

**2024-2025**

Master 1

Biologie végétale

# **ÉPIGENETIQUE ET TAILLE DU FRUIT CHEZ LE POMMIER**

*Étude comparative des génotypes **GDDH13** et  
**GDDH18***

**AWENN LEFEUVRE**

Date de naissance 25-09-2001

Sous la direction de Claudine Landès

**STAGE REALISE A L'IRHS, EQUIPE VALEMA**

**DU 14-04-25 AU 11-07-25**

Maître ou maîtresse de stage : Jean Marc Celton, Anne-Laure Fanciullino

## **Jury**

Philippe SIMIER : président

Claudine LANDES : directrice

Jean-Marc Celton : membre

Christophe VERONESI : membre

Soutenue publiquement le 01/07/2025



## **Document**



## AVERTISSEMENT

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les travaux des étudiant·es : ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

## REMERCIEMENTS

Je remercie toutes les personnes impliquées dans ce projet, dont mon maître et ma maîtresse de stage, M. Celton et Mme. Fanciullino qui m'ont introduit au sujet du stage, l'un dans le domaine de l'épigénétique et l'autre plus dans l'aspect technique en laboratoire.

De même, un grand merci à Mme. Simonneau et Mme. Rolland du plateau IMAC, m'ayant guidé avec la technique de fixation, dans le processus de coupe au microtome jusqu'à l'analyse sur Intellesis du logiciel ZEN.

Enfin, je remercie M.Hanteville qui m'a montré le labeur, à même le terrain, dans le verger de l'IRHS pour le prélèvement et les mesures du matériel biologique utilisé.

Pour finir, je remercie toute l'équipe qui m'a soutenue la dernière semaine, où plus des trois quarts des coupes ont dû être refaites suite à un malentendu technique. Cette expérience montre que la science est un art entre savoir, communication et entraide.

"Ce n'est pas en regardant la pomme qu'on comprend l'arbre, mais en étudiant comment elle se souvient de ses saisons."

(Henry David Thoreau (Écrivain naturaliste) - Journal, 1852 - adapté pour l'épigénétique)

## ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

*Engagement à signer et à joindre à tous les rapports, dossiers, mémoires ou thèse*

Je, soussigné·e

déclare être pleinement conscient·e que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publié sur toutes formes de support, numérique ou papier, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire cette thèse - rapport - mémoire.

signé par l'étudiant·e le 30 - 05 - 2025

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized letters and a long horizontal stroke.

## GLOSSAIRE

QTL - Quantitative Trait Locus, en lien avec un caractère quantitatif étudié, ici la taille du fruit

$R^2$  - coefficient de détermination en pourcentage de la proportion de variabilité phénotypique d'un QTL

## LISTE DES ABREVIATIONS

GDDH - 'Golden Delicious' Double Haploïde

MM106 - Malling-Merton 106

QTL - Quantitative Trait Locus, en lien avec un caractère quantitatif étudié, ici la taille du fruit

$R^2$  - coefficient de détermination en pourcentage de la proportion de variabilité phénotypique d'un QTL

# SOMMAIRE

Avertissement	
Remerciements	
Engagement de non plagiat	
Glossaire	
Liste des abréviations	
Sommaire	
Introduction	1
Problématique	2
Connaissances bibliographiques	
A - Développement morphologique et physiologique	3
Phase 1 - Avant pollinisation	
Phase 2 - Après pollinisation	
Période 1 - De 0 à 40 jours post-pollinisation	
Période 2 - Entre 40 à 90 jours post-pollinisation	4
Période 3 - stade tardif de maturation	
B - Diversité génétique & épigénétique chez le fruit	
Stratégie & Contraintes	5
Méthodologie	6
A - Matériel biologique	
B - Morphologie des fruits	7
C - Histologie et microscopie	
D - Analyse statistique	9
Résultats	10
A - Morphologie des fruits	
Diamètre	
Masse fraîche	
B - Histologie et microscopie	11
Données manuelles & semi-automatisée	13

Données automatisées	14
Discussion	15
Rappel	
A - Effet lignées ou asynchronie entre lignées	
B - Limites des analyses d'histologie & microscopie	16
C - Différence de taille des fruits entre génotypes et conservation de celle-ci chez les arbres mères	17
D - Lien différence de taille de fruit & différence de méthylation d'ADN	19
Conclusion	20
Annexes	
ANNEXE I	
ANNEXE II	
ANNEXE III	
ANNEXE IV	
ANNEXE V	
Bibliographie	
Table des illustrations	
Table des tableaux	
Table des graphiques	
Table des matières	
Abstract	
Résumé	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

# INTRODUCTION

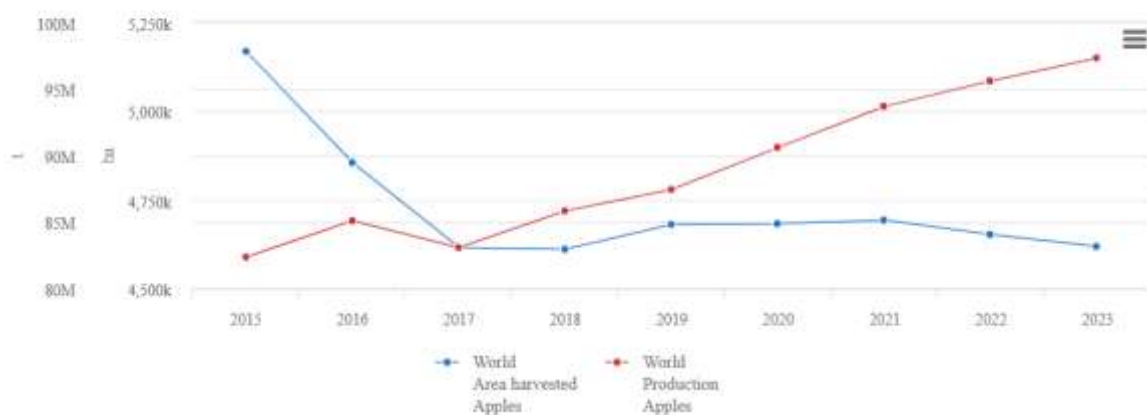
La pomme, l'un des fruits les plus produits et consommés au monde (INRAE, 2020), voit ses variétés forgées par des critères de qualité (taille, goût, texture). Face aux défis climatiques et sanitaires, l'arboriculture doit donc développer des variétés résilientes. C'est l'un des objectifs de l'équipe VALEMA (VALorisation of Epigenetics Marks in plAnts), intégrée à l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) d'Angers. L'IRHS regroupe 14 équipes de recherche autour de thématiques tel que le biocontrôle ou le développement d'outils innovants, et dispose de plateaux techniques mutualisés, dont le plateau d'imagerie cellulaire (IMAC), clef de voûte pour les analyses histologiques, la microscopie et l'exploitation d'images via le Machine learning.

L'équipe VALEMA développe deux axes principaux : l'étude de l'adaptation du pommier aux stress abiotiques (chaleur, sécheresse) à travers les marques épigénétiques, en s'intéressant notamment au rôle des éléments transposables (TE) et de la méthylation de l'ADN ; et l'analyse de la qualité des fruits (taille, polyphénols), via des mécanismes écophysiologiques et épigénétiques. L'objectif est de faire de l'épigénétique un levier innovant pour la sélection variétale. Celle-ci, correspondant à des modifications de l'expression des gènes sans altération de la séquence ADN, est transmissible par mitose et partiellement par méiose (Perrin, 2020). L'enjeu est de déterminer si un caractère épigénétique peut être hérité par reproduction sexuée. L'objectif est d'étudier l'héritabilité des marques épigénétiques associées à la taille du fruit chez le pommier. Pour cela, deux génotypes, GDDH13 et GDDH18 [doubles haploïdes issus de *Malus domestica* 'Golden Delicious'] présentant des différences de taille de fruits liées à des variations épigénétiques, ainsi que leurs descendants issus de la reproduction sexuée seront phénotypés.

Cette étude vise à élucider la transmission épigénétique et les mécanismes différenciant les deux génotypes GDDH, éclairant ainsi les interactions génome-environnement. Une telle avancée offrirait des outils innovants pour la sélection variétale, intégrant des marques épigénétiques hérissables complémentaires à l'ADN. Des travaux antérieurs (Daccord et al., 2017) ont montré que la méthylation de l'ADN influence la division cellulaire, affectant la taille et la maturation du fruit via des voies comme l'éthylène. L'épigénétique permettrait ainsi d'optimiser des traits agronomiques (taille, fermeté, rendement) de manière plus fine et adaptative. Comprendre l'impact des mécanismes épigénétiques sur le phénotype et leur hérissabilité est crucial, tant scientifiquement qu'économiquement. Une transmission confirmée ouvrirait les portes à une nouvelle stratégie de sélection, dynamique et respectueuse de l'environnement, optimisant les performances tout en offrant une alternative naturelle aux OGM, socialement mieux acceptée.

# Production/Yield quantities of Apples in World + (Total)

2015 - 2023



Graphique 1 : Production de pommes dans le monde entre 2015-2023 d'après FAOSTAT (Food and Agriculture Organization)

# PROBLEMATIQUE -

## PROBLEMATIQUE

Suite à l'analyse génomique de deux génotypes GDDH plantés sur le site de l'IRHS en 1980, il a été observé que, malgré une séquence génomique similaire, les deux arbres - GDDH13 et GDDH18 - présentent une différence de taille du fruit (Figure 1). En effet, le génotype 13 produit de grands fruits alors que son homologue, le GDDH18, forme des petits fruits (Figure 2, Daccord et al. 2017). Ces génotypes étant auto-compatibles, des descendants ont été obtenus par auto-fécondation des pieds mères, dans le but d'analyser les caractères morphologiques et épigénétiques transmis à la descendance.

Problématiques : les fruits des plants issus d'autofécondation des pommiers GDDH13 et GDDH18 possèdent-ils les mêmes caractéristiques que leurs parents ? Si les différences de tailles de fruits sont conservées, les marques épigénétiques différenciant GDDH13 et GDDH18 sont-elles aussi présentes chez leurs descendants ?

## CONNAISSANCES BIBLIOGRAPHIQUES

La pomme (*Malus domestica*), l'un des fruits les plus consommés au monde, représente une production annuelle de 84,6 millions de tonnes (INRAE, 2020). 'Golden Delicious' est une des 5 espèces de pommiers les plus cultivés à l'échelle mondiale avec 'Gala', 'Red Delicious', 'Fuji', et 'Idared' en 2015 (Produce report, 2018 - <https://www.producereport.com/article/global-trends-apple-innovation>). 'Golden delicious', en particulier, est utilisée comme géniteur dans de nombreux croisements en raison de ses qualités agronomiques. À noter que le pommier possède une auto-incompatibilité qui fait qu'il n'est compatible qu'entre génotypes différents.

À l'origine, le pommier cultivé, '*Malus domestica*' (Borks) est le résultat d'un processus de croisement et de domestication d'espèces sauvages, ayant conduit à l'émergence de cultivars à grand fruit. Originaire d'Asie centrale, notamment du Kazakhstan, le pommier domestiqué est arrivé en Europe via la route de la soie et est un fruit issu d'un processus complexe d'hybridation entre '*Malus sieversii*' avec '*Malus sylvestris*', un pommier sauvage Asiatique et Européen (Duan et al., 2017) voir Figure 3. Les événements interdépendants suivants vont déterminer le développement reproductif et la taille du fruit : formation et développement des bourgeons floraux, floraison, pollinisation, fécondation, nouaison et développement du fruit et maturation.





Figure 1 : Visuel des différences de tailles de GDDH13 & GDDH18 à maturité comparé à la 'Golden Delicious' (Daccord et Celton, 2017)

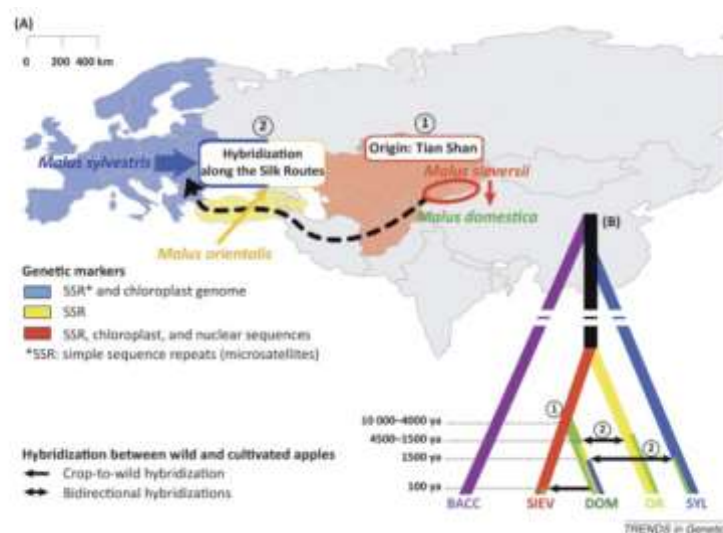


Figure 2 : parcours évolutif de la pomme dans l'histoire = '(A) Cette histoire a été révélée par des études de population récentes utilisant différents types de marqueurs moléculaires pour les déductions évolutives. (1) Origine dans les monts Tian Shan à partir de *Malus sieversii*, puis (2) dispersion de l'Asie vers l'Europe le long de la Route de la soie, facilitant l'hybridation et l'introgression à partir des pommiers du Caucase et d'Europe. L'épaisseur des flèches est proportionnelle à la contribution génétique des différentes espèces sauvages au patrimoine génétique de *Malus domestica*. (B) Relations généalogiques entre les pommes sauvages et cultivées. Les dates approximatives des événements de domestication et d'hybridation entre les espèces sauvages et cultivées sont détaillées dans la légende. Abréviations : BACC, *Malus baccata* ; DOM, *M. domestica* ; OR, *Malus orientalis* ; SIEV, *M. sieversii* ; SYL, *Malus sylvestris* ; ya, il y a des années.' (Cornille, 2014)

Ces évènements peuvent être regroupés en deux stades, avant et après pollinisation :

## **A - Développement morphologique et physiologique**

### **Phase 1 - Avant pollinisation**

Suite à la floraison de la saison précédente, s'ensuit une phase d'endodormance pendant l'hiver, puis la fleur atteindra sa forme complète (figure 4) après l'écodormance entre janvier et mars. À maturité, le fruit est composé de 40 couches cellulaires, à la fois pour GDDH13 que pour GDDH18 comme le montre le Graphique 2, ce qui amène donc à la pollinisation (Daccord, Celton et al, 2017). Le pollen se dépose sur le stigmate. Ce produit alors une double fécondation formant la base du trognon : un des spermatozoïdes fusionne avec l'ovule et donne le zygote embryonnaire, donnant les pépins ; puis le deuxième spermatozoïde fusionne avec les noyaux des cellules centrales, donnant l'endosperme qui sert à nourrir le zygote et qui forme les loges du carpelle. Et c'est l'ovaire de la fleur qui donnera la partie charnue étudiée ici de ce fruit complexe.

### **Phase 2 - Après pollinisation**

Suite à la fécondation, soit pollinisation, vient la nouaison, l'auxine tout autant que la gibbérelline va maîtriser cette croissance et favoriser la division cellulaire. Pour finir, survient l'expansion cellulaire, par conséquent l'augmentation de taille progressive des fruits. Ce processus est segmenté en 3 périodes :

#### **Période 1 - De 0 à 40 jours post-pollinisation**

Cette période implique l'action d'une pléthore de phytohormones, dont l'auxine et la gibbérelline, impliquées dans les signaux précoces de nouaison et jouent un rôle important dans l'évolution du volume de la pomme (Renaudin et al., 2017). En plus, il existe les cytokines et les brassinostéroïdes. Concernant les cytokines, l'acide abscissique et l'éthylène, ces phytohormones favorisent la production cellulaire tout comme la maturation du fruit (Jahed et al., 2023).

Entre 0-40 jours, le cycle cellulaire redémarre avec de la division cellulaire. De ce fait, entre le 3ème et le dixième jour, le volume du fruit augmente : le diamètre croît de 60 %, Graphique 3. Celui-ci gagne environ 7 couches cellulaires pendant les 8 premiers jours par division cellulaire. Entre le 8-11 jour après pollinisation, le nombre de couches cellulaires croît ensuite de 50 % et la taille cellulaire suit ce phénomène. La majorité des différences entre fruits apparaît durant cette période. Ainsi, le diamètre évolue exponentiellement jusqu'à 32 jours puis atteint une courbe linéaire (Malladi et al., 2011).

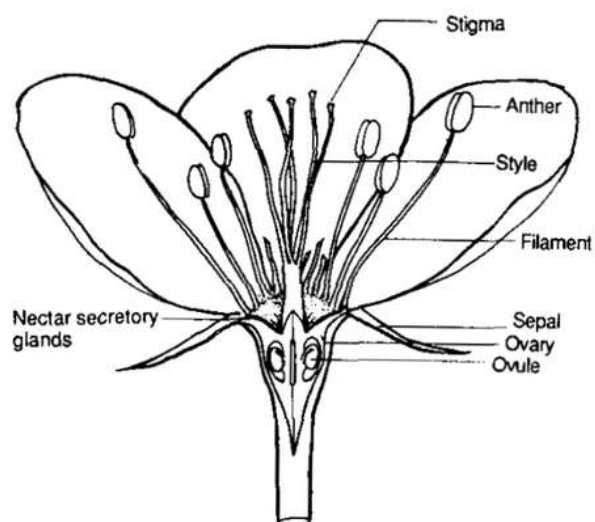


Figure 3 : Observation des différentes sections d'une fleur de pommier segmentée en deux.  
Sources - Prade, 1998

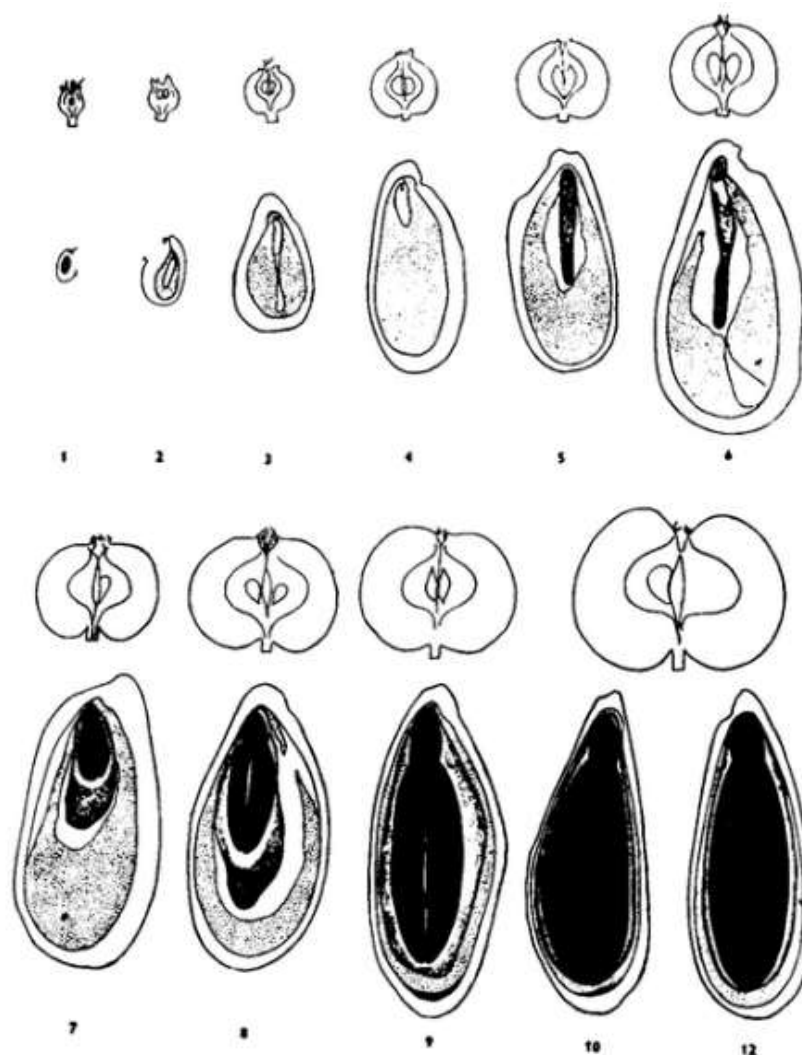


Figure 4 : évolution du fruit de pommier (et de son pépin) post-pollinisation Sources - Prade, 1998

## **Période 2 - Entre 40 à 90 jours post-pollinisation**

Suite à la division cellulaire, les cellules vont réaliser une expansion cellulaire dans cette deuxième période. Le volume cellulaire pris grâce à cette expansion va impacter la taille du fruit final tout comme le nombre de cellules formées, le tout se jouant sur la capacité des cellules à accumuler de l'eau et à s'étendre (Malladi et al., 2011).

## **Période 3 - stade tardif de maturation**

Le volume maximal sera atteint après la fin de l'expansion cellulaire, plus ou moins longue en fonction de la taille maximale prédéterminée du fruit. La croissance du fruit s'arrête, puis arrive la phase de maturation et par conséquent de multiples changements biochimiques. Au total, le fruit atteint 120 couches cellulaires maximum, Graphique 14. Ce nombre de couches sera différent entre GDDH13 avoisinant les 110 couches alors que GDDH18 tend vers les 50 couches à J28 (Daccord et Celton et al., 2017).

## **B - Diversité génétique & épigénétique chez le fruit**

L'explosion des éléments transposables (séquences d'ADN mobiles) il y a 21 millions d'années a engendré une importante diversité génétique chez le pommier (Daccord et Celton, 2017). Cette diversité s'explique non seulement par les variations de séquence d'ADN, mais aussi par les modifications épigénétiques. Aujourd'hui, cette combinaison se traduit par l'existence de milliers de variétés de pommes à travers le monde (Lespinasse, Agri Mutuel, 2023).

Mais qu'entend-on précisément par épigénétique ? Il s'agit de modifications de l'expression génique indépendantes de la séquence d'ADN, transmises par mitose et potentiellement par méiose (Perrin, 2020). Ces mécanismes répondent aux stress environnementaux : une contrainte ponctuelle induit des changements épigénétiques réversibles, avec retour au phénotype initial après disparition du stress (Jahed et al., 2023). L'exemple du cultivar Mutsu est parlant : normalement dépourvu de coloration rouge, un simple conditionnement en papier (avec retrait du sac) provoque des modifications épigénétiques activant la production d'anthocyanes, d'où l'apparition d'une teinte rouge (Bai et al., 2016). Notre étude vise concrètement à déterminer si de tels caractères épigénétiques peuvent se transmettre par reproduction sexuée.

L'épigénétique confère une remarquable plasticité transcriptionnelle en modulant la compaction de l'ADN via les histones. Deux états s'opposent :

- L'hétérochromatine (forme compactée, transcriptionnellement silencieuse)
- L'euchromatine (forme relâchée, permettant l'expression génique)



*Figure 5 : illustration de l'organisation d'une corymbe de pommier, la fleur centrale au milieu avec ici 4 fleurs latérales. Dessin - AL, Photo - wirestock de freepik (licence gratuite)*

Cette dynamique repose sur des modifications biochimiques comme la méthylation (addition de CH<sub>3</sub> en position 5 des cytosines, favorisant l'hétérochromatine) ou son inverse, la déméthylation. Contrairement aux animaux où la méiose efface quasi-totalement ces marques, les végétaux maintiennent partiellement ces signatures épigénétiques lors de la reproduction sexuée, tout en les conservant systématiquement en mitose. Les données suggèrent que certaines modifications persistent dès la première génération (Jahed et al., 2023), ouvrant la perspective d'une héritabilité stable.

Rappelons que le pommier cultivé possède 17 chromosomes (649.3 Mégabases) comprenant 42 140 gènes (INRAE, 2020). Parmi ceux-ci, 10 gènes régulent spécifiquement la croissance et le développement des fruits, avec deux QTL\* majeurs influençant la taille ( $R^2 = 15.4\%$  et  $40.4\%$ ), comme démontré par Jahed et al. (2023).

## STRATEGIE & CONTRAINTES

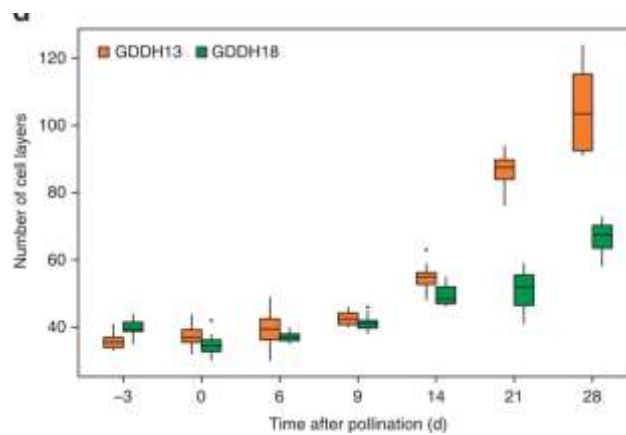
Pour étudier cette héritabilité, le protocole suivant a été mis en place : les géotypes autofécondés, issus d'autofécondation contrôlée sous cages avec bourdons pour éviter les pollinisations croisées, ont permis de générer les descendants des géotypes parentaux GDDH13 et GDDH18. Deux arbres par géotype (mère, autofécondé) ont été étudiés. Pour suivre la croissance des fruits, le diamètre des réceptacles floraux a été mesuré sur deux fleurs par corymbe (32 corymbes/arbre, total 64 mesures), Figure 5. En parallèle, des analyses histologiques ont été réalisées sur des échantillons inclus en résine, colorés au bleu de toluidine et observés au microscope ZEISS . Le nombre de cellules a été quantifié manuellement (Image J) ou via ZEN 3.5 (Machine Learning). À J20, les corymbes restants ont été récoltés pour l'analyse de masse fraîche et sèche après lyophilisation.

Contraintes - Complexité du contrôle environnemental (chancre *Nectria galligena* sur GDDH18) ; Variabilité météorologique et hétérogénéité lumineuse (distinction faces nord/sud) ; Synchronisation phénologique cruciale pour la pollinisation et les prélèvements.

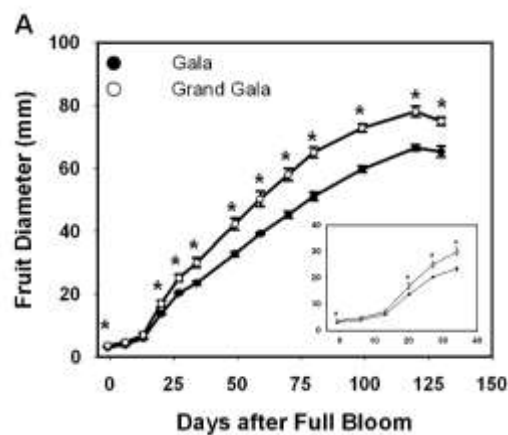
Ces limites (chancre, asynchronie, lumière) pourraient influencer les résultats, mais seront analysées en partie Résultats.

\*voir

glossaire



Graphique 2 : Quantification du nombre de couches cellulaires dans le parenchyme des fruits GDDH13 (orange) et GDDH18 (vert) évalué par méthode manuel (Daccord et Celton, 2017)



Graphique 3 : Comparaison de la croissance des fruits entre 'Gala' et 'Grand Gala'. (Malladi et al., 2011)



Figure 6 : pipeline du processus d'obtention des génotypes autofécondés jusqu'au prélèvement des échantillons (Yves Lespinasse, 2014, communication personnelle).

# METHODOLOGIE

## METHODOLOGIE & STATISTIQUE

### A - Matériel biologique

L'étude repose sur deux génotypes parentaux, GDDH13 et GDDH18, issus d'un processus ayant pour objectif l'obtention de double haploïdes. Le travail réalisé avant l'obtention des génotypes ont été schématisés sur la Figure 6. L'obtention d'un double haploïde (DH) permet l'obtention de génotypes stables en 2 générations, contrairement à la méthode traditionnelle qui demande 6 à 8 générations. Après avoir obtenu l'haploïdie, les chromosomes sont doublés dans le but d'obtenir un plant diploïde et homozygote (Planet Vie, 2017). À noter que ce genre d'accèsion est plus sensible qu'un pommier lambda aux maladies et que son taux de fructification est moins haut. De ce fait, il est plus complexe de garder en état cette obtention végétale. Les génotypes parentaux, ainsi récupérés par la méthode des doubles haploïdes, ont été obtenus in vitro (Lespinasse, 2014). Ces génotypes homozygotes simplifient les études à l'échelle du génome.

Les génotypes mère étudiés ont été cultivés sur le site de l'IRHS à Angers, greffés sur porte-greffe MM106. Ce porte-greffe est couramment utilisé et connu, il est semi-vigoureux et son obtention se fait par marcottage (Jean-Christophe Grolleau GAB65, 2023). Les génotypes autofécondés sont ensuite formés afin de pouvoir les comparer avec leurs parents, le but étant d'observer si les caractéristiques phénotypiques sont maintenues et, par supposition, leurs caractéristiques épigénétiques. Les pépins ainsi produits ont été récoltés et mis en culture, puis greffés sur MM106, pour obtenir les descendants utilisés dans les analyses morphologiques et histologiques.

Deux arbres par génotype et lignée (GDDH13, GDDH18, mère, autofécondé) étaient disponibles au champ. Afin de suivre la cinétique de croissance des fruits, une mesure du diamètre des réceptacles floraux/fruits de deux fleurs latérales par corymbe a été effectuée, soit un total de 64 mesures (32 corymbes, schéma d'une seule corymbe en Figure 5) par arbre et pour chaque date. En effet, deux fleurs par corymbe ont été sélectionnées pour pallier la chute des fruits et être sûr d'en conserver à minima une par corymbe. Les réplicats sont les corymbes. Pour chaque corymbe, les trois autres fleurs ont été éliminées et les fleurs sélectionnées ont été pollinisées manuellement le même jour à J0.

Pour les analyses d'histologie et de microscopie une sous-échantillonnage a été effectué avec pour chaque condition (génotype et lignée), et chaque date de prélèvement, la sélection de 4 corymbes et d'un fruit par corymbe (voir Figure 7).

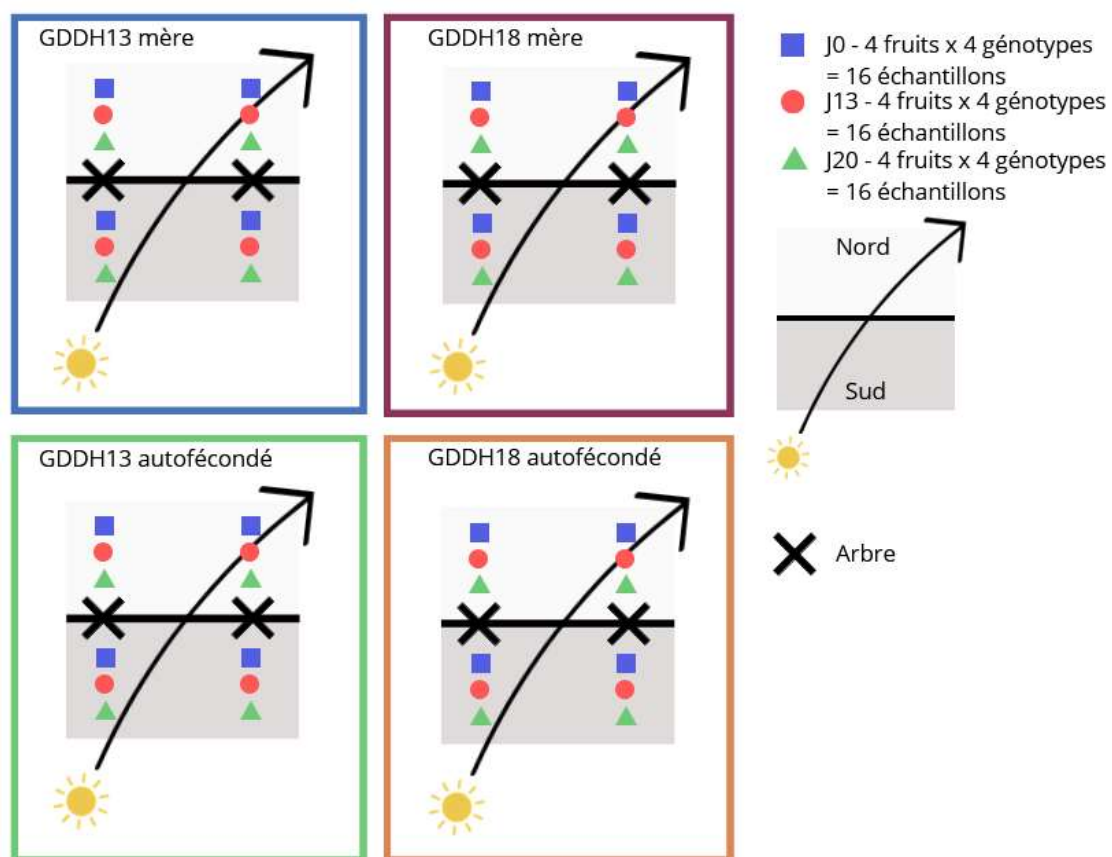


Figure 7 - récapitulatif du matériel biologique en verger utilisé à J0, J13, J20 après pollinisation, avec GDDH13 & 18 mères comme autofécondés.

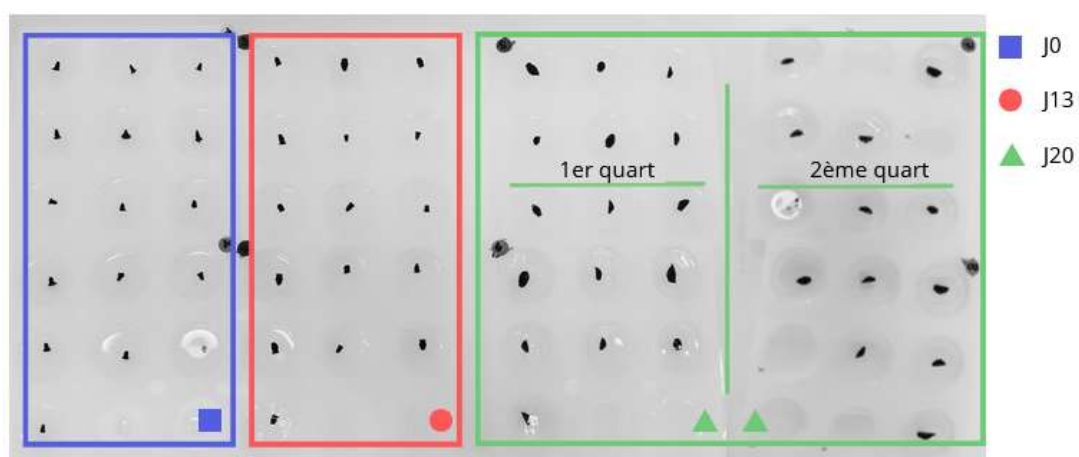


Figure 8 - photo de l'ensemble des échantillons J0, J13, J20 misent en résine époxy. Photo : A. Lefevre

## B - Morphologie des fruits

Diamètre - Pour étudier la cinétique de développement des fruits, des mesures de diamètre ont été effectuées à différents stades post-pollinisation : J0, J2, J6, J9, J13, J20 de 2 fleurs latérales par corymbes, soit ici 64 mesures pour 32 corymbes dans le but de suivre la cinétique de croissance initiale des fruits issus de fleurs pollinisées de pommier pour chaque condition : deux génotypes GDDH13 et GDDH18 et deux lignées mère et autofécondé. Masse fraîche - À J21, récupération des corymbes restantes pour déterminer leur masse fraîche après lyophilisation. L'évaluation de ces valeurs permet de quantifier indirectement la différence de taille par l'analyse de la masse fraîche produite.

## C - Histologie et microscopie

L'analyse histologique vise à quantifier l'augmentation du nombre de couches cellulaires et de cellules dans les fruits à différents temps après pollinisation pour les deux génotypes GDDH13 et GDDH18 et les deux lignées mère et autofécondé.

D'abord a lieu la récupération des fruits, la fixation de ceux-ci, puis découpe au microtome [RM2165 Leica, 2001 ; Fournisseur : Leica Biosystems, Allemagne] suivie d'une coloration au bleu de toluidine [Dilué à 10 % ; Fournisseur et pays d'origine : France] et enfin une analyse en microscopie [Zeiss AXIO Imager Z2, 2013 ; Fournisseur et pays d'origine : Allemagne] jusqu'à la récupération de données via le Machine Learning [ZEN 3.5, blue edition ; Carl Zeiss, 2021 ; Fournisseur et pays d'origine : Allemagne]. Le but est de déterminer la quantité de cellules entre la fin du trognon (début de l'ovaire) et la paroi externe. Des échantillons ont été prélevés à J0 soit le stade ballon où l'on observe le gonflement des pétales avant l'ouverture florale, J13, J20 après pollinisation pour chaque génotype mère et autofécondé du verger. En tout, sont prélevés 16 échantillons par point de récolte, comme le réexplique la Figure 7.

Après vient l'étape de fixation des échantillons. Le matériel biologique est fixé avec un monomère de glutaraldéhyde [Dilué à 25 % ; Fournisseur : Delta Microscopie, fabriqué aux Etats-Unis], pénétrant plus facilement dans les tissus, celui-ci crée des ponts artificiels entre les protéines et les groupes aminés libres ce qui préserve la structure de la matrice extracellulaire et garde de ce fait le sujet à l'état vivant. Cette étape sert à étudier la façon dont l'organe augmente son volume global et le contenu présent. En effet, la différence de taille est soit due à une augmentation du nombre de cellules par division, soit à une expansion cellulaire qui est permise grâce à une turgescence cellulaire et au relâchement des parois (Makkar, 2008). L'usage de glutaraldéhyde, malgré le fait qu'il soit CMR, est une des meilleures méthodes connues à ce jour, car il se fixe rapidement et fortement à la



Figure 9 : coupe horizontale de pomme mature lambda au centre du fruit et observation des différences d'épaisseurs entre les zones charnues de deux loges du trognon dû à la forme patatoïde de celui-ci. Sources : freepik, licence gratuite.

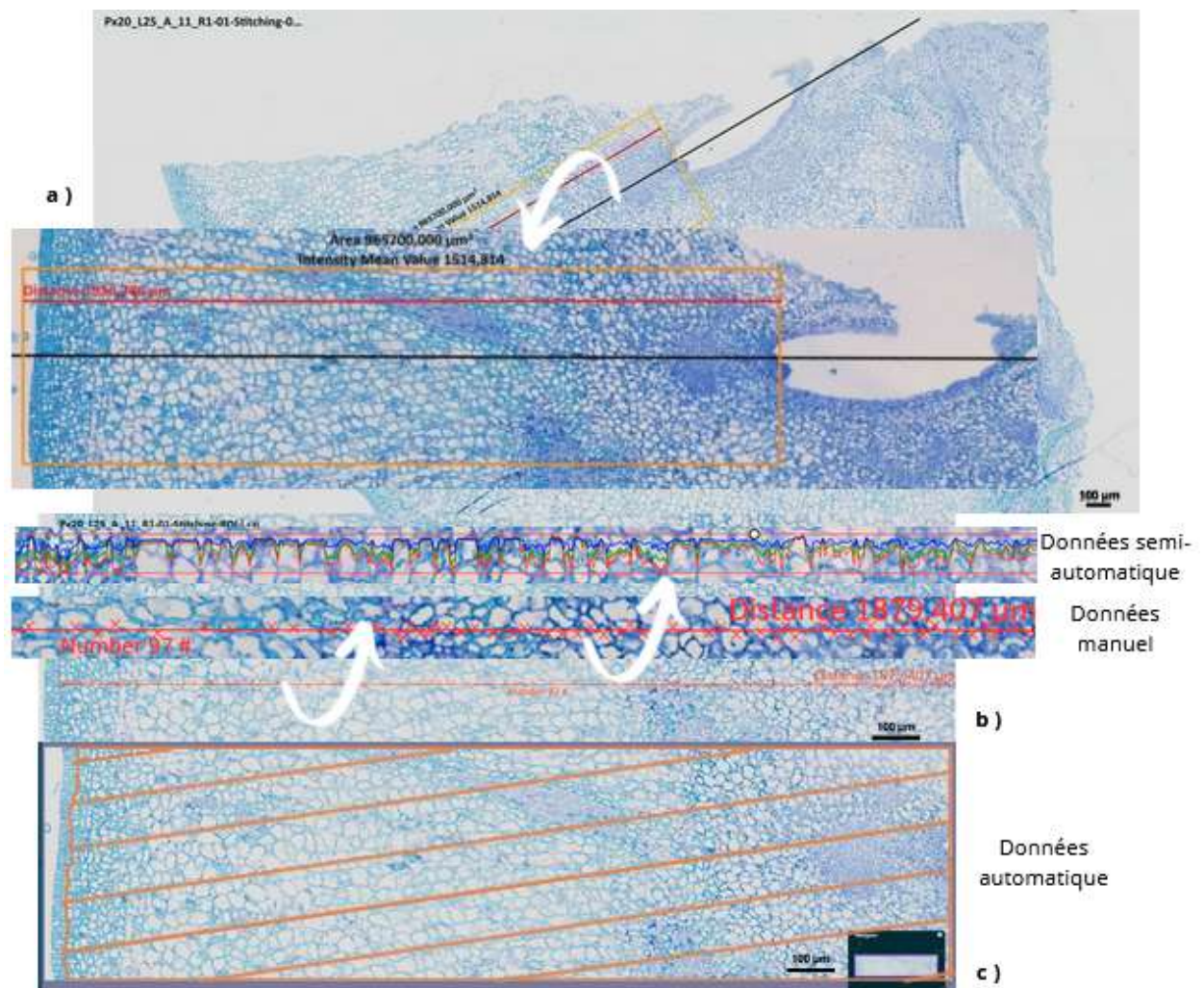


Figure 10 : définition de la zone ROI (Région d'intérêt) et de ces paramètres de sorties ; (a) découpage de ROI aligné à l'axe du fruit avec une largeur de 500 µm fixe ; (b) mesure manuel de la taille du mésocarpe, comptage manuel et via l'intensité du nombre de couches cellulaires ; (c) sélection du mésocarpe sur Intellesis, partie orange, et sortie de l'airecellulaires moyennes comme du nombre de cellules présentes dans ROI. Sources : ZEN

structure interne. En plus, il cause une très faible déformation des tissus, a une bonne compatibilité avec l'enrobage en résine et excelle dans la conservation, tant pour les membranes que pour l'organisation subcellulaire. Ses points faibles sont sa lourdeur à l'application. En effet, cette technique est longue et demande une forte consommation de tampons.

Une fois fixés, les échantillons sont inclus en résine Figure 8. A noter que pour entrer dans les moules d'inclusion, le matériel biologique de plus de 4 mm est divisé en deux dont est récupérée une moitié, et ceux de plus de 5 mm sont divisés en quatre morceaux dont 2 quarts sont récupérés pour la mise en résine juste avant l'étape de fixation. Dans cette perspective d'inclusion, le matériel biologique est dans un premier temps déshydraté à l'aide de concentrations croissantes d'éthanol jusqu'à être placé en résine. Dans cette section, le choix de la résine à la place de la paraffine a été fait, car la résine époxy est plus adaptée à des coupes fines et à une analyse sous microscope électronique que son concurrent. Les échantillons entrent alors dans tout un processus, comme expliqué Figure 11, allant de la coupe à l'analyse. Les blocs de résine sont ensuite affinés avec une lame de diamant au Micracut 152 [Fournisseurs et pays d'origine: USA] et collés sur des blocs de bois découpés de même au Micracut. Enfin, au microtome, la résine époxy est ciselée en coupes de 3  $\mu\text{m}$ , suivie d'une coloration au bleu de toluidine à 0.1% pendant 15 secondes [Fournisseur et pays : France]. Vient alors la récupération des meilleures coupes à observer au microscope électronique ZEISS au x20 dont les images sont ensuite analysées par Machine Learning avec la fonction Intellesis du logiciel ZEN.

Le processus mis en place étant nouveau, sa conception sera détaillée ultérieurement dans la partie Résultats, mise en place en collaboration avec le plateau IMAC. Pour résumer, deux régions par échantillon sont sélectionnées, allant du centre à la périphérie des échantillons J20 préparés. L'objectif principal est de mesurer la distance entre l'extrémité des loges du trognon et la périphérie du fruit, en suivant au mieux son axe pour déterminer l'épaisseur du mésocarpe, zone qui détermine les différences de taille du fruit. Les pommes présentent un trognon composé de cinq loges du trognon de tailles globalement similaires, toutefois la taille de la partie charnue diffère, ce qui induit des variations (Figure 9). Dans la majorité des quarts de fruit, une seule loge peut être prélevée, rendant difficile la distinction de la longueur la plus conséquente ; l'idéal étant de d'avoir la distance de l'épaisseur du mésocarpe la plus grande. Une fois la région d'intérêt (ROI) définie (Figure 10), l'IA est entraînée en manuel par coloriage à différencier deux classes : cellules et membranes. Ensuite, une mesure manuelle de la distance de la ROI est effectuée, ainsi que le nombre de cellules le long de l'axe du fruit. La densité cellulaire est calculée via Intellisys en analysant le nombre de cellules et leur surface individuelle. La largeur de la ROI est fixée à 500  $\mu\text{m}$  pour standardiser les mesures. Une vérification que cette zone est

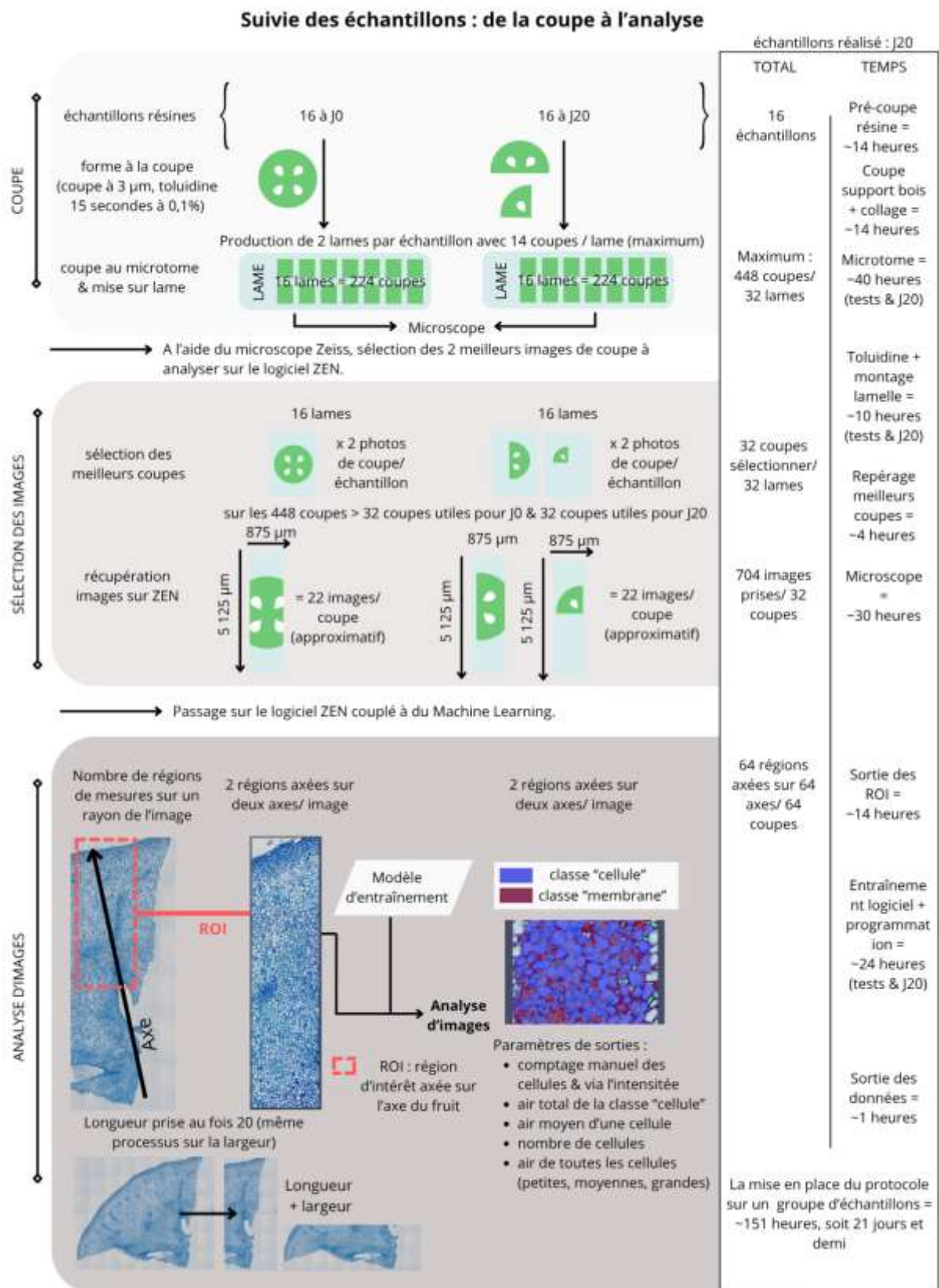


Figure 11 : organisation à chaque étape du processus allant de la coupe des blocs de résines à l'analyse sous Machine Learning de ZEN. Sources : ZEN

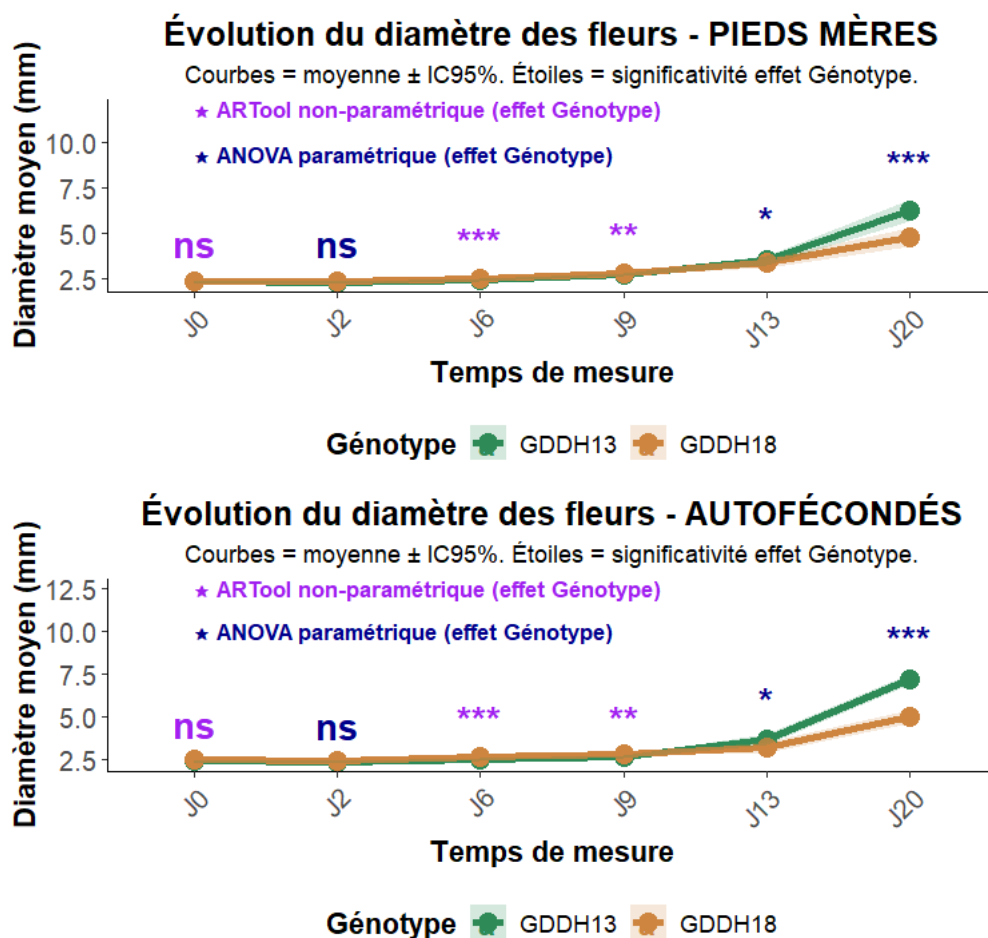
compatible avec toutes les coupes J0, J13 comme J20 a été validée. La présence d'une loge dans les coupes au microtome confirme que la position au centre du fruit, permettant une mesure cadrée de la distance maximale de l'épaisseur du mésocarpe.

Pour certifier le comptage manuel, une méthode semi-automatisée est entreprise : une analyse d'intensité des pixels est appliquée sur une image sur 10. Des trois couleurs primaires en imagerie RVB, est pris le canal rouge, car, comme notre coloration est bleue, la lumière réfléchie le plus est le rouge. Chaque membrane bleue du graphique absorbe préférentiellement les longueurs d'onde rouges (loi de Beer-Lambert), émettant notre signal d'intensité, tandis que l'intérieur des cellules (quasi blanc) réfléchit davantage la lumière. Ainsi, en récupérant le profil le long d'une ligne de cellule, le nombre de membranes traversées peut être compté et par conséquent le nombre de cellules présentes du trognon à la périphérie. Un pic correspond au bord d'une cellule et un creux à l'intérieur des cellules.

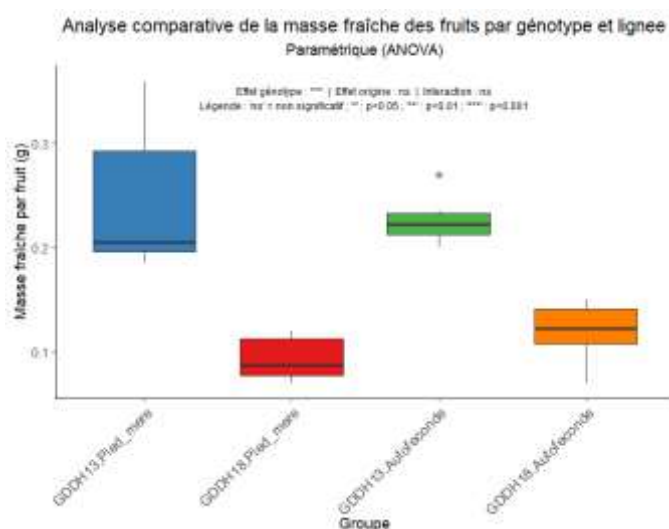
## **D - Analyse statistique**

Pour comparer les résultats des quatre groupes, GDDH18 et GDDH13 mère comme autofécondé, nous avons fait pour les graphiques avec un temps de prélèvements des tests d'homogénéité de variance et de normalité des résidus suivis d'une ANOVA à deux facteurs (facteur génotype et facteur lignée) en paramétrique, si les conditions sont respectées, ou d'une artANOVA en non paramétrique, si les conditions ne sont pas respectées : ( $\text{Diametre\_moy} \sim \text{Lignee} * \text{GDDH}$ ). Si une significativité est démontrée entre lignées, les génotypes seront analysés séparément pour chaque lignée avec le même principe de choix de test qu'ultérieurement. Le tout accompagné d'un intervalle de confiance de 95 %. Cela est effectué pour comparer le diamètre moyen des fruits entre les quatre groupes. Le même processus est appliqué pour comparer les diamètres, la masse fraîche du fruit entre les quatre génotypes et la partie histologie :

- Manuel - cela est effectué pour comparer la distance moyenne dans un premier temps, puis le nombre de couches cellulaires comprenant le mode manuel et semi-automatisé dans un deuxième temps, compris donc dans l'épaisseur du mésocarpe du fruit entre les quatre génotypes
- Automatisé - cela est effectué pour comparer le nombre total de cellules de la zone ROI (Région d'intérêt) dans un premier temps puis la surface moyenne d'une cellule de la zone ROI, compris donc dans l'épaisseur du mésocarpe du fruit entre les quatre génotypes.



Graphique 5 : cinétique de croissance de comparaison des diamètres des fruits moyen des génotypes GDDH, pour chaque lignée ; Barres semi-opaques : moyenne et intervalle de confiance e 95% - significativité : \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , .  $p < 0.1$ , ns  $p = 0.1$ . Test statistique : ANNEXE I



Graphique 6 : comparaison de la masse fraîche des échantillons à J21. Tests statistiques

## RESULTATS

### A - MORPHOLOGIE DES FRUITS

#### Diamètre

Le Graphique 5 et le tableau 1 de l'ANNEXE I, illustrant la cinétique de croissance des diamètres moyens de fruits mesurés sur le terrain, compare les quatre groupes : GDDH13, qui forme de grands fruits, et GDDH18, qui en forme de petits ; avec, pour les deux, les lignées mère et autofécondé. Il est attendu que les diamètres des fruits de GDDH13 soient plus importants vers J21 par rapport à ceux de GDDH18. Ici, le graphique a été fait en séparant les conditions des lignées car il y a une différence existante significative. La lignée autofécondée prend l'avantage face à la lignée mère. Les résultats confirment l'hypothèse initiale à J20. Durant la période J0-J2, les diamètres moyens (2.4 mm) ne montrent aucune différence significative ( $p > 0.05$ ) pour l'effet génotype. Durant la période J6-J13, de 2.7 mm à 3.4 mm, l'ANOVA non paramétrique montre une différence significative persistante après J6 pour l'effet génotype, bien démarqué sur le Graphique 5. Enfin, à J20 comme confirmé par l'ANOVA, le diamètre est à 4.9 mm pour GDDH18 (la génération mère à 4.76 mm présente un diamètre significativement inférieur que les autofécondée à 5.04 mm) générations confondus et 6.7 mm pour GDDH13 (la génération mère à 6.25 mm présente un diamètre significativement inférieur que les autofécondée à 7.21 mm), la tendance s'inverse : le facteur taille des génotypes se distingue avec une p-value inférieure à 0.001, avec une taille accrue pour les autofécondée.

Il est donc constaté que, de J13 à J20, une différence notable apparaît entre les deux groupes GDDH. GDDH13 se distingue par sa taille, atteignant une moyenne de 6.7 mm à J20, contre 4.9 mm pour GDDH18, soit une marge de 1.8 mm. Quant aux lignées, les génotypes autofécondés, particulièrement de GDDH13 avec une différence de 1 mm, semblent avoir une croissance prépondérante aux mères.

#### Masse fraîche

Le Graphique 6, illustrant la masse fraîche des fruits mesurés à J21 réalisé sur les échantillons J20, compare les quatre groupes évoqués précédemment. Il est donc attendu que la masse fraîche des fruits de GDDH13 soit plus importante vers J21 par rapport à celle de GDDH18. Les résultats confirment l'hypothèse initiale à J20. GDDH13 a une moyenne de masse fraîche de 0.24 g tandis que le génotype, GDDH18, s'en tient à une masse fraîche de 0.1 g, soit un écart de 0.14 g. Aucun effet lignée n'est constaté.

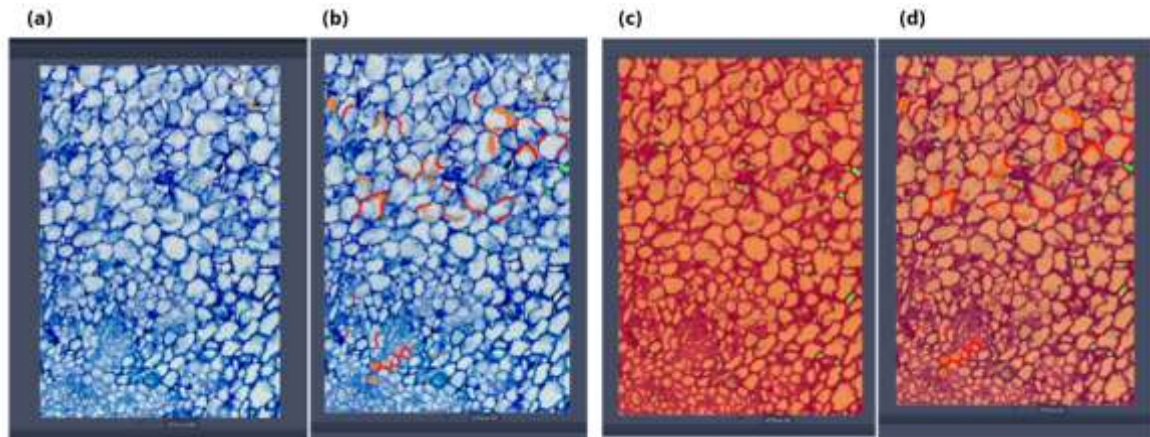


Figure 12 : Création du modèle d'apprentissage : processus de segmentation des pixels en classes au sein d'un échantillon J14 après pollinisation et coupé à 3 mm avec une coloration de 3 secondes à 0,1% de toluidine ; (a) état de base de l'image ; (b) segmentation à main levée des diverses classes ; (c) segmentation réalisé par le Machine Learning, Intellect, après apprentissage ; (d) visualisation des deux types de segmentation, manuelle et automatique. Sources : ZEN

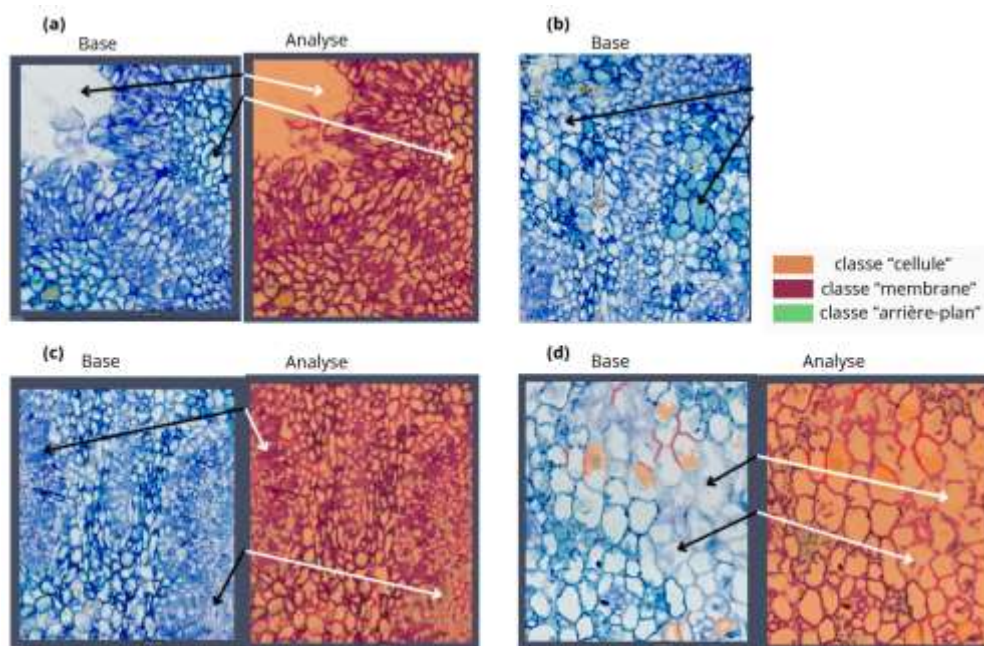


Figure 13 : Contraintes techniques de l'analyse : observation des variations présentes au sein d'un échantillon J14 après pollinisation coupé à 3 mm avec une coloration de 3 secondes à 0,1% de toluidine avant et après analyse ; (a) Le fond en résine a la même composition que l'intérieur de l'échantillon (également en résine) ; (b) La couleur interne des cellules n'est pas homogène ; (c) Certaines cellules ont des contours flous ou trop petits ; (d) L'intensité des membranes varie, rendant les limites difficiles à détecter. Sources : ZEN

Il est donc constaté que GDDH13 est bien comme attendue avec une masse fraîche plus importante que son homologue, sans effet de lignée significatif.

Par la suite, nous nous sommes donc focalisés sur les fruits récoltés à J20 pour vérifier si les différences de diamètre et masse fraîche étaient dues à des variations du nombre de cellules et/ou de taille de cellules. De plus, nous avons concentrés les analyses sur la zone du mésocarpe qui détermine des différences de taille du fruit chez la pomme. Sur les 16 échantillons, deux ont été éliminés : un n'a pas été pollinisé (GDDH13-mère) et un a cassé lors de la coupe au microtome (GDDH18-autof).

## B - HISTOLOGIE ET MICROSCOPIE

Suite à la mise en place du processus de microscopie bien connu du plateau IMAC, il a donc été décidé d'innover en passant du comptage manuel des couches cellulaires à une étude automatisée des coupes de microscopie en collaboration avec une forme d'intelligence artificielle : Intellesis de ZEN. Un résumé du fonctionnement de celui-ci est réalisé en Figure 14. Afin de rendre plus intelligible sa compréhension, voici une explication plus détaillée du processus mis en place :

### > Analyse d'image avec ZEN et Intellesis

Pour réaliser l'analyse d'image des coupes de fruit, le logiciel ZEN a été utilisé, couplé au système Intellesis Trainable Segmentation. Ce système repose sur une approche de Machine Learning, qui fait partie du vaste domaine de l'intelligence artificielle. Plus précisément, le Machine Learning permet au système d'apprendre à partir de données, mais il nécessite un guidage humain pour comprendre ce qu'il doit détecter dans le jeu d'images fourni. Cela le distingue du Deep Learning, qui repose sur des réseaux de neurones artificiels capables d'apprendre de manière plus autonome, sans intervention humaine directe.

### > Création du modèle d'apprentissage

Un modèle d'analyse a été créé : 'Trained model : comptage de cellules de pommes'. Ce modèle apprend à associer chaque pixel d'une image à une classe définie par l'utilisateur (ex. : cellule, fond, membrane, etc.). Chaque pixel étant défini par 3 valeurs RGB, Intellesis utilise ces nuances pour classer les pixels. Pour entraîner le modèle, un coloriage manuellement est entrepris dans les zones correspondant à chaque classe : exemple Figure 12. Une fois ce premier apprentissage effectué, une première analyse automatique est lancée, puis les erreurs éventuelles sont corrigées. Au total, 2 images par condition servent à l'entraînement (Figure 17, ANNEXE V).

## ZEN, Machine learning

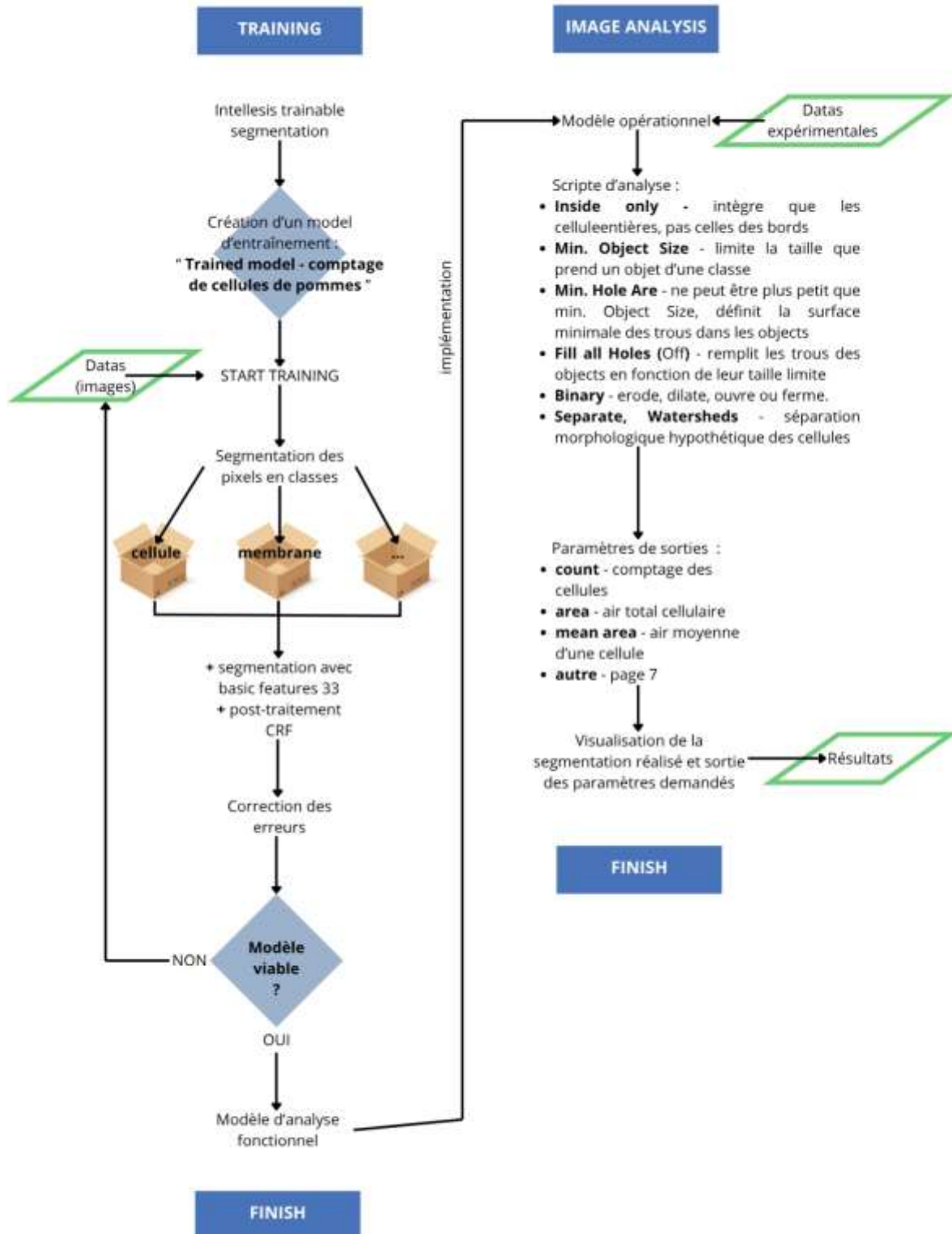


Figure 14 : récapitulatif du fonctionnement du Machine Learning avec ZEN tiré du pipeline d'Intellectis (Software module & extensions v3.2 de ZEN).

### > Filtres et corrections avancées

En plus de l'apprentissage par segmentation manuel, deux compléments sont ajoutés pour faire progresser les performances du modèle : la fonction "Basic Features 33" applique 33 filtres supplémentaires pour reclasser les pixels non identifiés lors du premier passage + la fonction CRF (Conditional Random Field) affine les bordures entre objets en reclassant obligatoirement les pixels en fonction de leur environnement, pour des contours plus nets.

### > Contraintes techniques de l'analyse

Toutefois, l'utilisation du Machine learning possède ses limites. Plusieurs éléments compliquent l'analyse des images (Figure 13) : (a) Le fond en résine a la même composition que l'intérieur de l'échantillon (également en résine), (b) La couleur interne des cellules n'est pas homogène, (c) Certaines cellules ont des contours flous ou trop petites, (d) L'intensité des membranes varie, rendant les limites difficiles à détecter. Dans l'optique d'un moindre pourcentage d'erreurs de lecture, des tests ont été réalisés pour optimiser la coloration au bleu de toluidine - Figure 15 et 14 en ANNEXE II - dont les résultats seront évoqués prochainement. Malgré cela, il y a un risque de sous-estimation du nombre de cellules présentes.

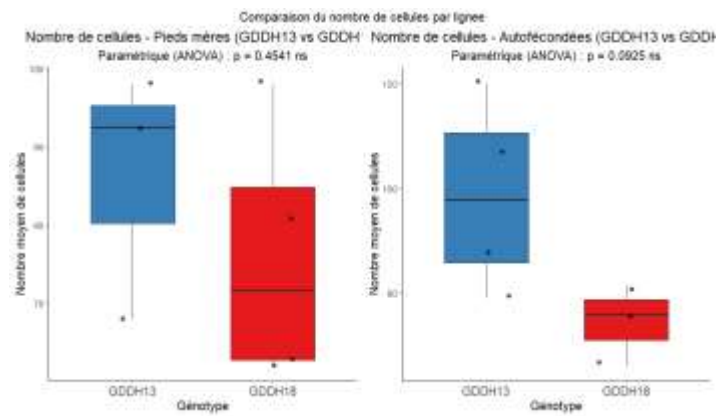
### > Optimisation finale

Une fois le modèle d'analyse opérationnel, les images de coupes de fruit sont chargées et une optimisation manuelle de lecture est possible : on définit le cadre du script d'analyse et donc des données de sorties. Les fonctions utilisées sont dans la figure 14. À noter que la lecture des données comporte une marge d'erreur, la reconnaissance n'étant pas fiable à 100 %.

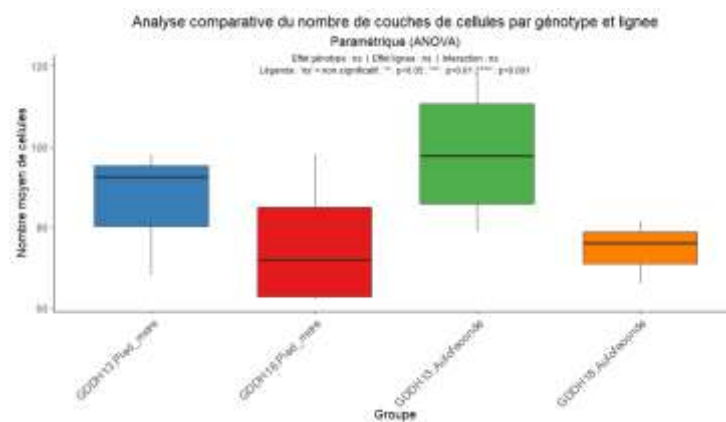
### > Paramètres mesurables dans ZEN

Les paramètres de sortie sont pour finir sélectionnés :

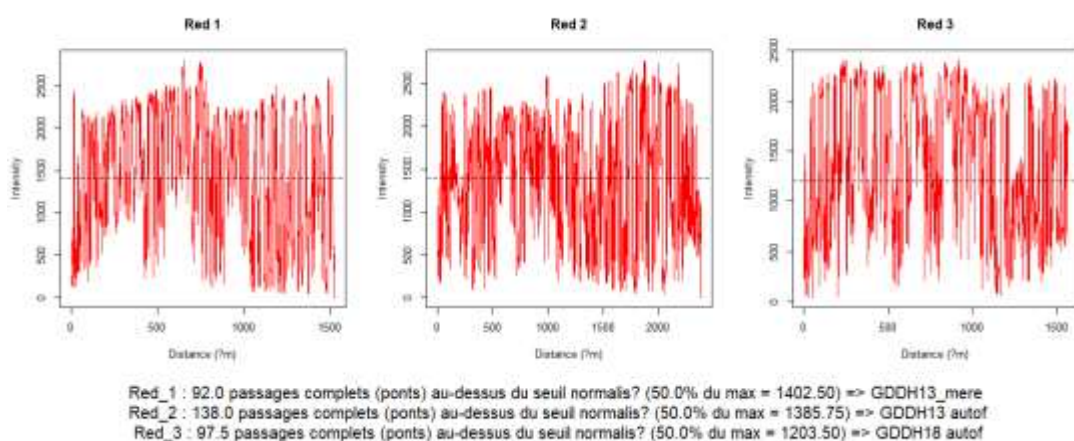
- Méthode manuelle : distance loge carpellaire-périphérie de la zone ROI (ou épaisseur du mésocarpe) avec un outil de mesure de ZEN, nombre de couches cellulaires (ou nombre de couches cellulaires) dans l'axe du fruit de la loge du trognon à la périphérie du fruit de la zone ROI.
- Méthode semi-automatisé : nombre de couches cellulaires dans l'axe du fruit de la loge carpellaire à la périphérie du fruit de la zone ROI avec récupération du profil colorimétrique rouge perçu par ZEN.
- Méthode automatisé : paramètre global 'count' - comptage des cellules de la zone ROI, paramètre global 'mean area' - aire moyenne d'une cellule de la zone ROI. Ces données sont enfin récupérées sous format Excel.



Graphique 7 : comparaison de la distance de l'épaisseur du mésocarpe de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20 à 2 facteurs. Tests statistiques : ANNEXE III



Graphique 8 : comparaison du nombre de couches cellulaires dans l'axe du fruit de l'épaisseur du mésocarpe de ROI, réalisé sur les échantillons J20 manuellement. Tests statistiques : ANNEXE III



Graphique 9 : comptage semi-automatique du nombre de couches cellulaires dans l'axe du fruit de l'épaisseur du mésocarpe de ROI par mesure de l'intensité photométrique des échantillons J20. Tests statistiques : ANNEXE III

Avec ZEN, sont ainsi récupérées diverses données sur les coupes. Toutefois, une mise au point du protocole de coloration a été nécessaire suite aux observations de l'échantillon réalisé (Figure 13). Initialement, une coloration de 3 secondes était prévue. Pour résoudre les problèmes de bordures floues, des tests à différents temps d'immersion dans la toluidine ont été faits : 6, 9, 15, 30, 60 secondes (Figure 15 et 14 en ANNEXE II). Le temps de 15 secondes a été sélectionné au vu de ses propriétés opacifiantes pour les cellules floues et de son ton adéquat pour les zones de condensations cellulaires.

## **Données manuelles & semi-automatisée**

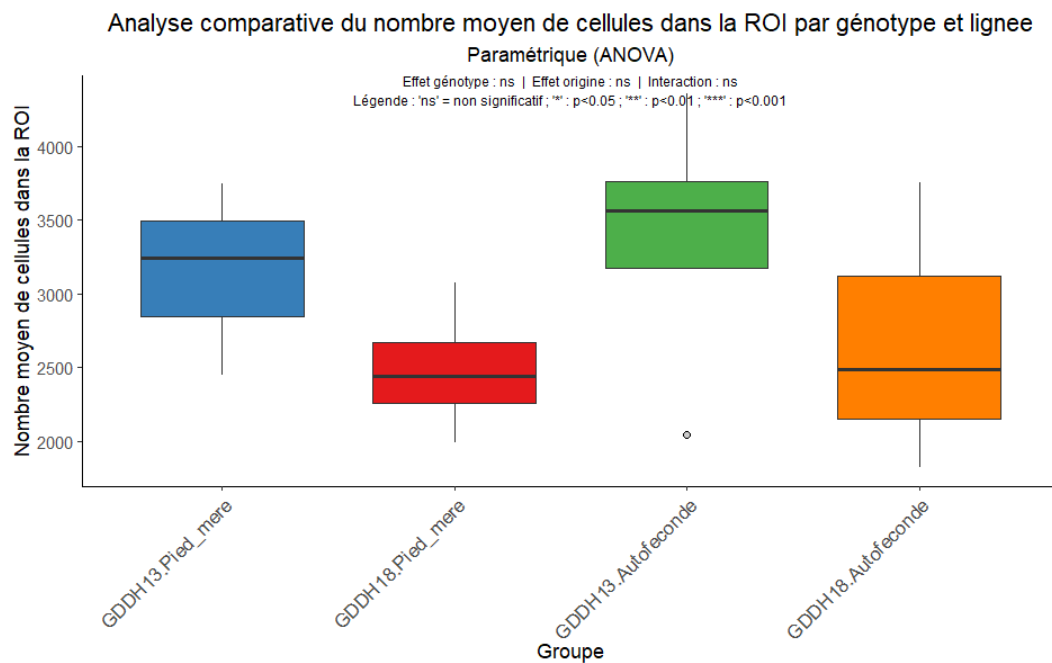
Le Graphique 7, illustrant la distance de l'épaisseur du mésocarpe de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20, compare les quatre groupes évoqués précédemment. Il est donc attendu que la distance de l'épaisseur du mésocarpe de la zone ROI des fruits de GDDH13 soit plus importante vers J21 par rapport à celle de GDDH18. Les résultats ne confirment pas l'hypothèse initiale à J20. Les lignées présentent une différence significative, de ce fait une comparaison séparée des lignées a été faite. Les GDDH des pieds mère comme autofécondé ne sont pas significativement différents malgré l'observation visuelle d'une tendance : en autofécondée, GDDH18 avoisine les 1600  $\mu\text{m}$  tandis que GDDH13 est à 2000  $\mu\text{m}$ .

Il est donc constaté qu'il n'y a pas de différence, toutefois la tendance visuelle suit les attentes. Pas d'effets lignées.

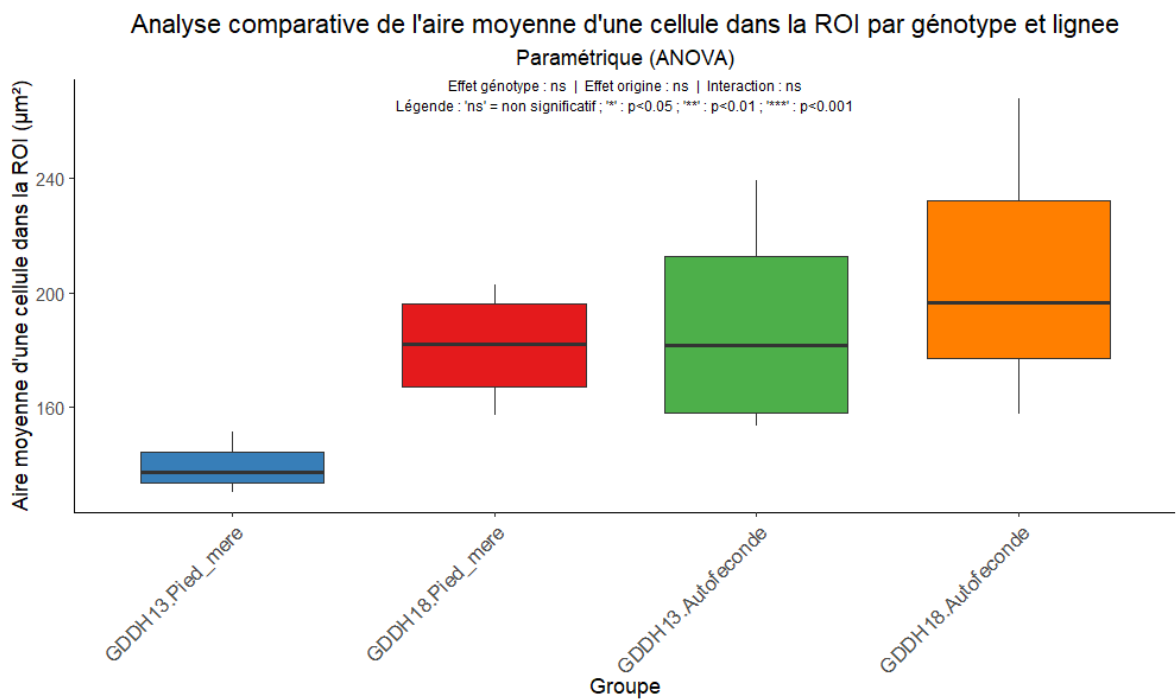
Le Graphique 8, illustrant le nombre de couches cellulaires dans l'axe du fruit de la loge à la périphérie du fruit de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20, compare les quatre groupes évoqués précédemment. Il est donc attendu que le nombre de couches cellulaires dans l'axe du fruit de l'épaisseur du mésocarpe de la zone ROI des fruits de GDDH13 soit plus importants vers J21 par rapport à ceux de GDDH18 (Daccord, Celton et al., 2017). Les résultats ne confirment pas l'hypothèse initiale à J20. Aucun effet, de génotype GDDH ou de lignée n'est significatif. Une tendance visuelle est constatée avec une moyenne de 74 couches cellulaires pour GDDH18, et 94 couches cellulaires pour GDDH13.

Il est donc constaté qu'il n'y a pas de différence, toutefois la tendance visuelle suit les attentes. Pas d'effets lignées.

Le Graphique 9, illustrant le nombre de couches cellulaires dans l'axe du fruit de la loge à la périphérie du fruit de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20, identifie le nombre de cellules en fonction de l'intensité rouge. Il est donc attendu que ce nombre soit équivalent à celui du comptage manuel. Les résultats montrent que : le signal "red 1" (GDDH13-mère),



*Graphique 10 : comparaison du comptage du nombre de cellules total de la zone ROI automatique, réalisé sur les échantillons J20. Tests statistiques : ANNEXE III*



*Graphique 11 : comparaison de l'aire moyenne d'une cellule de la zone ROI mesurée automatique, réalisée sur les échantillons J20. Tests statistiques : ANNEXE III*

permet de compter de 138 alors que le comptage manuel est à 120 ; le signal "red 2" (GDDH13-autof), permet de compter de 92 alors que le comptage manuel est à 93 ; le signal "red 3" (GDDH18-autof), permet de compter de 97.5 alors que le comptage manuel est à 76. Deux des trois présentent une sous-estimation de 20 cellules.

Il est donc constaté que les données semi-automatiques valident donc 1/3 des mesures manuelles.

## Données automatisées

Le Graphique 10, illustrant le comptage du nombre de cellules total de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20, compare les quatre groupes évoqués précédemment. Il est donc attendu que le nombre de cellules totales de la zone ROI des fruits de GDDH13 soient plus importants vers J21 par rapport à ceux de GDDH18. Les résultats ne confirment pas l'hypothèse initiale à J20. Aucun effet, de génotype GDDH ou de lignée n'est significatif. Une tendance visuelle est constatée avec une moyenne de 2 575 cellules pour GDDH18, et 3 250 cellulaires pour GDDH13. Les autofécondées ont un nombre total de cellules de 200 cellules de plus que les mères.

Il est donc constaté qu'il n'y a pas de différence, toutefois la tendance visuelle suit les attentes entre les GDDH. De plus, les lignées autofécondées ont une valeur prépondérante aux pieds mères.

Le Graphique 11, illustrant l'airemoyen d'une cellule de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20, compare les quatre groupes évoqués précédemment. Il est donc attendu que l'airemoyen d'une cellule de la zone ROI des fruits de GDDH13 soit plus important vers J21 par rapport à ceux de GDDH18. Les résultats ne confirment pas l'hypothèse initiale à J20. Aucun effet, de génotype GDDH ou de lignée n'est significatif. Une tendance visuelle est constatée avec une moyenne de 190  $\mu\text{m}^2$  pour GDDH18, et 160  $\mu\text{m}^2$  pour GDDH13. Les autofécondées ont une aire totale de cellules de 35  $\mu\text{m}^2$  de plus que les mères.

Il est donc constaté qu'il n'y a pas de différence, toutefois la tendance visuelle présente une différence de 30  $\mu\text{m}^2$ , la plus grande aire étant attribuée à GDDH18. De plus, les lignées autofécondées ont une valeur prépondérante aux pieds mères.

# DISCUSSION

## RAPPEL

Pour rappel, l'objectif est de démontrer, à travers les résultats, si la différence de taille des fruits GDDH13 - grand fruit - et GDDH18 - petit fruit - est bien présente et héritée par les générations autofécondés correspondantes. Ensuite, il s'agit d'établir un lien entre la différence de taille et des modifications épigénétiques, les deux génotypes GDDH partageant la même séquence d'ADN, mais différant par leurs profils de méthylation (Daccord, Celton et al., 2017).

Concernant les limites évoquées dans les stratégies et contraintes, l'effet de la différence de lumière perçue entre les faces n'a pas pu être testé dû à un nombre insuffisant d'échantillons pour valider ou non cet aspect par une puissance de test. De plus, il faut noter le cas de chancre sur un arbre en génotype GDDH18 autofécondé qui peut influencer les résultats, puisqu'il a été utilisé dans l'analyse graphique malgré sa condition. Quant à l'asynchronie phénologique entre les phases de floraison des fleurs et de croissance des fruits : les graphiques montrent une différence marquée entre les lignées, ce qui introduit des biais potentiels dans l'interprétation des données.

Avant de répondre à la problématique, il est nécessaire d'évaluer la pertinence des données, qui globalement ne correspondent pas aux attentes initiales. Il est nécessaire de faire un point sur les limites externes.

### **A - Effet lignées ou asynchronie entre lignées**

Tout d'abord, les pieds autofécondés présentent un développement phénologique accru comparé aux pieds mères. L'une des pistes les plus pertinentes dans ce contexte est l'asynchronie entre lignées, les autofécondés étant plus en avance dans leur croissance. Ceci est appuyé par les données de comptage manuelle du nombre de couches cellulaires dans Daccord, Celton et al., 2017 où les résultats de cette étude : il est observé une concordance avec GDDH18 au temps J28 et GDDH13 au temps J21. Les plants autofécondés sont plus avancés dans leur croissance.

Ce phénomène peut avoir de multiples origines cumulées. En premier lieu, cela peut être dû à un effet juvénile (figure 6) : les plantes arbres autofécondés et mères ont respectivement 8 ans et 20 ans, de ce fait leur architecture n'est pas au même stade. Les

capacités de nutrition par les racines et de photosynthèse via le feuillage, tout comme le développement de la charpente pour maintenir les fruits sont des paramètres déterminant dans la qualité finale du fruit comme de sa taille, hors ces paramètres peuvent jouer un rôle discriminant dans la comparaison mère-autofécondé (Garaux, 2018). Deuxièmement, le microclimat n'est pas le même. En parcelle, sur le rang des plantes mères les arbres sont plus développés, le feuillage est plus dense, et cela, tout à l'opposé des lignées autofécondés qui sont plus aérées (Garaux, 2018). Les fleurs ne sont donc pas exposées aux mêmes microclimat. De plus, le printemps 2025 a été plus chaud que celui de 2017, or la température joue un rôle clé dans la vitesse de croissance (Garaux, 2018).

Comme perspective, les limites externes restant complexes à gérer, il est difficile d'entrevoir des améliorations..

## **B - Limites des analyses d'histologie & microscopie**

Concernant les tests statistiques réalisés, la majorité montrent une tendance et non une réelle différence significative. Tout le processus d'interprétation s'en retrouve affaibli. De ce fait, une compréhension des limites internes à l'étude est nécessaire.

En premier lieu, la puissance de test aurait mérité un nombre d'images analysées plus important. Une augmentation du nombre de coupes analysées et même d'échantillons par conditions serait un avantage non négligeable pour assurer des résultats cohérents et valides. Garder au mieux l'échantillon en entier serait aussi un bon choix stratégique. Deuxièmement, même si l'analyse a été portée au centre du fruit en repérant les loges, il reste un bruit non maîtrisé face à l'idéal de mesure du plus grand diamètre. Pour les échantillons J20, ceux-ci ont été coupés en quarts dont un des deux quarts prélevés a été analysé dans cette étude. Or, les zones charnues (Figure 9) ne sont pas toutes de la même taille et en analysant un quart, une seule section de l'épaisseur du mésocarpe est mesurée par défaut sans pouvoir identifier précisément s'il s'agit de la plus grande distance ou non. Ceci peut flouter les réelles différences entre les génotypes GDDH. Troisièmement, le modèle de segmentation, actuellement entraîné sur deux images par condition (Figure 17, ANNEXE V), pourrait être amélioré en l'entraînant sur des coupes plus variées, incluant des zones de couleurs, de flous ou d'ombres non encore apprises ou détectées. Ce schéma pourrait être réalisé sur les autres quarts de J20, tout comme les échantillons de J13 et J0 pour la suite, afin de voir si l'analyse finale est plus précise.

Comme perspective, il serait donc intéressant pour une prochaine expérience de garder les échantillons en entier et, ou, d'augmenter le nombre d'échantillons par date. Plus d'échantillons en entier signifient plus de données brutes et de probabilités d'estimer par un

test statistique la plus grande distance de l'épaisseur du mésocarpe. De plus, l'entraînement d'Intellesis est à poursuivre.

## **C - Différence de taille des fruits entre génotypes et conservation de celle-ci chez les arbres mères**

- Les fruits des plants issus d'autofécondation des pommiers GDDH13 et GDDH18 possèdent-ils les mêmes caractéristiques que leurs parents ?

Suite à la compréhension des limites de base, externes et internes à cette étude, la problématique peut être analysée avec des pincettes. Les lignées ne seront pas évoquées, prouvées comme significativement différentes. La suite se concentre sur le génotype.

Tout d'abord, le Graphique 5 présente les mesures de diamètres des fruits prélevés à différents temps. Ces premières données démontrent significativement par une ANOVA ( $p < 0.01$ ) que, entre générations, le facteur taille est transmis significativement. En effet, les différences morphologiques de la taille du fruit lors de la première période post-pollinisation sont bien visibles à J20 avec un diamètre moyen de 6.7 mm, soit 1.8 mm de plus que GDDH18. En effet, entre 0-40 jours, le cycle cellulaire redémarre et provoque des divisions cellulaires qui vont provoquer cette augmentation de diamètre. Le génotype influence de manière prépondérante la taille du fruit durant cette phase de développement (Malladi et al., 2011).

Ensuite le Graphique 6, présente les mesures de masse fraîche prises au temps J21. À l'instar des données de diamètres, la masse suit la même logique attendue et appuyée par une ANOVA paramétrique ( $p < 0,001$ ) : GDDH13 a une masse fraîche de 0.14 g plus gratifiante que son homologue GDDH18. Cela implique une quantité potentiellement plus élevée de cellules, de contenu cellulaire et d'eau pour GDDH13, tandis que GDDH18 présente un volume final plus faible. La résultante étant l'évolution vers une masse plus conséquente.

L'analyse détaillée de ces données conduit à une étude interne du fruit à l'aide du logiciel ZEN en mode manuel. Pour la partie qui suit, il est remarqué des tendances avec un effet génotype non significatif. Cela est à prendre avec du recul puisqu'il s'agit d'une tendance et non d'un fait appuyé par une puissance de test.

Pour commencer, le Graphique 7, comparant la distance de l'épaisseur du mésocarpe de la zone ROI réalisée sur les échantillons J20, semble montrer une tendance où GDDH13 est plus long de 400  $\mu\text{m}$ . Or, on a 1800  $\mu\text{m}$  de marge, constatée sous ANOVA entre les GDDH, et la zone de l'épaisseur du mésocarpe est supposée être la seule à prendre en taille

au cours du temps, ce qui ici ne semble pas être le cas. La mesure manuelle du nombre de couches cellulaires traversées dans l'axe du fruit de l'épaisseur du mésocarpe de ROI du Graphique 8, dont la validité est appuyée à 1/3 par la mesure semi-automatisée sur ZEN par le Graphique 9, semble montrer une tendance où GDDH13 a 20 cellules en moyenne de plus. Les données de comptage manuelles semblent plus proches que les semi-automatisées des résultats de comptage obtenus dans Daccord et Celton, 2017.

Quant aux mesures automatisées, le Graphique 10 compare le comptage du nombre de cellules total de la zone ROI automatique. Une tendance est observée visuellement avec GDDH ayant 200 cellules de plus dans la ROI que son homologue. Viens pour finir le Graphique 11 de comparaison de l'aire moyenne d'une cellule de la zone ROI par mesure automatique. Il est constaté une tendance où GDDH13 a une aire de cellule dans ROI 30  $\mu\text{m}^2$  plus conséquente que GDDH18. D'après Malladi et al., 2011, le caractère taille de fruit va dépendre de la capacité des cellules à s'étendre via l'expansion cellulaire et le stockage de l'eau en modifiant leur turgescence.

Toutefois, d'après les tendances les différences de taille du fruit entre génotype identifiées, avec le diamètre comme la masse, seraient liées à une différence de nombre de couches cellulaires et non à une différence de surface cellulaire. Cela implique une tendance de croissance par la division cellulaire et non l'expansion cellulaire.

En perspective, une étude plus approfondie des composants et de la présence de molécules pourrait être intéressante. Cela aiderait à distinguer plus en profondeur ce qui différencie les cellules et, indirectement, les mécanismes mis en jeu par le pommier pour suivre la partition orchestrée par l'épigénétique dans le cas de la différence de taille observée entre les deux génotypes GDDH. Au sujet des mesures de diamètre et masse en verger, il serait intéressant de collecter des données à plus long terme, jusqu'à maturité du fruit par exemple. Cela permettrait de vérifier si les caractéristiques de grande taille pour GDDH13 et de petite taille pour GDDH18 sont maintenues tout au long du développement du fruit.

Concernant la partie histologie, la méthodologie étant en partie nouvelle, un retour critique sur le processus utilisé est nécessaire. En effet, d'autres techniques auraient pu être testées en Machine Learning pour trouver une meilleure fiabilité de lecture des échantillons sur Intellesis. En perspective, peut être noté l'usage de prise d'images en monochromatie : soit convertir le format couleur déjà pris en noir et blanc, soit prendre directement des photos des coupes en monochromatie. En effet, le microscope Zeiss a une capacité monochromatique de 65 000 nuances de gris contre 4 000 en couleurs, un potentiel qui pourrait être exploité pour obtenir des résultats avec un degré de fiabilité élevé. Une autre piste est l'analyse 3D des mécanismes du modèle de croissance des GDDH pour mieux

comprendre l'évolution théorique du nombre et du volume des cellules. Ceci peut être fait en collaboration avec l'équipe STRAGENE qui travaille sur la modélisation en 3D.

## **D - Lien différence de taille de fruit & différence de méthylation d'ADN**

- Si les différences de tailles de fruits sont conservées, les marques épigénétiques différenciant GDDH13 et GDDH18 sont-elles aussi présentes chez leurs descendants ?

Tout d'abord, on sait que le génotype GDDH13 - à grand fruit - et le génotype GDDH18 - à petit fruit - ont la même séquence d'ADN. Or, dans le Graphique 5, on remarque une différence de diamètre entre les deux de 1.8 mm et une masse différente de 0.14 g dans le Graphique 6, GDDH13 étant plus grand et plus lourd que GDDH18. Par conséquent, les différences observées, malgré un génome identique, suggèrent un rôle probable des marques épigénétiques dans l'opposition constatée entre les deux génotypes. Toutefois, l'absence de données de méthylation sur les descendants empêche une corrélation directe, ne laissant place qu'à des suppositions sur la base des connaissances des génotypes par Daccord et Celton, 2017. Les données significatives tendent donc vers une hypothèse de persistance partielle des marques épigénétiques lors de la méiose, comme observé chez *Arabidopsis* (Perrin, 2020).

De plus, dans le Graphique 5, cette différence de diamètre est similaire entre J0 jusqu'à J13 globalement, une réelle variation se produisant vers J20 entre les deux GDDH. Ce phénomène de diamètre divergeant, appuyé par l'ANOVA, débutant vers J13 est aussi observable dans les résultats du graphique 3 de Malladi et al., 2011 qui fait une comparaison des diamètres des fruits entre 'Gala' et 'Grand Gala'. Ici, une expression plus spécifique des différences de taille de la part de l'épigénome peut être supposée vers J15 chez le pommier en général ou en tout cas la mise en place d'un processus particulier expliquant la divergence non progressive.

En perspective, un séquençage de l'ADN des génotypes serait intéressant pour vérifier si les modifications épigénétiques impliquées sont bien conservées entre mère et autofécondée et ainsi associer directement les caractéristiques morpho-physiologiques à des paramètres quantitatifs de méthylation. De plus, il pourrait être intéressant de tester cette conservation sous stress.

## CONCLUSION

Comprendre l'héritabilité des marques épigénétiques constitue une piste innovante pour l'amélioration des plantes, à la croisée des enjeux scientifiques, agronomiques et sociétaux. Dans cette étude, le critère de qualité "taille de fruit" est disséqué pour en extraire les liens en lien avec la régulation épigénétique chez la pomme, à l'aide d'un double haploïde 'Golden Delicious' ; GDDH13 (grand fruit) et GDDH18 (petit fruit), partageant pourtant la même séquence d'ADN.

Plusieurs limites ont affecté la robustesse des résultats : d'une part il y a le caractère subjectif des données récoltées dû à un nombre d'échantillons insuffisant, un certain bruit concernant l'analyse de la zone avec le plus grand diamètre et le besoin d'une augmentation de précision dans le modèle de segmentation. D'autre part, différents facteurs externes en plus des internes évoqués ci-contre viennent perturber la fiabilité des données, notamment l'asynchronie de croissance entre les lignées des pieds mères et autofécondés, cela dû à l'environnement complexe dans lesquels étaient réalisées les mesures des conditions les autofécondées sont à un stade proche d'un temps J28 alors que les mères sont proches d'un temps J21 (Daccord, Celtin et al., 2017).

Toutefois, on dénote par les résultats significatifs de l'ANOVA paramétrique pour les diamètres et la masse récoltés au verger que les résultats appuient les attendues vis-à-vis de la différence entre les GDDH : GDDH13 étant de taille plus importante, ici de 1,8 mm, que son homologue GDDH18.

Le reste des résultats présente une tendance similaire mais qui suppose cette différence attendue sans l'appuyer par une puissance de test.

Concernant le lien entre méthylation et phénotype, les données de masse et de diamètre, en prenant compte de la similarité connue de l'ADN GDDH, font émettre l'hypothèse d'une source épigénétique transmise partiellement, voir en totalité par transmission sexuée entre générations. Ce mécanisme semble être plus actif vers J15, où la différence de taille est accrue. Néanmoins, ces hypothèses nécessitent d'être consolidées par des analyses de méthylome pour démontrer formellement la transmission de marques épigénétiques chez les descendants.

Mieux comprendre ces mécanismes serait un atout en sélection végétale, dans un monde où quantité et qualités forment le dôme de la recherche scientifique.

## ANNEXES

### ANNEXE I

<b>Temps de mesure</b>	<b>Type de test</b>	<b>GDDH13 Pied mère</b>	<b>GDDH18 Pied mère</b>	<b>GDDH13 Autofécondé</b>	<b>GDDH18 Autofécondé</b>	<b>p-val Lignée</b>	<b>p-val Type</b>	<b>p-val Interaction</b>
J0	Non paramétrique (ARTool)	2.36 ± 0.04	2.36 ± 0.03	2.43 ± 0.02	2.52 ± 0.04	0,1662	0,0026	0,6023
J2	Paramétrique (ANOVA)	2.31 ± 0.04	2.4 ± 0.04	2.38 ± 0.04	2.42 ± 0.04	0,1160	0,2886	0,5568
J6	Non paramétrique (ARTool)	2.43 ± 0.04	2.53 ± 0.02	2.51 ± 0.03	2.71 ± 0.07	0,0001	0,0006	0,5845
J9	Non paramétrique (ARTool)	2.72 ± 0.05	2.8 ± 0.04	2.69 ± 0.04	2.83 ± 0.02	0,0079	0,9828	0,3685
J13	Paramétrique (ANOVA)	3.5 ± 0.12	3.37 ± 0.12	3.68 ± 0.14	3.23 ± 0.14	0,0248	0,9350	0,2384
J20	Paramétrique (ANOVA)	6.25 ± 0.27	4.76 ± 0.23	7.21 ± 0.15	5.04 ± 0.19	0,0000	0,0080	0,1221

Tableau 1 : p-value des tests sur la cinétique de croissance de comparaison des diamètres des fruits moyen des génotypes types GDDH et lignées ; \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , .  $p < 0.1$ , ns  $p = 0.1$ . ; aov si postulats de normalité et homogénéité de la variance ou art, le tout avec (Diametre\_moy ~ Lignee \* GDDH)

## ANNEXE II

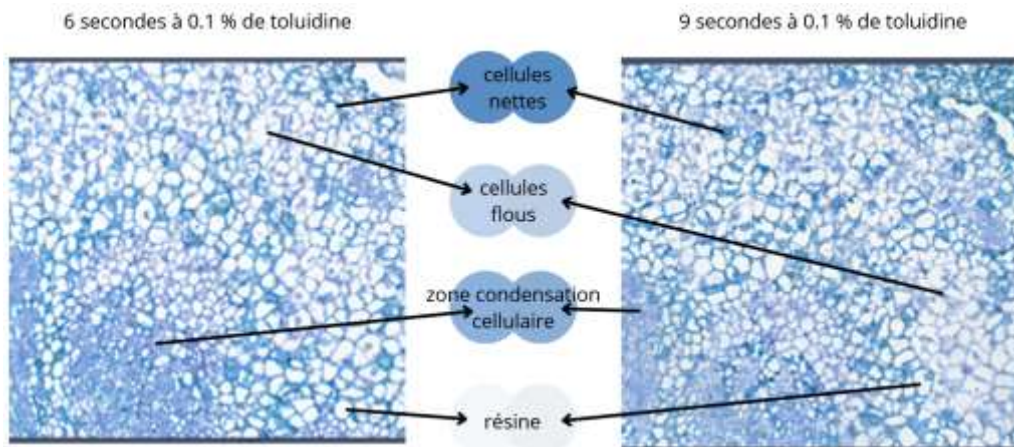


Figure 15 : Test technique au bleu de toluidine pour améliorer l'analyse d'images : les coupes de 3  $\mu\text{m}$  prises au microscope AXIO sont en x20, à gauche une coupe d'un fruit de pomme à J14 après pollinisation immergé 6 secondes dans le bleu de toluidine à 0,1 % et à droite une coupe d'un fruit de pomme à J14 après pollinisation immergé 9 secondes dans le bleu de toluidine à 0,1 %. Sources : ZEN

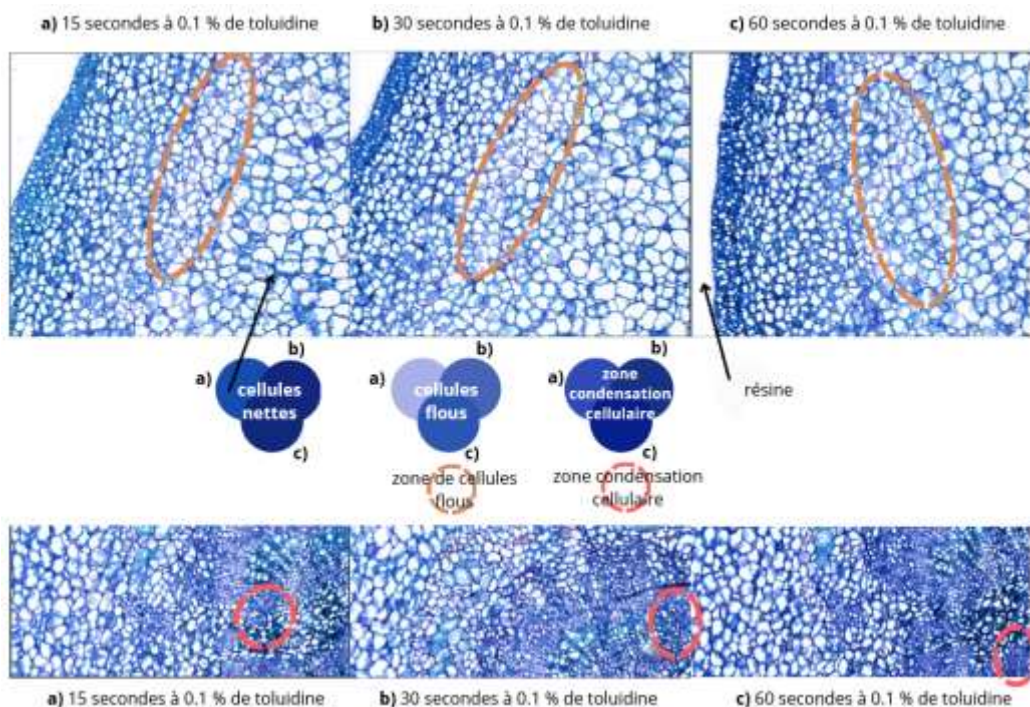


Figure 16 : Test technique au bleu de toluidine pour améliorer l'analyse d'images : les coupes de 3  $\mu\text{m}$  prises au microscope AXIO sont en x20, à gauche une coupe d'un fruit de pomme à J20 après pollinisation immergé 15 secondes dans le bleu de toluidine à 0,1 %, au milieu une coupe d'un fruit de pomme à J20 après pollinisation immergé 30 secondes dans le bleu de toluidine à 0,1 % et à droite une coupe d'un fruit de pomme à J20 après pollinisation immergé 60 secondes dans le bleu de toluidine à 0,1 %. Sources : ZEN

# ANNEXE III

Genotype e_simple	Origin e_simple	Moy enne µm	SE µm	Med iane	Min µm	Max µm	n	Moye nne_SE µm	pval_g enotype	pval_ origine	pval_in teraction	Test_Typ e
GDDH13	Pied_m ere	1493 ,82	211, 741492	1461 ,404	1144 ,357	1875 ,699	3	1493. 8 ± 211.7	0,1331	0,062 8	0,3076	Paramétriq ue (ANOVA)
GDDH13	autoféc ondée	2047 ,31825	203, 090644	2089 ,542	1569 ,5635	2440 ,6255	4	2047. 3 ± 203.1	0,1331	0,062 8	0,3076	Paramétriq ue (ANOVA)
GDDH18	Pied_m ere	1451 ,12875	79,1 966931	1449 ,29575	1259 ,431	1646 ,4925	4	1451. 1 ± 79.2	0,1331	0,062 8	0,3076	Paramétriq ue (ANOVA)
GDDH18	autoféc ondée	1628 ,94817	185, 956667	1468 ,801	1418 ,3255	1999 ,718	3	1628. 9 ± 186.0	0,1331	0,062 8	0,3076	Paramétriq ue (ANOVA)

Tableau 2 : p-value des tests de la comparaison de la distance de l'épaisseur du mésocarpe de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20 à 2 facteurs.

Mères										
Genotype_ simple	Moyenne couches cellulaire s	SE couche s cellulai res	Mediane couches cellulaires	Min couches cellulaire s	Max couches cellulaire s	n	Moyenne_S E couches cellulaires	p_valu e	Significa tif	Test_Type
GDDH13	86,166666 7	9,2210 508	92,5	68	98	3	86.2 ± 9.2	0,4541	Non	Paramétrique (ANOVA)

GDDH18	75,875	8,5107 1628	71,75	62	98	4	75.9 ± 8.5	0,4541	Non	Paramétrique (ANOVA)
<b>Autofécondées</b>										
<b>Genotype_ simple</b>	<b>Moyenne couches cellulaire s</b>	<b>SE couche s cellulai res</b>	<b>Mediane couches cellulaires</b>	<b>Min couches cellulaire s</b>	<b>Max couches cellulaire s</b>	<b>n</b>	<b>Moyenne_S E couches cellulaires</b>	<b>p_valu e</b>	<b>Significa tif</b>	<b>Test_Type</b>
GDDH13	98,625	9,2811 9739	97,75	79	120	4	98.6 ± 9.3	0,0925	Non	Paramétrique (ANOVA)
GDDH18	74,5	4,5368 8586	76	66	81,5	3	74.5 ± 4.5	0,0925	Non	Paramétrique (ANOVA)

Tableau 3 : p-value des tests de la comparaison du nombre de couches cellulaires dans l'axe du fruit de l'épaisseur du mésocarpe de ROI, réalisé sur les échantillons J20 manuellement

<b>Genotype_simple</b>	<b>Origine_simple</b>	<b>Moyenne cellule s</b>	<b>SE cellule s</b>	<b>Median e cellule s</b>	<b>Min cellule s</b>	<b>Max cellule s</b>	<b>n</b>	<b>Moyenne_SE cellules</b>	<b>pval_genotype</b>	<b>pval_origine</b>	<b>pval_interaction</b>	<b>Test_Type</b>
GDDH13	Pied_mere	3147,8333	375,800738	3244,5	2454	3745	3	3147.8 ± 375.8	0,1235	0,6215	0,9729	Paramétrique (ANOVA)
GDDH13	autofécondée	3378,75	482,679177	3559,75	2043,5	4352	4	3378.8 ± 482.7	0,1235	0,6215	0,9729	Paramétrique (ANOVA)
GDDH18	Pied_mere	2487,125	224,979478	2440,5	1994,5	3073	4	2487.1 ± 225.0	0,1235	0,6215	0,9729	Paramétrique (ANOVA)
GDDH18	autofécondée	2688,5	566,037175	2487	1824,5	3754	3	2688.5 ± 566.0	0,1235	0,6215	0,9729	Paramétrique (ANOVA)

Tableau 4 : p-value des tests de la comparaison du comptage du nombre de cellules total de la zone ROI automatique, réalisé sur les échantillons J20.

<b>Genotype_simple</b>	<b>Origine_simple</b>	<b>Moyenne <math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>SE <math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Median <math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Min <math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Max <math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>n</b>	<b>Moyenne_SE <math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>pval_genotype</b>	<b>pval_origine</b>	<b>pval_interaction</b>	<b>Test_Type</b>
GDDH13	Pied_mere	139,6989	6,21719612	137,345676	130,301613	151,44941	3	139.7 $\pm$ 6.2	0,2271	0,0776	0,5602	Paramétrique (ANOVA)
GDDH13	autofécondée	189,023948	20,1220715	181,56363	153,752979	239,215554	4	189.0 $\pm$ 20.1	0,2271	0,0776	0,5602	Paramétrique (ANOVA)
GDDH18	Pied_mere	181,121863	10,4923974	182,187099	157,147648	202,965607	4	181.1 $\pm$ 10.5	0,2271	0,0776	0,5602	Paramétrique (ANOVA)
GDDH18	autofécondée	207,30734	32,2240363	196,745863	157,528956	267,6472	3	207.3 $\pm$ 32.2	0,2271	0,0776	0,5602	Paramétrique (ANOVA)

Tableau 5 : *p*-value des tests de la comparaison de l'aire moyenne d'une cellule de la zone ROI mesurée automatique, réalisée sur les échantillons J20.

## ANNEXE IV

<b>Genotype_sim ple</b>	<b>Origine_sim ple</b>	<b>Moyenne g</b>	<b>SE g</b>	<b>n</b>	<b>Moyenne_ SE g</b>	<b>pval_genoty pe</b>	<b>pval_origi ne</b>	<b>pval_interact ion</b>	<b>Test_Type</b>
GDDH13	Pied_mere	0,245	0,03065942	6	0.245 $\pm$ 0.031	0	0,701	0,189	Paramétrique (ANOVA)
GDDH13	autofécondée	0,22666667	0,00997218	6	0.227 $\pm$ 0.010	0	0,701	0,189	Paramétrique (ANOVA)
GDDH18	Pied_mere	0,093125	0,00737621	8	0.093 $\pm$ 0.007	0	0,701	0,189	Paramétrique (ANOVA)

GDDH18	autofécondée	0,1175	0,0111001 9	8	0.117 0.011	± 0	0,701	0,189	Paramétrique (ANOVA)
--------	--------------	--------	----------------	---	----------------	-----	-------	-------	-------------------------

Tableau 6 : *p*-value des tests de la comparaison de la masse fraîche des échantillons à J21.

## ANNEXE V

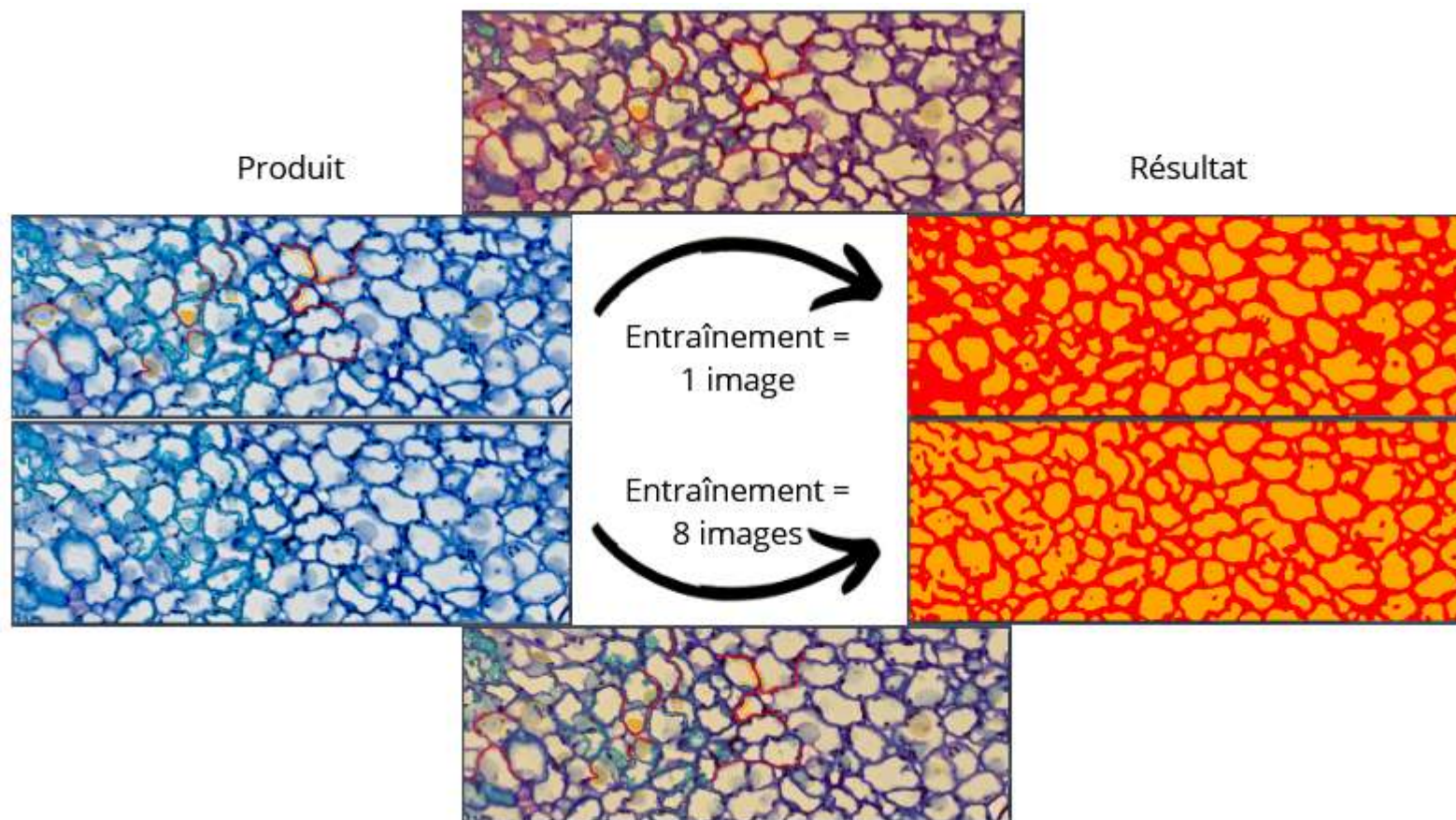


Figure 17 : différences d'apprentissage après entraînement du modèle d'analyse sur une image puis après 8 images dans la même zone d'une coupe d'échantillon J20. Sources : ZEN

## BIBLIOGRAPHIE

**Cornille Amandine • Tatiana Giraud • Marinus J.M. Smulders • Isabel Roldán-Ruiz • Pierre Gladioux**

- (Cornille, 2014) - *The domestication and evolutionary ecology of apples*

**Daccord Nicolas, Jean-Marc Celton, Gareth Linsmith, Claude Becker, Nathalie Choisne, Elio Schijlen, Henri van de Geest, Luca Bianco, Diego Micheletti, Riccardo Velasco, Erica Adele Di Pierro, Jérôme Gouzy, D Jasper G Rees, Philippe Guérif, Hélène Muranty, Charles-Eric Durel, François Laurens, Yves Lespinasse, Sylvain Gaillard, Sébastien Aubourg, Hadi Quesneville, Detlef Weigel, Eric van de Weg, Michela Troggio, Etienne Bucher** - (Daccord et al., 2017) - *High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development*

**Daccord Nicolas, Jean-Marc Celton, Gareth Linsmith, Claude Becker, Nathalie Choisne, Elio Schijlen, Henri van de Geest, Luca Bianco, Diego Micheletti, Riccardo Velasco, Erica Adele Di Pierro, Jérôme Gouzy, D Jasper G Rees, Philippe Guérif, Hélène Muranty, Charles-Eric Durel, François Laurens, Yves Lespinasse, Sylvain Gaillard, Sébastien Aubourg, Hadi Quesneville, Detlef Weigel, Eric van de Weg, Michela Troggio & Etienne Bucher** - (INRAE, 2020) - *Pommes et pommiers anciens* - Lien :

<https://www.inrae.fr/actualites/pommes-pommiers-anciens>

**FAO** site internet officiel © - FAOSTAT (Food and Agriculture Organization, 2025) - Lien : <https://www.fao.org/faostat/fr/#data>

**Martin Garaux, Benjamin Pitchers, Bertrand Vandoorne, Pierre-Éric Lauri.** INRAE, Montpellier. diplôme d'ingénieur ISA LILLE. (65 pages) - (Garaux, 2018) - *Pommiers en système agroforestier : Architecture, phénologie et flux de sève*

**Laurine Gilles, Nicolas Doll, Peter Rogowsky, Thomas Widiez** - (Planet Vie, 2017) - *Les plantes haploïdes doublées, un outil de choix dans la création de nouvelles variétés* - Lien : <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/evolution/domestication/les-plantes-haploides-doubees-un-outil-de-choix-dans-la>

**Jean-Christophe Grolleau** - (Jean-Christophe Grolleau GAB65, 2023) - *Les porte-greffes d'hier et d'aujourd'hui pour le pommier* - Lien : <https://www.gab65.com/wp-content/uploads/2023/11/FT-porte-greffe-pommier-2023.pdf>

**INRAE** site internet officiel © - (IRHS) - *VALorization of Epigenetic Marks in pLAnts* > Thématiques de recherche, 2022 - Lien : <https://irhs.angers-nantes.hub.inrae.fr/recherche/valorization-of-epigenetic-marks-in-plants/thematiques>

**Khalil R. Jahed, Peter M. Hirst** - (Jahed et al., 2023) - *Fruit growth and development in apple: a molecular, genomics and epigenetics perspective*

**Léspinasse Yves** - (Léspinasse, 2014) - *Origine des plantes haploïdes (H) et haploïdes-doublés (DH) dérivées de la variété 'Golden Delicious'*

**LESPINASSE Yves**, membre de l'Académie d'Agriculture de France - (Léspinasse, agri mutuel, 2023) - *Académie d'Agriculture de France - Le verger de pommiers français : quelle évolution variétale ?* - Lien :

<https://www.agri-mutuel.com/actualites/le-verger-de-pommiers-francais-quelle-evolution-varietale/>

**Makkar HSP, P. Siddhuraju et K. Becker** © Humana Press Inc., Totowa, NJ (p114-115) - (Makkar, 2008) - *Method in Molecular Biology*, vol. 393 : *Plant Secondary Metabolites*  
**Anish Malladi, Lisa Klima Johnson** - (Malladi et al., 2011) - *Expression profiling of cell cycle genes reveals key facilitators of cell production during*

**Pratt Charlotte** - *Horticultural Reviews*, Edited by Jules Janick, Copyright © 1988 Timber Press - (Prade, 1998) - *Apple Flower and Fruit: Morphology and Anatomy*

**Adrien Perrin**. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2020. Français. (243 pages) - (Perrin, 2020) - *Transmission des marques épigénétiques lors de la multiplication*

**Renaudin Jean-Pierre, Cynthia Deluche, Catherine Cheniclet, Christian Chevalier, Nathalie Frangne** - (Renaudin et al., 2017) - *Cell layer-specific patterns of cell division and cell expansion during fruit set and fruit growth in tomato pericarp*

**Songling Bai<sup>1</sup>, Pham Anh Tuan, Takanori Saito, Chikako Honda, Yoshimichi Hatsuyama<sup>5</sup>, Akiko Ito, Takaya Moriguchi** - (Bai et al., 2016) - *Epigenetic regulation of MdMYB1 is associated with paper bagging-induced red pigmentation of apples*

Sans auteur certifiés :

**Andrew** - (Produce report, 2018) - *Global Trends in Apple Innovation* - Lien :  
<https://www.producereport.com/article/global-trends-apple-innovation>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Visuel des différences de tailles de GDDH13 & GDDH18 à maturité comparé à la 'Golden Delicious' (Daccord et Celton, 2017)	2
Figure 2 : parcours évolutif de la pomme dans l'histoire	2
Figure 3 : Observation des différentes sections d'une fleur de pommier segmentée en deux. Sources - Prade, 1998	3
Figure 4 : évolution du fruit de pommier (et de son pépin) post-pollinisation Sources - Prade, 1998	3
Figure 5 : illustration de l'organisation d'une corymbe de pommier, la fleur centrale au milieu avec ici 4 fleurs latérales. Dessin - AL, Photo - wirestock de freepik (licence gratuite)	3
Figure 6 : pipeline du processus d'obtention des génotypes autofécondés jusqu'au prélèvement des échantillons.	5
Figure 7 - récapitulatif du matériel biologique en verger utilisé à J0, J13, J20 après pollinisation, avec GDDH13 & 18 mères comme auto fécondés.	6
Figure 8 - photo de l'ensemble des échantillons J0, J13, J20 misent en résine époxy. Photo : A. Lefeuvre	6
Figure 9 : coupe horizontale de pomme mature lambda au centre du fruit et observation des différences d'épaisseurs entre les zones charnues de deux loges du trognon dû à la forme patatoïde de celui-ci.	7
Figure 10 : définition de la zone ROI (Région d'intérêt) et de ces paramètres de sorties	7
Figure 11 : organisation à chaque étape du processus allant de la coupe des blocs de résines à l'analyse sous Machine Learning de ZEN.	8

Figure 12 : Création du modèle d'apprentissage : processus de segmentation des pixels en classes au sein d'un échantillon J14 après pollinisation et coupé à 3  $\mu\text{m}$  avec une coloration de 3 secondes à 0,1% de toluidine 10

Figure 13 : Contraintes techniques de l'analyse : observation des variations présentes au sein d'un échantillon J14 après pollinisation coupé à 3  $\mu\text{m}$  avec une coloration de 3 secondes à 0,1% de toluidine avant et après analyse 10

Figure 14 : récapitulatif du fonctionnement du Machine Learning avec ZEN tiré du pipeline d'Intellectis sur le site officiel de ZEN. 11

Figure 15 : Test technique au bleu de toluidine pour améliorer l'analyse d'images II

Figure 16 : Test technique au bleu de toluidine pour améliorer l'analyse d'images II

Figure 17 : différences d'apprentissage après entraînement du modèle d'analyse sur une image puis après 8 images dans la même zone d'une coupe d'échantillon J20. VII

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : p-value des tests sur la cinétique de croissance de comparaison des diamètres des fruits moyen des géotypes GDDH, pour chaque lignée I

Tableau 2 : p-value des tests de la comparaison de la distance de l'épaisseur du mésocarpe de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20 à 2 facteurs. II

Tableau 3 : p-value des tests de la comparaison du nombre de couches cellulaires dans l'axe du fruit de l'épaisseur du mésocarpe de ROI, réalisé sur les échantillons J20 manuellement. IV

Tableau 4 : p-value des tests de la comparaison du comptage du nombre de cellules total de la zone ROI automatique, réalisé sur les échantillons J20. V

Tableau 5 : p-value des tests de la comparaison de l'aire moyenne d'une cellule de la zone ROI mesurée automatique, réalisée sur les échantillons J20. VI

Tableau 6 : p-value des tests de la comparaison de la masse fraîche des échantillons à J21. VII

## TABLE DES GRAPHIQUES

Graphique 1 : Production de pommes dans le monde entre 2015-2023 d'après FAOSTAT (Food and Agriculture Organization)	1
Graphique 2 : Quantification du nombre de couches cellulaires dans le parenchyme des fruits GDDH13 (orange) et GDDH18 (vert) évalué par méthode manuel (Daccord et Celton, 2017)	5
Graphique 3 : Comparaison de la croissance des fruits entre 'Gala' et 'Grand Gala'. (Malladi et al., 2011)	5
Graphique 5 : cinétique de croissance de comparaison des diamètres des fruits moyen des génotypes GDDH	9
Graphique 6 : comparaison de la masse fraîche des échantillons à J21 des 4 génotypes. Tests statistiques : ANNEXE X	9
Graphique 7 : comparaison de la distance loge carpellaire-périphérie de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20 des 4 génotypes.	12
Graphique 8 : comparaison du nombre de couches cellulaires dans l'axe du fruit de la loge carpellaire à la périphérie du fruit de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20 des 4 génotypes manuellement et en semi-automatisé.	12
Graphique 9 : comptage semi-automatique du nombre de couches cellulaires dans l'axe du fruit de l'épaisseur du mésocarpe de ROI par mesure de l'intensité photométrique des échantillons J20.	12
Graphique 10 : comparaison du comptage du nombre de cellules total de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20 des 4 génotypes.	13

Graphique 11 : comparaison de l'aire moyenne d'une cellule de la zone ROI réalisé sur les échantillons J20 des 4 génotypes.

# TABLE DES MATIERES

Avertissement	
Remerciements	
Engagement de non plagiat	
Glossaire	
Liste des abréviations	
Sommaire	
Introduction	1
Problématique	2
Connaissances bibliographiques	
A - Développement morphologique et physiologique	3
Phase 1 - Avant pollinisation	
Phase 2 - Après pollinisation	
Période 1 - De 0 à 40 jours post-pollinisation	
Période 2 - Entre 40 à 90 jours post-pollinisation	4
Période 3 - stade tardif de maturation	
B - Diversité génétique & épigénétique chez le fruit	
Stratégie & Contraintes	5
Méthodologie	6
A - Matériel biologique	
B - Morphologie des fruits	7
C - Histologie et microscopie	
D - Analyse statistique	9
Résultats	10
A - Morphologie des fruits	
Diamètre	
Masse fraîche	
B - Histologie et microscopie	11
Données manuelles & semi-automatisée	13

Données automatisées	14
Discussion	15
Rappel	
A - Effet lignées ou asynchronie entre lignées	
B - Limites des analyses d'histologie & microscopie	16
C - Différence de taille des fruits entre génotypes et conservation de celle-ci chez les arbres mères	17
D - Lien différence de taille de fruit & différence de méthylation d'ADN	19
Conclusion	20
Annexes	
ANNEXE I	
ANNEXE II	
ANNEXE III	
ANNEXE IV	
ANNEXE V	
Bibliographie	
Table des illustrations	
Table des tableaux	
Table des graphiques	
Table des matières	
Abstract	
Résumé	

## Résumé

Titre : Épigénétique et taille du fruit chez le pommier : Étude comparative des géotypes GDDH13 et GDDH18

Afin d'optimiser des traits agronomiques tels que la taille, la fermeté ou le rendement de manière plus fine et adaptative, la compréhension de l'impact des mécanismes épigénétiques sur le phénotype et de leur héritabilité est cruciale, tant sur les plans scientifique qu'économique.

Dans cette étude, les géotypes GDDH13 (fruit de grande taille) et GDDH18 (fruit de petite taille), issus de double-haploïdes de 'Golden Delicious' et partageant la même séquence génétique, ont été comparés. Une première différence de taille avait été observée en 2017 (Daccord et Celton), et cette étude de 2025 vise à confirmer cette divergence, en évaluant notamment l'héritabilité du caractère "taille du fruit" à travers des pieds autofécondés. Malgré des limites expérimentales, internes (nombre d'échantillons, précision de la mesure) et externes (conditions environnementales, asynchronie développementale), une différence moyenne significative de 1,8 mm de diamètre a été retrouvée, en faveur de GDDH13.

Ces résultats partiels soutiennent l'hypothèse d'un contrôle non génétique de la taille du fruit. Une répétition expérimentale, couplée à une analyse méthylomique approfondie, serait nécessaire pour confirmer une transmission épigénétique. Une telle découverte ouvrirait la voie à de nouvelles stratégies de sélection variétale, plus dynamiques, respectueuses de l'environnement, et mieux acceptées socialement que les OGM.

Mots-clés : Golden Delicious, épigénétique, taille du fruit, machine learning, sélection variétale

## Abstract

Title: Epigenetics and fruit size in apple: a comparative study of the GDDH13 and GDDH18 genotypes

In order to optimise agronomic traits such as size, firmness or yield in a more refined and adaptive manner, understanding the impact of epigenetic mechanisms on the phenotype and their heritability is crucial, both scientifically and economically.

In this study, the GDDH13 (large fruit) and GDDH18 (small fruit) genotypes, derived from double-haploids of "Golden Delicious" and sharing the same genetic sequence, were compared. An initial difference in size was observed in 2017 (Daccord and Celton), and this 2025 study aims to confirm this divergence, in particular by assessing the heritability of the "fruit size" trait through self-fertilised plants. Despite experimental limitations, both internal (number of samples, accuracy of measurement) and external (environmental conditions, developmental asynchrony), a significant mean difference of 1.8 mm in diameter was found, in favour of GDDH13.

These partial results support the hypothesis of non-genetic control of fruit size. Experimental repetition, coupled with in-depth methylomic analysis, would be necessary to confirm epigenetic transmission. Such a discovery would pave the way for new varietal selection strategies that are more dynamic, environmentally friendly and more socially acceptable than GMOs.

Keywords: Golden Delicious, epigenetics, fruit size, machine learning, varietal selection