus-Ouest, Université d'Angers), SFR 4207 QUASAV, F-49071 Beaucozè, France; 2. Agrocampus-Ouest, UMR1345, IRHS (INRA, Agrocampus-Ouest, Université d'Angers), SFR 4207 QUASAV, F-49045 Angers, France; 3. Université d'Angers, UMR1345, IRHS (INRA, Agrocampus-Ouest, Université d'Angers), SFR 4207 QUASAV, F-49071 Beaucozè, France; 4. INRA BIA UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, Plate-forme BIBS, INRA, F-44300 Nantes, France; 5. INRA, UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, F-44316 Nantes, France.

What is Mealiness ?

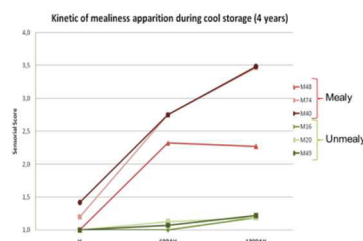
Fruit maturation involves many physiological and biochemical changes including cell wall modifications. Some cultivars show undesirable ripening process leading to mealliness, which is characterized by texture deterioration resulting in soft, grainy and dry fruit (Harker *et al.*, 1992). So far, sensory analysis is the most common way to estimate mealy texture.

To better understand fruit development and ripening process, we have integrated phenotypic, transcript profiling and pectin structural analyses to gain insight into gene-regulatory events associated with these processes.

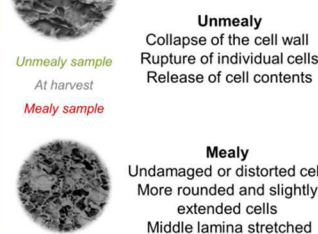


Mealiness Evaluation: From Chewing to Cell Counting

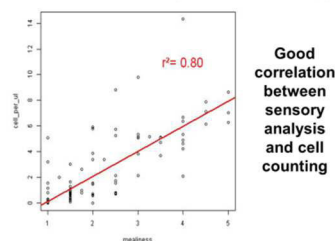
Sensory analysis
Based on the breakdown of flesh in small pieces in the mouth which tend to be dry.



MEB observations
Performed on fresh apple parenchymes



Development of a new quantitative test to evaluate cell to cell adhesion
Based on apple fresh parenchymes shaken, stained and visualized by binocular microscopy



Transcriptome Analysis reveals potential key regulators including a PME

AryANE-v1 microarray (NimbleGen): 120,000 specific probes designed from predicted apple coding sequences (1 sense and 1 antisense by gene).

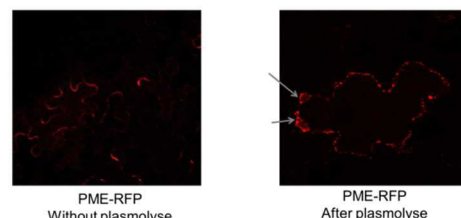
Comparison of transcript expression between mealy and unmealy phenotypes during fruit ripening:

Sense	Function_TAIR/Interpro/Trembl	M40/M49			M74/M20			M48/M16		
		100d	60dAH	120dAH	100d	60dAH	120dAH	100d	60dAH	120dAH
S	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1.22	1.48	1.64	1.35	1.51	1.67	1.45	1.61	1.77
S	QS (QUINOLINATE SYNTHASE): quinolinate synthetase A	1.18	1.34	1.50	1.31	1.47	1.63	1.21	1.37	1.53
S	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1.14	1.30	1.46	1.27	1.43	1.59	1.11	1.27	1.43
S	ATPME2 (Arabidopsis thaliana pectin methyltransferase 2)	1.10	1.26	1.42	1.21	1.37	1.53	1.07	1.23	1.39
S	glycosyl hydrolase family 5 protein / cellulase family protein	1.06	1.22	1.38	1.17	1.33	1.49	1.04	1.20	1.36
S	hydrolase, alpha/beta fold family protein	1.02	1.18	1.34	1.13	1.29	1.45	1.01	1.17	1.33
S	integral membrane transporter family protein	1.00	1.16	1.32	1.11	1.27	1.43	0.99	1.15	1.31
AS	WAK3 (WALL ASSOCIATED KINASE 3)	0.88	0.84	0.80	0.85	0.81	0.77	0.92	0.88	0.84
AS	WAK2 (wall-associated kinase 2)	0.85	0.81	0.77	0.82	0.78	0.74	0.87	0.83	0.79
AS	WAK2 (wall-associated kinase 2)	0.82	0.78	0.74	0.79	0.75	0.71	0.84	0.80	0.76

Log ratio of selected genes that showed a statistically significant p-value of 0.01. In green, genes which are down regulated in mealy fruits, in red, genes up regulated in mealy fruits. S = sense, AS = Antisense.

Subcellular localisation of the MdPME-RFP fusion protein

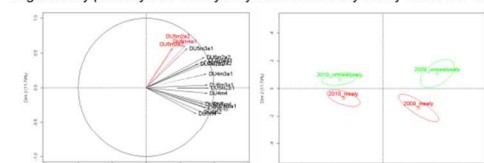
Nicotiana tabacum cells transiently expressing 35-PME-mRFP construct were viewed using a confocal laser scanning microscope.



Fluorescence localisation in the apoplast confirmed the PME exportation within the cell wall

Pectin enzymatic profiling

Alcohol insoluble material was extracted from frozen apple parenchymes and degraded by pectin lyase. The hydrolyzates were analyzed by MALDI/TOF MS.



Mealy and unmealy were distinguished mainly according to the intensity of DU5m2a2, DU6m4a1 and DU6m3a2.

References: Harker *et al.*, 1992, *HortScience* 27(12):1291-1294; Ng *et al.*, 2014, *Carbohydr. Res.* 386 : 1-6.

Thanks to Experimental unit of Bois l'Abbé-La Rétzière.

Conclusion

Over 15,000 genes were differentially expressed. Among them, just a few displayed **expression patterns correlated with mealy or unmealy phenotypes and during kinetic of ripening** and might play a key role in mealiness development. These genes are such as cell wall, hormones and defense annotated genes.

Interestingly, a PME displayed important modification in its expression level in accordance with the development of mealiness in apple fruits. Protein fusion experiment confirmed the PME exportation within the apoplast.

However, considering little change in pectin alteration between mealy and non mealy fruits and consistent with the observations of Ng *et al* (2014), we hypothesize that mealiness may be partially due to qualitative and spatial variations of pectin microarchitecture rather than quantitative pectin differences, and that these changes may occur early in fruit development.

Overall, this MdPME could be an early marker of mealiness prognosis in apple.

RESUME

“Etude des réseaux de régulation de gènes qui gouvernent l’élaboration de la texture de la pomme”

La pomme est un des fruits les plus consommés au monde. Le développement d’une texture farineuse est un caractère rédhibitoire pour les consommateurs et pour la profession. La farinosité renvoie à une texture sèche et granuleuse en bouche qui se développe en cours de conservation. Malgré son importance, les connaissances sur les processus moléculaires mis en jeu restent très parcellaires et son évaluation ne repose jusqu’à ce jour que sur des analyses sensorielles. Or, comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la farinosité est nécessaire à l’amélioration de la qualité du fruit.

Cette étude constitue la première étude transcriptomique globale de la farinosité. Une première étude multi-échelle, intégrant des données transcriptomiques, biochimiques et phénotypiques a été réalisée sur six hybrides issus d’un même croisement et présentant des textures contrastées pour la farinosité. Cette étude a permis d’identifier un gène marqueur précoce de la farinosité, *MdPME2*, codant pour une pectine méthylestérase. Par la suite, une analyse transcriptomique élargie à 34 variétés a permis de mettre en évidence un rôle clé de la voie du jasmonate dans la régulation de la maturation. Les jasmonates semblent orchestrer la voie de biosynthèse de l’éthylène et le stress oxydatif, contribuant ainsi à retarder la mise en place de la farinosité. Par ailleurs, afin de quantifier la farinosité autrement que *via* des analyses sensorielles, un nouveau test a été développé et permettra la validation fonctionnelle de ces résultats.

Finalement, ce travail de thèse permet de proposer un nouveau modèle moléculaire associé au développement de la farinosité en conservation. Une nouvelle définition de ce phénotype est également proposée.

Mots-clés: *Malus domestica*, pomme, texture, maturation, transcriptome, paroi cellulaire, jasmonates

ABSTRACT

“Analysis of gene regulatory networks that govern apple fruit development”

Apple fruit is one of the most consumed fruits in the world. Apple mealiness is an important textural deterioration which occurs during storage. This phenotype refers to a dry and grainy sensory perception during mastication. Despite its significance, this phenotype is still rather poorly characterized, the few available results mostly depending on sensory analyses. Understanding the molecular mechanisms involved in the development of this unwanted character is essential for the improvement of fruit quality and fruit production.

The work presented here is focused on the identification of key genes associated with apple mealiness through global transcriptome analyses. A first multiscale analysis combining transcriptomic, biochemical and phenotypic analyses was performed on pairs of individuals displaying contrasted phenotypes for mealiness. This analysis led us to the identification of one pectin methylesterase gene, *MdPME2*, which appears as an early molecular marker of mealiness in this genetic background. Next, a transcriptome analysis enlarged to 34 cultivars allowed the identification of the jasmonate hormonal pathway as a key driver of apple fruits ripening. By regulating ethylene and oxidative stress pathways, jasmonates appear as a fine-tuning regulator on the postponement of apple mealiness. In addition, a new quantitative test of mealiness has also been developed to allow the validation of this model by means of pharmacological approaches.

The main outcome of this work is to propose a new molecular model to explain apple mealiness development. This work shed light on apple mealiness and suggests a new definition of mealiness.

Keywords: apple, *Malus domestica*, fruit texture, mealiness, ripening, transcriptome, cell wall, jasmonates

RÉSUMÉ

La pomme est un des fruits les plus consommés au monde. Le développement d'une texture farineuse est un caractère rédhibitoire pour les consommateurs et pour la profession. La farinosité renvoie à une texture sèche et granuleuse en bouche qui se développe en cours de conservation. Malgré son importance, les connaissances sur les processus moléculaires mis en jeu restent très parcellaires et son évaluation ne repose jusqu'à ce jour que sur des analyses sensorielles. Or, comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la farinosité est nécessaire à l'amélioration de la qualité du fruit.

Cette étude constitue la première étude transcriptomique globale de la farinosité. Une première étude multi-échelle, intégrant des données transcriptomiques, biochimiques et phénotypiques a été réalisée sur six hybrides issus d'un même croisement et présentant des textures contrastées pour la farinosité. Cette étude a permis d'identifier un gène marqueur précoce de la farinosité, *MdPME2*, codant pour une pectine méthylestérase. Par la suite, une analyse transcriptomique élargie à 34 variétés a permis de mettre en évidence un rôle clé de la voie du jasmonate dans la régulation de la maturation. Les jasmonates semblent orchestrer la voie de biosynthèse de l'éthylène et le stress oxydatif, contribuant ainsi à retarder la mise en place de la farinosité. Par ailleurs, afin de quantifier la farinosité autrement que via des analyses sensorielles, un nouveau test a été développé et permettra la validation fonctionnelle de ces résultats.

Finalement, ce travail de thèse permet de proposer un nouveau modèle moléculaire associé au développement de la farinosité en conservation. Une nouvelle définition de ce phénotype est également proposée.

Mots-clés : *Malus domestica*, pomme, texture, maturation, transcriptome, paroi cellulaire, jasmonates

ABSTRACT

Apple fruit is one of the most consumed fruits in the world. Apple mealiness is an important textural deterioration which occurs during storage. This phenotype refers to a dry and grainy sensory perception during mastication. Despite its significance, this phenotype is still rather poorly characterized, the few available results mostly depending on sensory analyses. Understanding the molecular mechanisms involved in the development of this unwanted character is essential for the improvement of fruit quality and fruit production.

*The work presented here is focused on the identification of key genes associated with apple mealiness through global transcriptome analyses. A first multiscale analysis combining transcriptomic, biochemical and phenotypic analyses was performed on pairs of individuals displaying contrasted phenotypes for mealiness. This analysis led us to the identification of one pectin methylesterase gene, *MdPME2*, which appears as an early molecular marker of mealiness in this genetic background. Next, a transcriptome analysis enlarged to 34 cultivars allowed the identification of the jasmonate hormonal pathway as a key driver of apple fruits ripening. By regulating ethylene and oxidative stress pathways, jasmonates appear as a fine-tuning regulator on the postponement of apple mealiness. In addition, a new quantitative test of mealiness has also been developed to allow the validation of this model by means of pharmacological approaches.*

The main outcome of this work is to propose a new molecular model to explain apple mealiness development. This work shed light on apple mealiness and suggests a new definition of mealiness.

Keywords: *apple, Malus domestica, fruit texture, mealiness, ripening, transcriptome, cell wall, jasmonate, single droplet*



AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc - CS84215 - F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr

