

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux

Caractérisation physiologique et biochimique du processus de vieillissement du tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)

Pierre DELAPLACE

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade
de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteur : P. du JARDIN

Rapporteurs : M.H. JIJAKLI
J.-F. DIERICK

*“ Though I do not believe
that a plant will spring up
where no seed has been,
I have great faith in a seed.
Convince me that you have a seed there,
and I am prepared to expect wonders.”*

*Henry David Thoreau
[The Succession of Forest Trees, 1887]*

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux

Caractérisation physiologique et biochimique du processus de vieillissement du tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)

Pierre DELAPLACE

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade
de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteur : P. du JARDIN

Rapporteurs : M.H. JIJAKLI
J.-F. DIERICK

DELAPLACE Pierre (2007). Caractérisation physiologique et biochimique du processus de vieillissement du tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) (thèse de doctorat). Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 171 p., 19 tabl., 69 fig.

Résumé:

Le tubercule semence de pomme de terre est considéré comme un organe modèle pour étudier le vieillissement végétal. De plus, son âge physiologique influence son profil de germination et ses performances agronomiques. Afin d'évaluer les processus biochimiques sous-tendant le vieillissement, des tubercules des cv. Bintje et Désirée ont été stockés à 4°C pendant 7 mois et régulièrement échantillonnés afin d'évaluer leurs paramètres physiologiques et biochimiques. L'évolution des marqueurs d'âge physiologique (PAI, période d'incubation) a été mesurée, permettant la définition d'un cadre de référence plus représentatif de l'état physiologique des tubercules que l'âge chronologique. Une corrélation a aussi été établie avec les paramètres de levée (nombre de tiges, délai avant levée). Parallèlement, deux approches biochimiques ont permis de mesurer les modifications du protéome et du système antioxydant durant le vieillissement. L'évolution du profil protéique a été évaluée en DIGE après une extraction au SDS chaud. Au cours du vieillissement, 93 spots sont strictement sur- ou sous- régulés alors que 4 autres spots présentent un maximum d'abondance transitoire. Après découpe manuelle de 43 spots sélectionnés sur base de leur profil d'expression, 32 protéines ont été identifiées par MS/MS. Les protéines différenciellement exprimées sont principalement impliquées dans le catabolisme de la patatine, la réponse au stress, la glycolyse, le recyclage protéique et l'oxydation lipidique. Une approche ciblée a ensuite été développée en se basant sur la théorie oxydative du vieillissement. L'évolution des activités SOD, CAT, APX et POX ainsi que les contenus en ascorbate, glutathion, caroténoïdes et composés phénoliques ont été mesurés au cours du vieillissement. Ces données laissent entrevoir de profondes modifications du système antioxydant en réponse à une génération accrue de formes actives d'oxygène. Aucune accumulation de dégâts oxydatifs sur lipides et protéines n'a cependant pu être mise en évidence. L'ensemble de ces cinétiques d'expression a permis d'établir un modèle intégré du vieillissement. Ces résultats sont discutés dans le contexte théorique précité.

DELAPLACE Pierre (2007). Physiological and biochemical characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing (Thèse de doctorat in French). Gembloux, Belgium
Gembloux Agricultural University
171 p., 19 tabl., 69 fig.

Summary:

Potato seed tuber is considered as a model organ to study plant ageing. Besides, its physiological age greatly influences germination pattern and thus agronomical performance. In order to unravel the biochemical processes underlying ageing, potato seed tubers (cv. Bintje and Désirée) were stored at 4°C for 7 months and regularly sampled to assess both physiological and biochemical parameters. Physiological age markers (PAI, incubation period) evolution was measured and allowed us to define a reference frame more accurate than the chronological age. A correlation has also been established with the growth parameters (number of stems, duration before emergence). In parallel, two biochemical approaches allowed us to assay proteome and antioxidant system modifications occurring during ageing. Protein pattern evolution was assessed by DIGE after hot SDS extraction. During ageing, 93 spots were strictly up- or down- regulated while 4 others exhibited an abundance curve with a transient maximum. After manual picking of 43 selected spots based on their expression profile, 32 proteins were identified by MS/MS. Differentially expressed proteins are mainly involved in patatin catabolism, stress response, glycolysis, protein turn-over and lipid oxidation. A complementary targeted approach has then been set up based on the free radical ageing theory. SOD, CAT, APX and POX activities as well as ascorbate, glutathione, carotenoid and phenolic compound contents were measured during ageing. These data seem to indicate that the antioxidant system undergoes marked changes in response to an increased production of reactive oxygen species. However, no accumulation of oxidative damages has been observed on lipids and proteins. All these kinetic data allowed us to build an integrated ageing model. These results are discussed in the above-mentioned theoretical context.

Copyright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de ladite loi et de ses modifications ultérieures.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Patrick du Jardin, promoteur de ce travail, pour l'intérêt qu'il y a porté, pour sa disponibilité ainsi que pour ses encouragements prodigués tout au long de ce projet.

Je suis également particulièrement reconnaissant envers le Docteur Marie-Laure Fauconnier (FUSAGx) pour son aide, son écoute et son dynamisme de tous les instants, ainsi qu'envers le Docteur Jean-François Dierick (SGS Life Science) pour sa grande disponibilité, ses nombreux conseils et l'intérêt qu'il a manifesté au cours mes recherches. Durant la réalisation de cette thèse, de nombreuses rencontres ont permis au projet de progresser tant sur le plan scientifique qu'humain. Je désirerais à ce titre remercier les Docteurs Twan America, Jan Cordewener, Jean-François Hausman, Jenny Renaut, Kjell Sergeant ainsi que Froukje van der Wal, Edouard Delaive, Sylvain Lestrade, Mouhssin Oufir et Sébastien Planchon pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans l'initiation, le développement et la finalisation de mes recherches.

Je tiens par ailleurs à exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes, notamment les membres du Jury et le personnel de l'Unité de Biologie végétale (FUSAGx) qui, par leurs conseils, leur lecture attentive, leurs suggestions, leur aide pratique et leur présence, ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse. Merci donc à Madame Danielle Brunin, à Mesdemoiselles Jennifer Charlier, Catherine Jamar et Virginie Gosset, à Messieurs Alain Benko, Frédéric Gastiny et Michel Thunis ainsi qu'à Messieurs les Docteurs Mohammed Bajji, Patrick Frettinger et Jorge Rojas-Beltran pour leur aide. J'adresse une mention particulière à Mademoiselle Adeline Blondiaux pour le soutien technique et humain précieux qu'elle a apporté au cours de ce travail.

Le traitement statistique des données a grandement bénéficié de l'encadrement efficace du Docteur Yves Brostaux et de Monsieur le Professeur Rudy Palm. Qu'ils en soient également remerciés.

Finalement, nous ne manquerons pas de remercier les étudiants qui, lors de leur travail de fin d'étude ou de stage, ont largement contribué à l'avancement de cette thèse, à savoir Mesdemoiselles Rosalie D'hondt, Edwin Kolp et Virginie Motte, Messieurs Jean-François Briquemont, Michaël Colson, Manuel Gaussin, Saël Gramdi et Julien Walckiers.

Ces remerciements seraient bien sûr incomplets sans évoquer les membres de ma famille qui m'ont supporté (dans toutes les acceptions du terme !) dans les bons et moins bons moments indissociables de tout travail de recherche !

A toutes et tous : MERCI ! MANY THANKS ! BEDANKT !

Pierre

RENDONS À CÉSAR...

Cette thèse n'est bien sûr pas le travail d'une seule personne, mais résulte plutôt de nombreuses collaborations ayant, chacune, apporté leur pierre à l'édifice.

Les manipulations du chapitre portant sur la caractérisation physiologique du matériel végétal ont été réalisées à l'Unité de Biologie végétale de la FUSAGx. Michel Thunis et Alain Benko se sont occupés quotidiennement de la maintenance des chambres de culture. Adeline Blondiaux a, quant à elle, géré – et réalisé – les mesures biologiques tri-hebdomadaires durant trois ans. L'analyse des données obtenues a grandement bénéficié de l'*input* de Yves Brostaux de l'Unité de Statistique, Informatique et Mathématiques appliquées.

La réalisation des gels d'électrophorèse bidimensionnelle n'aurait pas été possible sans le soutien financier du FNRS et l'aide experte de Twan America, Froukje van der Wal et Jan Cordewener (*Plant Research International, Wageningen, Pays-Bas*). Certaines mises au point techniques ainsi que les gels préparatifs ont été réalisés au sein de la plate-forme Proteomics de l'asbl BioVallée (*Charleroi, Belgique*) grâce à Jean-François Dierick, Sylvain Lestrade, Cécile Gerbaux et Marina Vendrame. Edouard Delaive (*Unité de Recherche en Biologie Cellulaire des FUNDP, Namur, Belgique*), Agnès Giot et Léon Kraakman (*GE Healthcare Life Sciences*) nous ont permis d'accéder aux derniers développements de la technologie DIGE afin de numériser les gels et d'analyser les abondances protéiques. Les identifications protéiques ont bénéficié des compétences de Jenny Renaut, Kjell Sergeant et Sébastien Planchon (*Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann, Belvaux, Luxembourg*).

Le chapitre portant sur l'étude du système antioxydant a majoritairement été réalisé à l'Unité de Biologie végétale de la FUSAGx grâce à l'aide de Marie-Laure Fauconnier, Virginie Gosset et Adeline Blondiaux. Les quantifications des composés phénoliques ont, quant à elles, été effectuées au *Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann (Belvaux, Luxembourg)* en collaboration avec Mouhssin Oufir et Jean-François Hausman.

Le travail de relecture de ce manuscrit a finalement impliqué bon nombre de ces acteurs. L'apport de chacun(e) a été grandement apprécié.

Publications acceptées :

Bajji M., M'Hamdi M., Gastiny F., **Delaplace P.**, Fauconnier M.-L., du Jardin P. (2007). Catalase inhibition alters suberization and wound-healing in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Physiologia Plantarum*, Vol. 129, 472-483.

Delaplace P., van der Wal F., Dierick J.-F., Cordewener J.H.G., Fauconnier M.-L., du Jardin P., America A.H.P. (2006). Potato tuber proteomics: Comparison of two complementary extraction methods designed for 2-DE of acidic proteins. *Proteomics*, Vol. 6, 6494-6497.

Delaplace P., Dierick J.-F., Fauconnier M.-L., Van Der Wal F., Cordewener J., America A.H.P., du Jardin P. (2005). Characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing using physiological and proteomic markers (2D-PAGE). *The FEBS Journal*, Vol. 272, Supplement 1, p.71.

Delaplace P., Fauconnier M.-L. (2004). Le stockage post-récolte des tubercules de pommes de terre : une étape clé du processus de production. *Troupeaux et cultures des tropiques*, Vol. 4, pp. 27-34.

Bajji M., Colson M., **Delaplace P.**, Gastiny F., du Jardin P. (2004). Wound-healing of the potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber in response to catalase inhibition. *Acta Physiologiae Plantarum*. Vol. 26 supplément, 223.

Publications soumises :

Delaplace P., Brostaux Y., Fauconnier M.-L., du Jardin P. (2007a). Potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber Physiological Age Index is a valid reference frame in postharvest ageing studies. Article soumis à *Postharvest Biology and Technology*. IF : 1.892

Delaplace P., Fauconnier M.-L., du Jardin P. (2007b). Méthodes de mesure de l'âge physiologique des tubercules semences de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Article soumis à *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. IF : -

Delaplace P., Rojas-Beltran J., du Jardin P., Fauconnier M.-L. (2007c). Potato tuber ageing: an appraisal of the oxidative stress hypothesis during high temperature storage. Article soumis à *Journal of Plant Physiology*. IF : 1.521

Delaplace P. et al. (2007d). Characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing using Differential in-Gel Electrophoresis proteome analysis (DIGE) and antioxidant system assessment. Article en préparation pour *Journal of Experimental Botany*. IF : 3.630

Fauconnier M.-L., Rojas-Beltran J., Dupuis B., **Delaplace P.**, Frettinger P., Gosset V., du Jardin P. (2007). Changes in oxylipin synthesis after *Phytophthora infestans* infection of potato leaves do not correlate with resistance. Article soumis à *Plant Physiology and Biochemistry*. IF : 1.847

Communications :

Delaplace P., Dierick J.-F., van der Wal F., Renaut J., Oufir M., Fauconnier M.-L., America A.H.P., du Jardin P. (2007). Characterization of potato tuber ageing using physiological markers and biochemical data based on DIGE proteome analysis and phenolic compound assessment. *Poster presented during Proteom'Lux 2007 meeting: "Proteomics and Mass Spectrometry"*, Belvaux, October 17 2007.

Delaplace P., Dierick J.-F., van der Wal F., Renaut J., Oufir M., Fauconnier M.-L., America A.H.P., du Jardin P. (2007). Characterization of potato tuber ageing using physiological markers and biochemical data based on DIGE proteome analysis and antioxidant system assessment. *Poster presented during the joint meeting of the FNRS contact group "Oxidative Processes and Antioxidants" and of the Belgian Society for Cell and Developmental Biology : "Oxygen and Reactive Oxygen species in biology"*, Louvain-la-Neuve, October 13 2007.

Delaplace P., Dierick J.-F., van der Wal F., Renaut J., Fauconnier M.-L., America A.H.P., du Jardin P. (2007). Characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing using physiological markers and biochemical data based on DIGE proteome analysis and antioxidant activities assessment. *Poster presented during the joint meeting of the FNRS contact group Proteomics and of the Belgian Society of Biochemistry and Molecular Biology : "Organelle subproteomics and post-translational modifications"*, Bruxelles, May 15 2007.

Delaplace P., Dierick J.-F., van der Wal F., Rojas-Beltran J., Fauconnier M.-L., America A.H.P., du Jardin P. (2006). Characterization of potato tuber ageing using physiological markers and proteomic data based on DiGE proteome analysis and antioxidant activities assessment. *Poster presented during the 194th meeting of the International Franqui Chair, Young Scientists Day : "Systems Biology, Computational Biology and Biochemistry and Molecular Biology"*, Gembloux, December 18 2006.

Delaplace P., Dierick J.-F., van der Wal F., Rojas-Beltran J., Fauconnier M.-L., America A.H.P., du Jardin P. (2006). Characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing using physiological markers and proteomic data based on Differential in gel electrophoresis proteome analysis (DiGE) and antioxidant activities assessment by native-PAGE. *Poster presented during the International Conference on Proteomics: "Bridging the Gap Between Gene Expression and Biological Function"*, Luxembourg, October 11-14 2006.

Delaplace P., Dierick J.-F., Rojas-Beltran J., Fauconnier M.-L., America T.A.H.P., du Jardin P. (2005). Characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing using germination-related physiological markers and proteomic data based on global proteome analysis and antioxidant activities assessment. *Oral Communication during the 2nd Solanaceae Genome Workshop*, Ischia (Italy), September 25-29 2005.

Delaplace P., Dierick J.-F., Fauconnier M.-L., Van Der Wal F., Cordewener J., America T.A.H.P., du Jardin P. (2005). Characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing using physiological and proteomic markers (2D-PAGE). *Abstracts of the 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference*, Budapest (Hungary), July 2-7 2005.

Delaplace P., Dierick J.-F., Fauconnier M.-L., Van Der Wal F., Cordewener J., America T.A.H.P., du Jardin P. (2005). Characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing using physiological and proteomic markers (2D-PAGE). *Poster presented during the 1st Groupe de contact FNRS – Protéomique quantitative*, Liège (Belgium), February 25 2005.

Fauconnier M.-L., Welti R., **Delaplace P.**, Marlier M., du Jardin P. (2004). Lipid and oxilipin profile during storage of potato tubers. *Proceedings of 16th International Plant Lipid Symposium*, Budapest (Hungary), June 1-4 2004.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1 DESCRIPTION DE L'ORGANISME ETUDIE	4
1.1 Classification	4
1.2 Importance économique.....	4
1.3 Description de l'appareil caulino-foliaire.....	4
1.3.1 Appareil aérien	4
1.3.2 Appareil souterrain	4
1.3.2.1 Structure externe du tubercule	4
1.3.2.2 Structure interne du tubercule.....	5
1.3.2.3 Composition biochimique du tubercule	6
1.4 Cycle végétatif.....	6
1.4.1 Plantation et buttage	6
1.4.2 Développement des fanes	7
1.4.3 Développement des stolons	7
1.4.4 Développement des tubercules	7
1.4.5 Défanage.....	7
1.4.6 Récolte.....	8
1.4.7 Séchage.....	8
1.4.8 Période de cicatrisation	8
1.4.9 Stockage – Inhibition de la germination	8
2 ÂGE PHYSIOLOGIQUE ET VIEILLISSEMENT DES TUBERCULES DE <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> L.	8
2.1 Introduction	8
2.2 Les théories du vieillissement issues des modèles animaux.....	9
2.2.1 Généralités.....	9
2.2.2 Bases théoriques	9
2.2.3 Théorie des attaques oxydatives	10
2.3 Définitions	12
2.3.1 Note préliminaire	12
2.3.2 Mort cellulaire programmée	12
2.3.3 Apoptose.....	12
2.3.4 Nécrose	12
2.3.5 Vieillissement et âge physiologique	12
2.3.6 Sénescence.....	15
2.3.7 Dormance	16
2.3.8 Période d'incubation.....	16
2.3.9 Vigueur de croissance.....	17
2.3.10 Capacité germinative	17
2.4 Méthodes d'évaluation de l'âge physiologique des tubercules.....	17
2.4.1 Généralités.....	17
2.4.2 Indicateurs biophysiques.....	18
2.4.3 Indicateurs physiologiques	19
2.4.4 Indicateurs biochimiques et moléculaires	21
3 METABOLISME DES FORMES ACTIVES DE L'OXYGENE, ROLE SIGNAL ET STRESS OXYDATIF	24
3.1 Introduction	24
3.2 Principales formes actives de l'oxygène.....	25
3.3 Le système antioxydant végétal.....	27
3.3.1 Antioxydants enzymatiques majeurs	28
3.3.1.1 Superoxyde dismutase	28
3.3.1.2 Ascorbate peroxydase.....	28
3.3.1.3 Catalase	28
3.3.2 Antioxydants non enzymatiques principaux	29
3.3.2.1 Ascorbate.....	29
3.3.2.2 Glutathion.....	30
3.3.2.3 Caroténoïdes.....	31
3.3.2.4 Polyphénols et α -tocophérol	31
3.4 Impacts des ROS sur les lipides et les protéines.....	33
3.4.1 Dégâts oxydatifs sur les lipides.....	33

3.4.2	Modifications protéiques liées au stress oxydatif et au vieillissement	36
3.5	<i>Stress oxydatif et rôle signal des ROS</i>	38
CHAPITRE 2 : OPTIONS MÉTHODOLOGIQUES ET OBJECTIFS POURSUIVIS		44
1	INTRODUCTION - CONTEXTE	44
2	CHOIX DES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE	44
2.1	<i>Caractérisation physiologique</i>	44
2.2	<i>Caractérisation biochimique</i>	44
2.2.1	Approche sans a priori basée sur le DIGE	44
2.2.2	Approche ciblée (hypothèse oxydative du vieillissement)	45
3	SYNTHESE DES OBJECTIFS	46
CHAPITRE 3 : CARACTÉRISATION PHYSIOLOGIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT 50		
1	INTRODUCTION	50
2	MATERIEL ET METHODES	50
2.1	<i>Matériel biologique</i>	50
2.2	<i>Evaluation des paramètres physiologiques</i>	51
2.2.1	Période d'incubation et index d'âge physiologique	51
2.2.1.1	Période d'incubation	51
2.2.1.2	Index d'âge physiologique	51
2.2.2	Evaluation des paramètres de levée	51
2.2.3	Analyse statistique	51
3	RESULTATS ET DISCUSSION	52
3.1	<i>Evolution des paramètres liés à la germination</i>	52
3.1.1	Evolution du PAI	52
3.1.2	Evolution de la PI	55
3.1.3	Evolution de la durée de dormance	56
3.2	<i>Evolution des paramètres liés à la levée</i>	57
3.2.1	Evolution du pourcentage de germination	57
3.2.2	Evolution du délai avant levée	58
3.2.3	Evolution du nombre de tiges produites	59
4	CONCLUSION	62
CHAPITRE 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE		64
1	INTRODUCTION	64
2	MATERIEL ET METHODES	64
2.1	<i>Matériel biologique</i>	64
2.2	<i>Préparation des extraits protéiques</i>	64
2.2.1	Extraction au phénol	64
2.2.2	Extraction au SDS chaud	65
2.2.3	Dosage des extraits	65
2.2.4	Etape de lavage (Clean-up)	66
2.2.5	Marquage à l'aide de cyanines (application DIGE)	66
2.3	<i>Résolution des protéines en SDS-PAGE</i>	66
2.4	<i>Résolution des protéines en 2D-PAGE</i>	67
2.4.1	Gels de mise au point 7cm	67
2.4.2	Gels analytiques DIGE	67
2.4.3	Gels préparatifs	67
2.5	<i>Post-coloration au SYPRO-Ruby</i>	68
2.6	<i>Numérisation des gels et analyse par logiciel</i>	68
2.6.1	Gels SDS-PAGE	68
2.6.2	Gels 2D analytiques	68
2.6.3	Gels 2D de mise au point 7cm et gels 2D préparatifs	68
2.7	<i>Découpe manuelle et digestion tryptique</i>	69
2.8	<i>Identifications protéiques</i>	69
3	RESULTATS ET DISCUSSION	70
3.1	<i>Comparaison des deux méthodes d'extraction mises au point</i>	70
3.2	<i>Caractérisation par 2D-DIGE de l'évolution du protéome au cours du vieillissement</i>	74
3.2.1	Protéines sur-exprimées au cours du vieillissement	76
3.2.1.1	Identifications en MS-MS	76
3.2.1.2	Données d'abondance des protéines identifiées	81
3.2.2	Protéines sous-exprimées au cours du vieillissement	92

3.2.2.1	Identifications en MS/MS.....	92
3.2.2.2	Données d'abondance des protéines identifiées.....	95
4	CONCLUSION	99

CHAPITRE 5 : ETUDE DU SYSTÈME ANTIOXYDANT ET DES DÉGÂTS OXYDATIFS AU COURS DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT 102

1	INTRODUCTION	102
2	MATERIEL ET METHODES.....	102
2.1	<i>Matériel biologique</i>	102
2.2	<i>Caractérisation des tubercules</i>	102
2.3	<i>Capacité globale d'élimination des radicaux libres</i>	102
2.4	<i>Caractérisation des antioxydants enzymatiques</i>	103
2.4.1	Résolution protéique et dosage des activités en native-PAGE.....	103
2.4.1.1	Extractions protéiques	103
2.4.1.2	Dosage des extraits	103
2.4.1.3	Résolution en native-PAGE.....	103
2.4.1.4	Coloration spécifique de l'activité SOD	103
2.4.1.5	Coloration spécifique de l'activité APX	104
2.4.1.6	Coloration spécifique de l'activité POX	104
2.4.1.7	Coloration spécifique de l'activité CAT	104
2.4.2	Dosages des activités spécifiques en spectrophotométrie	104
2.4.2.1	Extractions protéiques	104
2.4.2.2	Dosage des extraits	104
2.4.2.3	Activité SOD	105
2.4.2.4	Activité APX	105
2.4.2.5	Activité CAT	105
2.5	<i>Caractérisation des antioxydants non enzymatiques</i>	106
2.5.1	Dosage de l'AsA et du DHA	106
2.5.2	Dosage du GSH et du GSSG	106
2.5.3	Dosage des caroténoïdes totaux	107
2.5.4	Dosage des composés phénoliques	107
2.6	<i>Evaluation des dégâts oxydatifs sur lipides</i>	107
2.6.1	Dosage de l'activité LOX	107
2.6.2	Profils en oxylipines	108
2.6.2.1	Extraction des oxylipines libres et estérifiées	108
2.6.2.2	Analyse en HPLC	108
2.7	<i>Dosage spectrophotométrique des résidus carbonyles sur protéines</i>	109
2.8	<i>Traitement statistique des données</i>	110
3	RESULTATS ET DISCUSSION.....	110
3.1	<i>Evolution de la concentration en protéines solubles</i>	110
3.2	<i>Capacité globale d'élimination des radicaux libres</i>	111
3.3	<i>Antioxydants enzymatiques</i>	111
3.3.1	Evolution de l'activité SOD	111
3.3.2	Evolution de l'activité APX.....	112
3.3.3	Evolution de l'activité POX colorée à la diaminobenzidine	113
3.3.4	Evolution de l'activité CAT	114
3.3.5	Approche semi-quantitative complémentaire utilisant la native-PAGE.....	114
3.4	<i>Antioxydants non enzymatiques</i>	116
3.4.1	Evolution des contenus en ascorbate réduit et oxydé.....	116
3.4.2	Evolution du contenu en glutathion réduit et oxydé.....	118
3.4.3	Evolution du contenu en caroténoïdes	119
3.4.4	Evolution du contenu en composés phénoliques et métabolites apparentés.....	120
3.5	<i>Evaluation des dégâts oxydatifs sur lipides</i>	124
3.5.1	Evolution de l'activité LOX.....	124
3.5.2	Evolution des profils d'oxylipines	124
3.6	<i>Evaluation des dégâts oxydatifs sur protéines</i>	127
4	CONCLUSION	129

CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 132

1	INTRODUCTION	132
2	DISCUSSION GENERALE	132
2.1	<i>Synthèse des modifications physiologiques et biochimiques observées au cours du vieillissement</i>	132
2.2	<i>Enseignements tirés de cette étude</i>	139

2.3	<i>Comparaison de notre modèle avec d'autres modèles de vieillissement et de sénescence</i>	145
2.3.1	Vieillissement agronomique et accéléré des graines	145
2.3.2	Sénescence d'organes photosynthétiques et non photosynthétiques	146
3	PERSPECTIVES	150
3.1	<i>Aspects fondamentaux</i>	150
3.2	<i>Aspects appliqués</i>	150

BIBLIOGRAPHIE	154
----------------------	------------

ANNEXES	C
----------------	----------

1.	<i>Description et classification de la pomme de terre (ROUSSELLE et al., 1996)</i>	<i>d</i>
2.	<i>Cycle de production de Solanum tuberosum L. ssp. tuberosum</i>	<i>e</i>
3.	<i>Cartes peptidiques des produits de dégradation de la patatine</i>	<i>f</i>
4.	<i>Gels natifs présentant l'évolution des activités POX, CAT, SOD et APX au cours du vieillissement des tubercules des cv. Bintje et Désirée récoltés en 2004.</i>	<i>g</i>
5.	<i>Méthodologie utilisée pour les identifications en MS/MS</i>	<i>i</i>
6.	<i>Technologie DIGE (fluorescence Difference Gel Electrophoresis)</i>	<i>m</i>

LISTE DES ABREVIATIONS

- % HR : pourcentage d'humidité relative
% m/m : % masse/masse (g / 100 g)
% m/v : % masse/volume (g / 100 ml)
% : pourcent
 ε : coefficient d'extinction molaire
 π : pression osmotique
°C : degré Celsius
 μg : microgramme
 μl : microlitre
13 γ HOT : acide (6Z, 9Z, 11E, 13S)-13-hydroxy-6,9,11-octadecatrienoïque
2D : bidimensionnel
2D-PAGE : électrophorèse bidimensionnelle
ACN : acétonitrile
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine biphosphate
an.vasc : anneau vasculaire
AGE : *advanced glycation end-product* (produits finaux de glycation avancée)
AO : ascorbate oxydase
APX : ascorbate peroxydase
ARNm : acide ribonucléique messenger
AsA : ascorbate (réduit)
ATP : adénosine triphosphate
AV : analyse de la variance
bgt : bourgeon terminal ou apical
BHT : *Butylated HydroxyToluene* (hydroxytoluène butylé)
BSA : *bovin serum albumin* (albumine de serum bovin)
BVA : *biological variation analysis* (analyse des variations biologiques)
C : cytosine
C7BzO : 3-(4-heptyl)phenyl-3-hydroxy-propyl-diméthylammonio-propanesulfonate
CAM : *crassulean acid metabolism* (métabolisme acide crassuléen)
CAT : catalase
cDNA-AFLP : *complementary desoxyribonucleic acid - amplified fragment length polymorphism*
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthyl-ammonio]-1-propane sulfonate
CIPC : isopropyl N-(3-chlorophenyl) carbamate
cort : cortex
CP : *chiral phase* (phase chirale)
CPP : *critical photoperiod* (photopériode critique)
cv. : *cultivar* (pour cultivated variety)
Cy : cyanine
DAD : *diode array detector* (détecteur à barrettes de diodes)
DBI : *double bond index* (index de double liaison)
DHA : déhydroascorbate
DIA : *differential in-gel analysis* (Analyse en gel différentielle)
DIGE : *fluorescence difference gel electrophoresis* (électrophorèse différentielle en gel de polyacrylamide couplée à un marquage fluorescent)

DNPH : 2,4-dinitrophényl hydrazine
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DTT : dithiothréitol
EST : *expressed sequence tag*
e⁻T : chaîne transporteuse d'électrons
FA : *formic acid* (acide formique)
FFA : *free fatty acids* (acides gras libres)
G : guanine
GPX : glutathion peroxydase
GR : glutathion réductase
h : heure
HO : hydroxyde d'acide gras
HPLC : *High Performance Liquid Chromatography* (chromatographie liquide haute performance)
HPO : hydroperoxyde d'acide gras
IA : iodoacétamide
IAA : *indole acetic acid* (acide indole acétique)
IEF : *isoelectric focusing* (focalisation isoélectrique)
IPG : *immobilized pH gradient* (gradient de pH immobilisé)
KDa : kiloDalton
L : linéaire (gradient de pH)
L. : Linné (Carl von)
LAH : *lipolytic acyl hydrolase* (acyl hydrolase lipolytique)
LDS : lithium dodécylsulfate
len : lenticelle
LOX : lipoxygénase
m : moelle
M : molaire
MALDI-TOF : *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*
MDA : malonedialdéhyde
MD(H)A : monodéhydroascorbate
mg : milligramme
min : minute
mM : millimolaire
MOPS : acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique
MW : *molecular weight* (poids moléculaire)
Na₂EDTA : *ethylenediaminetetraacetic acid* (acide éthylène diamine tétra-acétique, sel disodique)
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Native-PAGE : *native-polyacrylamide gel electrophoresis* (électrophorèse en gel natif)
NBT : chlorure de Nitro Blue tetrazolium
nm : nanomètre
oe : œil
O/N : *overnight* (durant la nuit)
PAGE : *polyacrylamide gel electrophoresis* (électrophorèse en gel de polyacrylamide)
PAI : *physiological age index* (index d'âge physiologique)
PAL : phénylalanine ammonialyase
pc : parenchyme cortical
PCD : *programmed cell death* (mort cellulaire programmée)

PDI : protéine disulfide isomérase
pér : périderme
PF : poids frais
ph.e : phloème externe
ph.i : phloème interne
PI : période d'incubation
pI : point isoélectrique
pm : parenchyme médullaire
PMC : potato multicystatine
PMF : *Peptide Mass Fingerprint* (carte peptidique)
PMSF : phénylméthyl sulfonyl fluorure
POX : peroxydase
PS : photosystème
PUFA : *polyunsaturated fatty acids* (acides gras polyinsaturés)
PVPP : poly(vinylpyrrolidone)
R : coefficient de corrélation
R² : coefficient de détermination
Rf : *ratio to front* (rapport de migration par rapport au solvant)
ROS : *reactive oxygen species* (formes actives de l'oxygène)
RP : *reverse phase* (phase inverse)
rpm : révolution par minute
RSA : *radical scavenging activity* (capacité d'élimination des radicaux libres)
RT : *room temperature* (température ambiante)
s(ub)sp : subspecies (sous-espèce)
SDS : sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE : *sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*
(électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS)
sHSP : *small heat-shock protein* (petite protéine de choc thermique)
SOD : superoxyde dismutase
SP : *straight phase* (phase directe)
Sr : écart-type résiduel
st : stolon
T : date de détermination de l'âge physiologique
T₀ : date de défanage
T₁ : date de fin de période d'incubation
TCA : *trichloroacetic acid* (acide trichloroacétique)
TCEP-HCl : tris(2-carboxyéthyl) phosphine hydrochloride
TEMED : *N,N,N',N'*-Tétraméthyléthylènediamine
TFA : *trifluoroacetic acid* (acide trifluoroacétique)
Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Uv : ultraviolet
V : volt
Vh : volt * heure
x : xylème
z.péri : zone périmédullaire

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. A. Structure externe du tubercule de pomme de terre. B. Disposition des yeux à la surface du tubercule.	5
Figure 2. A. Structure interne du tubercule de pomme de terre mature en coupe longitudinale. B. Détail d'une coupe fine des tissus du tubercule de pomme de terre	5
Figure 3. Représentation graphique de la composition biochimique moyenne d'un tubercule de pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	6
Figure 4. Synthèse des principales théories du vieillissement selon un classement en trois catégories.....	10
Figure 5. Balance des systèmes pro- et anti- oxydants et ses conséquences sur la production des formes actives d'oxygène (ROS) intervenant dans l'oxydation protéique.....	11
Figure 6. Evolution du profil de germination en fonction de l'âge physiologique.	13
Figure 7. Diagramme précisant les caractéristiques de sensibilité au vieillissement et de dormance des principales variétés cultivées de pomme de terre	14
Figure 8. Suggestion de relation entre le rendement en tubercules et l'âge physiologique de la semence.	15
Figure 9. Relation évaluée entre l'âge chronologique du tubercule plant et sa vigueur de croissance relative pour le cv. Désirée stocké à 4 et 12 °C.	18
Figure 10. Influence de la durée de conservation à 4 et 12 °C sur la capacité germinative exprimée en g de poids frais par tubercule égermé mis en germination à 18 °C pendant 4 semaines.	20
Figure 11. Version simplifiée des réactions utilisant l'oxygène moléculaire pour produire des ROS.	26
Figure 12. Localisation et acteurs du système antioxydant présents dans les cellules végétales	27
Figure 13. Génération d'hétérotétramères et d'homotétramères au départ de sous-unités CAT provenant de 2 gènes distincts.	29
Figure 14. Cycle de l'ascorbate-glutathion ou cycle de Halliwell-Asada permettant l'élimination de l'H ₂ O ₂ tout en recyclant l'AsA et le GSH	30
Figure 15. Proposition d'interaction entre les tocophérols, les caroténoïdes et l'ascorbate dans l'élimination des radicaux lipidiques peroxy membranaire.....	31
Figure 16. A. Cycle des polyphénols et couplage redox avec l'AsA. B. Fonction prooxydante des composés phénoliques oxydés	32
Figure 17. Réactions d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique par un radical hydroxyle.....	34
Figure 18. Voies enzymatiques utilisant les hydroperoxydes d'acide gras comme substrats métaboliques.....	35
Figure 19. Voies d'altération protéiques activées au cours du vieillissement.	36
Figure 20. Exemple de réaction d'oxydation de la lysine formant un résidu carbonyle de type aldéhyde	37
Figure 21. Réponse cellulaire végétale schématisée à un stress oxydatif de plus en plus poussé.	39
Figure 22. Le rôle central des ROS dans la signalisation végétale.....	40
Figure 23. Modèle généralisé de l'activation de la transduction du signal lié aux ROS.....	41
Figure 24. Les différentes étapes de l'expression génique.....	45
Figure 25. Schéma du travail expérimental.....	48
Figure 26. Evolution du PAI en fonction de la durée de stockage des tubercules des cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004, 2005 et 2006.	53
Figure 27. Evolution de la PI en fonction de la durée de stockage des tubercules des cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004, 2005 et 2006.	55
Figure 28. Evolution de la durée de dormance en fonction de la durée de stockage à 4°C des tubercules des cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004, 2005 et 2006.....	57
Figure 29. Influence de l'âge physiologique des tubercules sur l'évolution du pourcentage de germination en fonction de la durée après plantation.	58
Figure 30. Evolution du délai de levée en fonction du PAI pour les cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2005 et 2006.....	58
Figure 31. Evolution du nombre de tiges produites après 30 jours en fonction du PAI pour les cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2005 et 2006.....	59
Figure 32. Evolution du nombre de tiges produites après 100 jours en fonction du PAI pour les cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2005 et 2006.....	60
Figure 33. Evolution du phénotype de levée à 30 jours en fonction du PAI du cv. Désirée récolté en 2006.	60
Figure 34. Evolution du phénotype de levée à 30 jours en fonction du PAI du cv. Bintje récolté en 2006.	61
Figure 35. Comparaison des méthodes d'extraction au phénol et au SDS chaud.	71

Figure 36. Comparaison des méthodes d'extraction au phénol et au SDS chaud en SDS-PAGE (A). Comparaison des profils protéiques obtenus sur gels 2D de mise au point de 7cm en utilisant les méthodes d'extraction au phénol (B) ou au SDS chaud avec une (C) ou deux étapes (D) d'extraction.	72
Figure 37. Evaluation des méthodes d'extraction au phénol (A) et au SDS chaud (B).	73
Figure 38. Diagramme des gels utilisés pour évaluer l'évolution du protéome de Désirée (récolte 2004) au cours du vieillissement.	74
Figure 39. Exemple de présentation de résultats issus du logiciel DeCyder (module BVA).	75
Figure 40. Carte des spots découpés manuellement sur les gels préparatifs afin d'être analysés en MS/MS.	76
Figure 41. Comparaison des profils d'expression relatifs des produits de dégradation de la patatine au cours du vieillissement des tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004.	81
Figure 42. Conversion des réserves glucidiques végétales en fructose-1,6-biphosphate (A). Utilisation d'un hexose-phosphate par la voie de la glycolyse (B).	83
Figure 43. Organisation des protéasomes 20S et 26S (VIERSTRA, 2003).	85
Figure 44. Représentation schématique du complexe protéolytique du protéasome.	86
Figure 45. Linéarisation des courbes d'absorbance en fonction du volume enzymatique afin de déterminer l'activité SOD spécifique par spectrophotométrie.	105
Figure 46. Evolution des concentrations en protéines solubles au cours du vieillissement des cv. Désirée (A) et Bintje (B).	110
Figure 47. Evolution de la capacité d'élimination de radicaux libres au cours du vieillissement pour les cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004.	111
Figure 48. Evolution de l'activité SOD en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004 et 200.	112
Figure 49. Evolution de l'activité APX en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004 et 2005.	112
Figure 50. Evolution de l'activité POX colorée à la diaminobenzidine en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004.	113
Figure 51. Evolution de l'activité CAT en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004 et 2005.	114
Figure 52. Evolution des concentrations en TAsA, AsA et DHA au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004.	117
Figure 53. Evolution des concentrations en TAsA, AsA et DHA au cours du vieillissement de tubercules du cv. Bintje récoltés en 2004 (A) et 2005 (B).	117
Figure 54. Evolution des concentrations en glutathion total, en GSH et en GSSG au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004.	118
Figure 55. Evolution des concentrations en glutathion total, en GSH et en GSSG au cours du vieillissement de tubercules du cv. Bintje récoltés en 2004 (A) et 2005 (B).	118
Figure 56. Evolution de la concentration en caroténoïdes totaux en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004 et 2005.	119
Figure 57. Evolution des concentrations en acides caftarique et caféique (A) et en tyrosine, phénylalanine et tryptophane (B) au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004.	120
Figure 58. Evolution de la concentration en acides chlorogénique (A), cryptochlorogénique, néochlorogénique et dichlorogénique (B) au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004.	121
Figure 59. Evolution des concentrations en tyrosine, phénylalanine et tryptophane au cours du vieillissement de tubercules du cv. Bintje récoltés en 2004 (A) et en 2005 (B).	121
Figure 60. Evolution des concentrations en acides chlorogénique (A) et caféique (B) au cours du vieillissement de tubercules du cv. Bintje récoltés en 2004 et en 2005.	122
Figure 61. Evolution des concentrations en acides cryptochlorogénique, dichlorogénique et néochlorogénique au cours du vieillissement de tubercules du cv. Bintje récoltés en 2004 (A) et en 2005 (B).	122
Figure 62. Evolution de l'activité LOX en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004 et 2005.	124
Figure 63. Evolution des profils en oxylipines libres du cv. Désirée récolté en 2004.	125
Figure 64. Evolution des profils en oxylipines libres du cv. Bintje récolté en 2004.	125
Figure 65. Evolution des profils en oxylipines estérifiées du cv. Désirée récolté en 2004.	126
Figure 66. Evolution des profils en oxylipines estérifiées du cv. Bintje récolté en 2004.	126
Figure 67. Evolution de la concentration en carbonyles en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004.	128
Figure 68. Chronologie des changements physiologiques et biochimiques observés au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004.	136
Figure 69. Schéma synthétique des principales modifications biochimiques et physiologiques observées au cours du vieillissement des tubercules du cv. Désirée.	138

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Localisation, substrats et produits des systèmes pro- et anti- oxydants végétaux	25
Tableau 2. Paramètres agronomiques des tubercules récoltés au cours des années 2004, 2005 et 2006.....	50
Tableau 3. Synthèse des paramètres physiologiques mesurés au cours du vieillissement des tubercules récoltés en 2004, 2005 et 2006	52
Tableau 4. Modélisation par la méthode des polynômes orthogonaux de l'évolution du PAI au cours du vieillissement des tubercules récoltés en 2004 et 2005	54
Tableau 5. Modélisation par la méthode des polynômes orthogonaux de l'évolution de la PI au cours du vieillissement des tubercules récoltés en 2004 et 2005	56
Tableau 6. Synthèse des principaux paramètres de levée et de germination en fonction du PAI des cv. Désirée et Bintje	62
Tableau 7. Identifications en MS/MS des protéines surexprimées au cours du vieillissement	78
Tableau 8. Identifications MS/MS des protéines surexprimées au cours du vieillissement excisées manuellement, partim produits de dégradation de la patatine.....	80
Tableau 9. Evolution des abondances des protéines surexprimées au cours du vieillissement	88
Tableau 10. Evolution des abondances des protéines surexprimées au cours du vieillissement, partim produits de dégradation de la patatine	91
Tableau 11. Identifications MS/MS des protéines sous-exprimées au cours du vieillissement.....	94
Tableau 12. Evolution des abondances des protéines sous-exprimées au cours du vieillissement.....	98
Tableau 13. Synthèse des résultats obtenus en 2D-DIGE	99
Tableau 14. Variations qualitatives (cadre rouge) et quantitatives (cadres bleus) spécifiques à certaines isozymes du cv. Désirée récolté en 2004.....	115
Tableau 15. Variations qualitatives (cadre rouge) et quantitatives (cadres bleus) spécifiques à certaines isozymes du cv. Bintje récolté en 2004.....	116
Tableau 16. Synthèse de l'évolution du système antioxydant au cours du vieillissement à basse température des cv. Désirée et Bintje	129
Tableau 17. Comparaison des données biochimiques publiées mesurées au cours du vieillissement des tubercules de pomme de terre	135
Tableau 18. Comparaison des données biochimiques publiées mesurées au cours du vieillissement de graines et de fruits	135
Tableau 19. Comparaison des données biochimiques publiées mesurées au cours de la sénescence de différents organes.....	149

INTRODUCTION GENERALE

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est une plante herbacée tubéreuse originaire d'Amérique latine. Sa production mondiale s'élevait à 330 millions de tonnes en 2004 (ANONYME, 2007), ce qui en fait la cinquième plante cultivée après la canne à sucre, le maïs, le blé et le riz. Dans la pratique agricole, le cycle de production de la pomme de terre est principalement végétatif, les tubercules produits constituant à la fois un organe de reproduction asexuée et la partie alimentaire de la plante.

Les performances agronomiques des tubercules semences dépendent fortement de leur âge physiologique. Ce paramètre désigne l'état physiologique du tubercule à un moment donné (REUST, 1986 ; COLEMAN, 2000) et conditionne certaines composantes essentielles du rendement telles que la capacité de cicatrisation des tubercules, le taux de croissance initial de la culture, le nombre de tiges produites ou la date de tubérisation (HARTMANS & VAN LOON, 1987 ; COLEMAN, 2000). L'étude du vieillissement des tubercules plants de pomme de terre en stockage présente par ailleurs des finalités fondamentales. La pomme de terre est en effet considérée par plusieurs auteurs comme organisme modèle dans les études de vieillissement (KUMAR & KNOWLES, 1996b ; KUMAR *et al.*, 1999 ; COLEMAN, 2000, ZABROUSKOV *et al.*, 2002).

En raison des impacts économiques potentiels, de nombreuses tentatives ont été réalisées afin de développer des indicateurs fiables de l'âge physiologique des tubercules semences, que ce soit au niveau biophysique (accumulation de degrés-jours depuis la levée de dormance, somme de température en stockage,...), physiologique (capacité germinative, période d'incubation, index d'âge physiologique,...) ou biochimique (contenu en sucres, lipides ou protéines, activités enzymatiques, contenu en adénosine triphosphate,...). A l'heure actuelle, aucun des indicateurs biophysiques ne rencontre entièrement les objectifs poursuivis, les résultats obtenus étant contradictoires ou peu transposables. Certains indicateurs physiologiques semblent bien adaptés, mais sont peu prédictifs : ils ne permettent pas une détermination rapide de l'âge physiologique avant plantation (CALDIZ *et al.*, 2001). Les études biochimiques, quant à elles, sont soit très fondamentales (elles ciblent souvent le processus de développement du tubercule), soit très générales (expériences de stockage sans caractérisation physiologique poussée) et n'ont pas encore permis de mettre au point des marqueurs fiables de l'âge physiologique.

Dans ce contexte, deux approches complémentaires ont été développées afin de caractériser l'âge physiologique de tubercules de pomme de terre tant au niveau physiologique que biochimique.

L'approche physiologique développée dans le chapitre 3 se base sur les profils de germination et de levée afin de caractériser l'évolution de l'état physiologique du tubercule au cours du stockage à basse température (4°C). Cette approche présentée au chapitre 3 devrait permettre (1) d'établir un cadre de référence plus précis qu'une simple mesure de l'âge chronologique des tubercules (durée de stockage), (2) de caractériser les variations interannuelles et intervariétales et (3) d'identifier les valeurs d'index d'âge physiologique critiques correspondant aux différents stades phénotypiques résultant de l'évolution de l'âge physiologique.

L'approche biochimique comporte, quant à elle, deux volets complémentaires présentés aux chapitres 4 et 5.

Le premier axe de recherche vise à caractériser l'évolution du protéome au cours du vieillissement en utilisant une version multiplexée de l'électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE) permettant d'établir un parallèle avec les données physiologiques. Cette approche sans *a priori* nécessite la mise au point d'une méthode d'extraction spécifique au tubercule de pomme de terre afin d'obtenir des gels exploitables. Au-delà de l'aspect technique, l'objectif poursuivi est de mesurer l'évolution des profils protéiques au cours du vieillissement et d'identifier les protéines différenciellement exprimées par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Les rôles physiologiques de ces protéines ainsi que les impacts des changements d'abondance seront présentés dans le chapitre 4 ainsi que dans la discussion générale.

Au départ des données obtenues en électrophorèse bidimensionnelle, une approche biochimique ciblée est ensuite développée. L'hypothèse expérimentale retenue repose sur l'une des théories du vieillissement les plus souvent citées dans la littérature : la théorie oxydative du vieillissement (WICKENS, 2001 ; SOHAL, 2002b). De nombreuses études partielles ont déjà été menées sur ce sujet sans faire de lien direct avec une mesure de l'âge physiologique des tubercules ou en considérant des durées de stockage peu réalistes au niveau agronomique. Notre recherche se veut plus intégrée et s'inscrit en complémentarité des données physiologiques et biochimiques obtenues sans *a priori*. Au cours du chapitre 5, une caractérisation globale de l'évolution du système antioxydant sera ainsi présentée en insistant sur les corrélations potentielles pouvant être établies avec les données précédemment obtenues. Une attention particulière sera également apportée à l'évaluation des dégâts oxydatifs sur les lipides et les protéines, ces deux classes de biomolécules étant des cibles préférentielles des attaques oxydatives (SOHAL, 2002b ; SPITELLER, 2003).

L'ensemble des résultats obtenus sera finalement discuté dans le contexte de la théorie oxydative du vieillissement. Le comportement de notre modèle sera comparé à celui d'autres modèles étudiant le vieillissement des graines et la sénescence d'organes photosynthétiques ou non photosynthétiques. Enfin, les différents enseignements de cette thèse seront présentés et les perspectives qu'ils suscitent seront développées dans un contexte de recherche tant fondamentale qu'appliquée.

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1 DESCRIPTION DE L'ORGANISME ETUDIÉ

1.1 Classification

Originnaire d'Amérique latine (Pérou, Bolivie, Equateur et centre du Mexique), le genre *Solanum* L. regroupe environ un millier d'espèces dont plus de 200 sont tubéreuses (ROUSSELLE *et al.*, 1996). L'espèce cultivée dans nos régions, *Solanum tuberosum* L. *subsp. tuberosum* comprend plusieurs centaines de variétés différant par la forme, la couleur, la texture ou encore par le contenu en amidon des tubercules. Sa classification exhaustive est présentée en annexe 1.

1.2 Importance économique

Sur les 330 millions de tonnes de pommes de terre (*Solanum tuberosum* L.) produites en 2004, 42,9 et 39,3 % provenaient respectivement d'Europe et d'Asie (ANONYME, 2007). La superficie totale occupée par les cultures de pommes de terre au niveau mondial s'élevait en 2004 à 19 millions d'hectares (ANONYME, 2007). En termes de consommation, la pomme de terre est la première racine féculente consommée (93,01 g/personne/jour) au niveau mondial avant le manioc, les patates douces et les ignames. Les quantités de pommes de terre consommées ne rivalisent cependant pas avec les féculents céréaliers tels que le blé et le riz (Anonyme, 2007).

1.3 Description de l'appareil caulino-foliaire (Annexe 1)

1.3.1 Appareil aérien

L'appareil aérien est constitué de plusieurs tiges principales souvent ailées, la plante adoptant avec l'âge un port plus ou moins étalé (caractéristique variétale). Les feuilles sont alternes, composées imparipennées et comportent de 7 à 15 grandes folioles latérales primaires flanquées de folioles secondaires, de folioles intercalaires et de foliolules se distinguant par leur mode d'insertion sur le rachis (ROUSSELLE *et al.*, 1996). Les fleurs sont souvent stériles. La production de fruit (baie sphérique) est donc généralement rare.

1.3.2 Appareil souterrain

L'appareil souterrain comprend le tubercule mère desséché, les stolons (tiges souterraines diagéotropes) portant éventuellement des tubercules fils dans leur région subapicale ainsi que des racines adventives (ROUSSELLE *et al.*, 1996). Il représente la partie la plus intéressante de la plante puisqu'on y trouve les tubercules qui confèrent à la pomme de terre sa valeur alimentaire. Cultivé pour la consommation, pour la transformation ou comme semence, le tubercule représente environ 75 à 85 % de la matière sèche totale de la plante (ROUSSELLE *et al.*, 1996).

1.3.2.1 Structure externe du tubercule

A l'extrémité apicale du tubercule, ou couronne, se trouve le bourgeon terminal (bg t ou apical) tandis qu'à l'opposé, du côté proximal (talon), se trouve le point d'attache du stolon (st), l'ombilic (Figure1A). Les yeux (oe), disposés régulièrement sur le tubercule

suivant une phyllotaxie spiralée (Figure 1B), correspondent à l'emplacement des bourgeons axillaires. Des lenticelles (len) parcourent la surface du tubercule et jouent un rôle essentiel dans la respiration du tubercule (ROUSSELLE *et al.*, 1996).

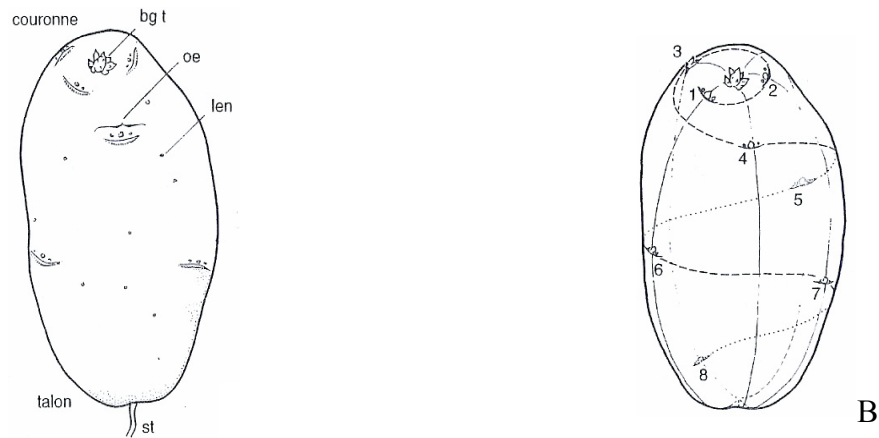


Figure 1. A. Structure externe du tubercule de pomme de terre présentant le bourgeon terminal (bg t), les yeux (oe), les lenticelles (len) et le stolon (st). B. Disposition des yeux à la surface du tubercule : les chiffres de 1 à 8 représentent les yeux (ROUSSELLE *et al.*, 1996).

1.3.2.2 Structure interne du tubercule

En coupe longitudinale d'un tubercule mature (Figure 2A), on distingue de l'extérieur vers l'intérieur : le péricarde (pér), le cortex (cort) ou parenchyme cortical, l'anneau vasculaire (an.vasc) composé de phloème externe, de xylème et de parenchyme vasculaire. On peut également remarquer la zone périmédullaire (z.péri) ou parenchyme périmédullaire contenant le phloème interne et enfin, la moelle (m) ou parenchyme médullaire (Figure 2B) (ROUSSELLE *et al.*, 1996).

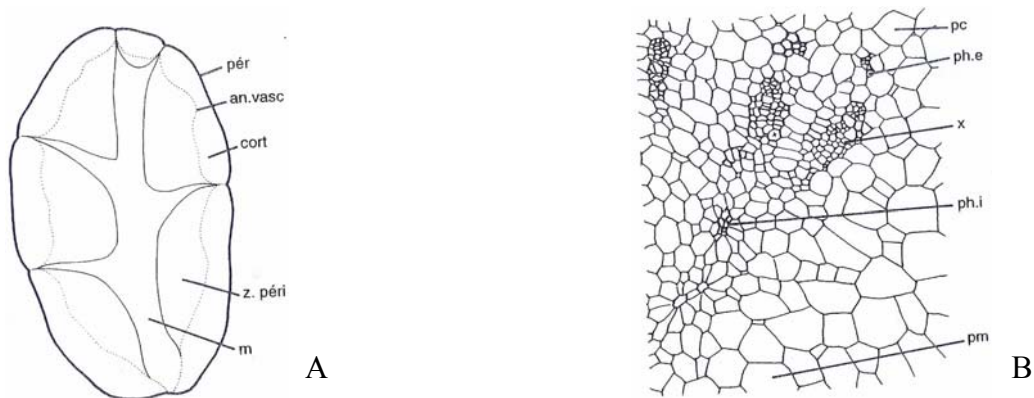


Figure 2. A. Structure interne du tubercule de pomme de terre mature en coupe longitudinale : péricarde (pér), anneau vasculaire (an.vasc), cortex (cort), zone périmédullaire (z.péri), moelle (m). B. Détail d'une coupe fine des tissus du tubercule de pomme de terre : parenchyme cortical (pc), phloème externe (ph.e), xylème (x), phloème interne (ph.i), parenchyme médullaire (pm) (ROUSSELLE *et al.*, 1996).

Les différents parenchymes (cortical, périvasculaire, périmédullaire, médullaire) contiennent de grandes quantités de grains d'amidon qui diffèrent par leur taille (diamètre de 7 à 32 μm) et leur forme (ovoïde, sphérique) (ROUSSELLE *et al.*, 1996).

1.3.2.3 Composition biochimique du tubercule (Figure 3)

Les caractéristiques morphologiques, chimiques et biochimiques du tubercule de pomme de terre varient principalement en fonction de la variété, mais dépendent également des techniques culturales, des conditions climatiques et de l'âge physiologique de la pomme de terre. Les pourcentages présentés dans ce chapitre sont des valeurs moyennes, la composition biochimique étant influencée par les différents paramètres précités.

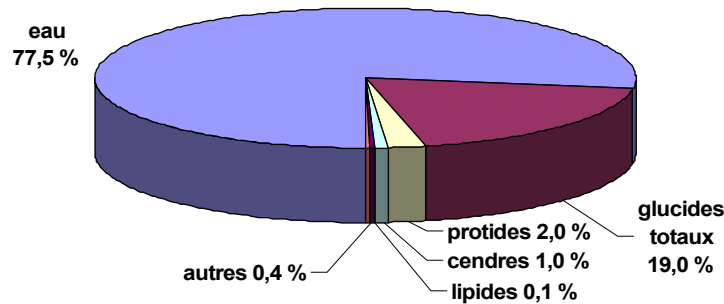


Figure 3. Représentation graphique de la composition biochimique moyenne d'un tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la matière fraîche totale.

Le tubercule de pomme de terre est un organe de stockage contenant à maturité une moyenne de 77,5 % d'eau. La matière sèche, exprimée en pourcentage de la matière fraîche, se répartit globalement en 19,4 % de glucides totaux (principalement amidon, saccharose, glucose, fructose, cellulose brute et substances pectiques), 2,0 % de protides (protéines, acides aminés libres et bases azotées), 1,0 % de cendres (majoritairement du potassium) et 0,1 % de lipides. Des acides organiques (acides citrique et ascorbique entre autres), des substances phénoliques (acides chlorogénique et caféique, pigments, etc.) complètent cette composition, mais ne sont présents qu'en faible quantité dans le tubercule (ROUSSELLE *et al.*, 1996 ; MATTILA & HELLSTRÖM, 2007).

1.4 Cycle végétatif (DELAPLACE & FAUCONNIER, 2004)

Les différentes étapes du cycle végétatif de la pomme de terre sont illustrées en annexe 2. Les objectifs de production poursuivis dépendent du type de culture (REUST, 1982) :

- **Pomme de terre primeur** : limiter le nombre de tubercules au profit de leur grosseur et d'une extrême précocité.
- **Pomme de terre plant** : nombre élevé de tubercules de calibre moyen et d'une bonne précocité.
- **Pomme de terre de consommation (marché du frais)** : un nombre élevé de tubercules d'un calibre moyen à grand, sans toutefois dépasser le calibre supérieur.
- **Pomme de terre de consommation (transformation industrielle)** : un rendement élevé en tubercules et amidon.

1.4.1 Plantation et buttage

La plantation des tubercules semences se réalise à l'aide de planteuses mécaniques à une profondeur telle que leur partie supérieure se trouve à peu près au niveau de la surface du sol avant plantation. Le calibre de plantation varie entre 35 et 55 mm (HARTMANS & VAN LOON, 1987 ; JEFFERIES & LAWSON, 1991 ; ROUSSELLE *et al.*, 1996). La densité de plantation est fonction du type de production, le but étant de maximiser le rendement pour un calibre

donné. Selon le type de sol travaillé (léger ou lourd), le buttage est respectivement réalisé en une étape lors de la plantation ou en deux étapes espacées de 10 à 15 jours (ROUSSELLE *et al.*, 1996).

1.4.2 Développement des fanes

Après plantation, les tubercules se comportent comme une source physiologique : ce sont des exportateurs nets de saccharose à destination des méristèmes. Les germes s'allongent jusqu'à atteindre le niveau du sol, ce qui constitue le stade de levée. Ils poursuivent leur croissance en évoluant en tiges feuillées, la plante devenant autotrophe dès que la surface foliaire atteint 300 à 400 cm² (ROUSSELLE *et al.*, 1996).

1.4.3 Développement des stolons

Les bourgeons aériens des tiges donnent des rameaux et les bourgeons souterrains produisent généralement des stolons (ROUSSELLE *et al.*, 1996). L'induction de la formation des stolons, leur croissance, l'arrêt de leur développement longitudinal et l'initiation des tubercules peuvent se dérouler simultanément sur un même plant de pomme de terre (VREUGDENHIL & STRUIK, 1989).

1.4.4 Développement des tubercules

L'initiation de la tubérisation dépend d'un stimulus dont l'intensité est fonction de la longueur du jour, de la température nocturne et de la fertilisation azotée (SLATER, 1968 ; EWING & WAREING, 1978). STRUIK *et al.* (1987) ont cependant émis l'hypothèse que ce stimulus était indépendant de la longueur du jour, mais que son transport via l'apoplasme était stimulé par de longues nuits. L'induction de la tubérisation est favorisée par des photopériodes inférieures à la photopériode critique (CPP : *critical photoperiod*) propre à chaque génotype. Les pommes de terre du groupe *Andigena* possèdent une CPP de 12 ou 13 heures, alors que les représentants du groupe *Tuberosum* ont été sélectionnés afin d'obtenir une CPP de 15 heures ou plus. La pomme de terre est donc une plante de jours courts pour l'induction de la tubérisation (REUST, 1982).

Lors de l'initiation de la tubérisation, certaines extrémités de stolons ne produiront pas de tubercule, ce qui semble lié à des différences de perception du signal inducteur de la tubérisation ou à des variations de concentration en inhibiteurs de la tubérisation (VREUGDENHIL & STRUIK, 1989). Le modèle de développement suivi par les tubercules varie considérablement entre les tubercules d'une même plante. Une hiérarchie s'établit entre ces organes de stockage qui entrent en compétition pour les nutriments : les tubercules croissant le plus vite limitent le développement des autres tubercules (VERHEES, 2002).

Dès sa formation, le jeune tubercule se comporte comme un puits physiologique : c'est un importateur net de saccharose. Il se trouve en état de repos végétatif ou dormance (cf. *supra* 2.3.7. Dormance) et est incapable de germer, même dans des conditions favorables (REUST, 1982).

1.4.5 Défanage

Le défanage consiste à éliminer en fin de culture la partie aérienne du plant de pomme de terre afin de stopper la croissance des tubercules. La méthode la plus utilisée est le défanage chimique. Il intervient plus ou moins précocement selon le type de production. Après défanage, les tubercules sont laissés en terre pour une période de 2 à 4 semaines afin de permettre leur maturation (renforcement du périoderme).

1.4.6 Récolte

La durée du cycle végétatif de la pomme de terre est variable (90 à 150 jours en France). L'arrachage des tubercules intervenant en fin de cycle est une opération délicate qui influence la qualité de présentation et l'aptitude à la conservation des tubercules. Les arracheuses mécaniques actuelles permettent l'arrachage de tous les tubercules en limitant le risque de meurtrissures et en éliminant la terre, les mottes, les cailloux et les fanes desséchées.

1.4.7 Séchage

Si les tubercules ont été récoltés humides, ils seront séchés avant stockage afin d'éviter l'apparition de pourritures. Avec une capacité de ventilation élevée (100m³/h par mètre cube de pommes de terre pour un tas en vrac), le séchage nécessite en moyenne de deux à trois jours de ventilation (MARTIN & GRAVOUEILLE, 2001).

1.4.8 Période de cicatrisation

La durée de la période de cicatrisation post-récolte est généralement de 2 à 3 semaines (REUST, 1982 ; MARTIN & GRAVOUEILLE, 2001). La cicatrisation des blessures s'effectue d'autant plus vite que la température est élevée : la fourchette idéale se situe entre 12 et 18°C. Pendant cette période, l'hygrométrie est normalement élevée et comprise entre 85 et 95 % (MARTIN & GRAVOUEILLE, 2001).

1.4.9 Stockage – Inhibition de la germination

A l'exception des pommes de terre de primeur, commercialisées dès la récolte, tous les autres types sont susceptibles d'être conservés pendant une période pouvant aller de quelques semaines à plus de 8-10 mois (VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987 ; KNOWLES & KNOWLES, 1989 ; ROUSSELLE *et al.*, 1996 ; COLEMAN, 2000 ; MARTIN & GRAVOUEILLE, 2001). La durée de stockage « agronomiquement intéressante » se situe donc dans cet intervalle.

Durant cette période, des traitements chimiques ou thermiques peuvent être réalisés afin d'inhiber la germination. L'isopropyl N-(3-chlorophenyl) carbamate (CIPC) est un antigerminatif irréversible au contraire de l'hydrazide maléique ou du carvone. Il est utilisable lors du stockage des tubercules de pomme de terre de consommation (marché du frais et transformation). Selon le débouché, une température de stockage minimale de 6°C peut être retenue pour la pomme de terre de transformation, une température de 3°C pour la pomme de terre destinée au marché du frais, l'humidité relative étant, quant à elle, ajustée afin de limiter le déficit de pression de vapeur des tubercules (MARTIN & GRAVOUEILLE, 2001).

2 ÂGE PHYSIOLOGIQUE ET VIEILLISSEMENT DES TUBERCULES DE *SOLANUM TUBEROSUM* L.

2.1 Introduction

Le cycle végétatif de la pomme de terre débute par la plantation de tubercules semences. Ces derniers doivent avoir atteint un âge physiologique adéquat au moment de la plantation afin de produire un rendement optimal. Leur capacité de cicatrisation (BAJJI *et al.*, 2007), leur profil de germination et, par conséquent, leurs qualités de semences sont également fortement influencés par leur âge (LULAI & ORR, 1995 ; COLEMAN, 2000). Il est

généralement admis que tout stress (blessure, température élevée, déshydratation...) augmente l'âge physiologique du tubercule.

Dans ce contexte agronomique, un des objectifs de cette recherche est d'établir un lien entre l'âge physiologique des tubercules et différents paramètres biochimiques. Ainsi, après avoir posé les bases théoriques de cette étude, ce chapitre abordera la définition des différents termes utilisés pour appréhender la problématique du vieillissement ainsi que les méthodes utilisables pour évaluer l'âge physiologique des tubercules de pomme de terre.

2.2 Les théories du vieillissement issues des modèles animaux

2.2.1 Généralités

Le cycle vital des êtres animaux peut être divisé en deux parties, l'une préreproductive durant laquelle les organismes atteignent leur niveau maximal de vigueur physique (« *Fitness* »), l'autre postreproductive durant laquelle des détériorations biochimiques et physiologiques interviennent et provoquent une augmentation du taux de mortalité (SOHAL, 2002a).

On considère généralement que le processus de vieillissement intervient dans la seconde partie de la vie. A l'heure actuelle, on ignore si le vieillissement est causé par un ou plusieurs facteurs et si ces mécanismes du vieillissement sont conservés entre les différents groupes phylogénétiques (SOHAL, 2002a). Néanmoins, au vu des similarités biochimiques, il se pourrait que les mécanismes du vieillissement soient partagés entre les différentes espèces vivant sur Terre. Toute hypothèse tentant d'élucider le processus de vieillissement doit permettre d'expliquer les différences de vigueur physique existant entre des individus jeunes et âgés, ainsi que les différences de longévité entre taxons et les effets de différentes mutations et conditions environnementales sur cette longévité (SOHAL, 2002a).

Avant de présenter les différentes théories visant à expliquer le vieillissement, il importe de remarquer que, sémantiquement, les termes vieillissement et sénescence peuvent être utilisés comme synonymes en gérontologie humaine, ce qui contraste nettement avec leur utilisation dans un contexte végétal (DE MAGALHÃES, 2006). Dans ce cadre théorique, nous parlerons donc de vieillissement *sensu lato* (*s.l.*). Une synthèse des différentes hypothèses explicatives proposées sera présentée dans les chapitres suivants en mettant l'accent sur une des théories majeures du vieillissement : la théorie des attaques oxydatives.

2.2.2 Bases théoriques

Au sein d'un même individu, le processus de vieillissement est **hétérochrone** : les différents organes et systèmes cellulaires commencent à vieillir à des moments différents. Il est également **hétérotrope** : les différents constituants d'un organisme peuvent suivre des modèles de vieillissement différents. Finalement, on qualifie le processus de vieillissement d'« **hétérodirectionnel** », ce qui signifie que la direction suivie par les processus de vieillissement au sein d'un organisme est variable : certains processus seront sur-régulés et d'autres seront sous-régulés (SEMSEI, 2000 ; THOMAS, 2002).

De nombreuses théories ont été proposées afin de décrire le processus complexe du vieillissement *s.l.* des systèmes biologiques. COLEMAN (2000) et GERSHON & GERSHON (2000) distinguent deux groupes de théories du vieillissement : les théories **stochastiques** où l'accumulation de dégâts moléculaires aléatoires entraîne la perte d'informations vitales pour la cellule et les théories **systémiques** où une séquence d'activités métaboliques organisées et

contrôlées génétiquement mène à la mort. Cette distinction se retrouve, du moins partiellement, dans la synthèse proposée par SEMSEI (2000) sur modèle animal (Figure 4). Selon cet auteur, les théories programmées (systémiques) postulent l'existence de programmes internes ou externes qui déterminent le processus de vieillissement *ab ovo*. Les théories des erreurs (stochastiques) impliquent, quant à elles, explicitement ou implicitement l'intervention de facteurs destructifs causant des erreurs, des mutations, des désordres fonctionnels entraînant *in fine* des dysfonctionnements et la mort.

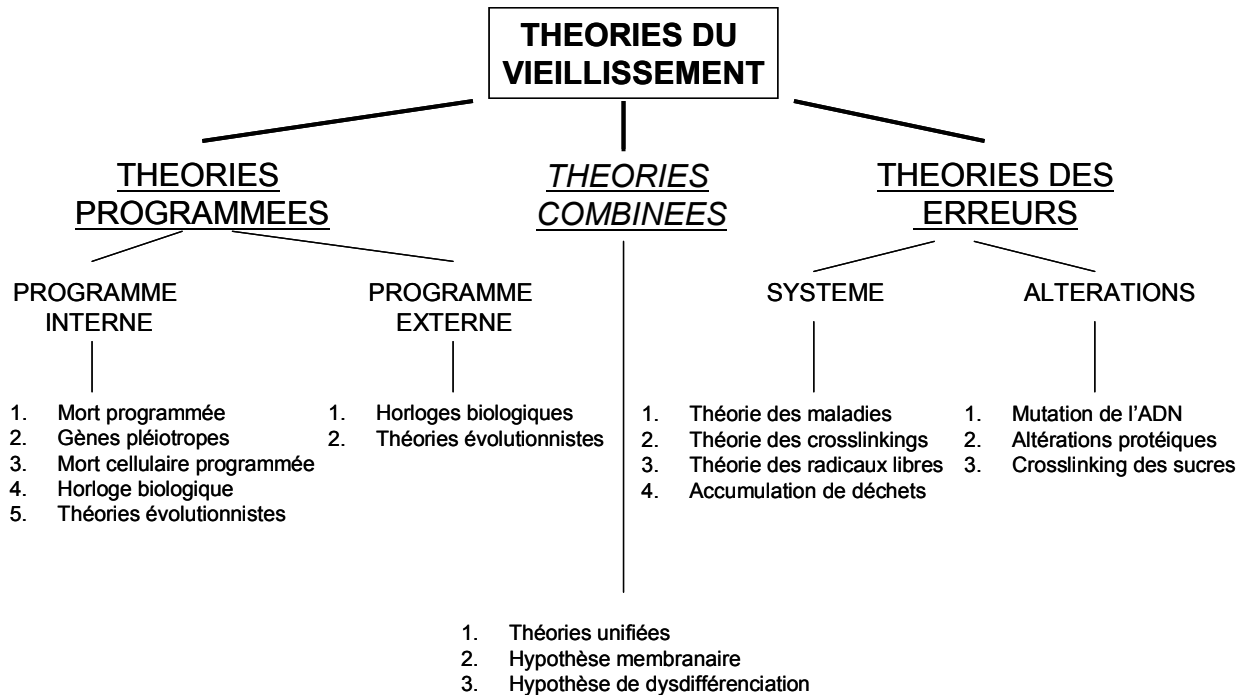


Figure 4. Synthèse des principales théories du vieillissement selon un classement en trois catégories (SEMSEI, 2000).

Si l'on transpose ce formalisme au niveau végétal, les théories des erreurs et les théories programmées s'appliquent respectivement aux concepts de vieillissement *sensu stricto* et de sénescence tels qu'ils seront définis au point 2.3 (HARTMANN, 1992).

La plupart de ces hypothèses de travail considèrent qu'il existe une cause universelle du vieillissement pouvant s'appliquer à l'ensemble des êtres vivants. Ces théories sont donc monistes, ce qui peut éventuellement nuire à leur pouvoir explicatif. Certains auteurs proposent d'ailleurs à ce titre des théories multifactorielles se basant sur le degré d'information de l'organisation du système considéré.

Actuellement, ce type d'approche globale n'est cependant pas facilement transposable aux modèles végétaux où l'on manque encore de données pour certaines théories explicatives.

2.2.3 Théorie des attaques oxydatives

Parmi l'ensemble des théories proposées pour expliquer le vieillissement animal, la théorie des attaques oxydatives est la plus souvent citée dans la littérature (WICKENS, 2001 ; SOHAL, 2002b). Cette théorie a été formulée pour la première fois en 1956 par Denham HARMAN, mais n'a cependant toujours pas été démontrée à l'aide de preuves directes (WICKENS, 2001 ; SOHAL *et al.*, 2002 ; SOHAL, 2002a). Elle postule que l'accumulation de modifications non enzymatiques sur les biomolécules cellulaires (ADN, lipides, protéines et sucres) causées par des attaques de formes actives d'oxygène (ROS : *Reactive Oxygen*

Species) est l'un des facteurs principaux responsables de la détérioration fonctionnelle des cellules âgées ou en cours de vieillissement (SOHAL, 2002b ; BLOKHINA *et al.*, 2003).

Ces attaques oxydatives résultent généralement d'un déséquilibre de la balance des systèmes pro- et anti-oxydants (Figure 5, exemple protéique végétal), un stress oxydatif pouvant donc résulter d'une surproduction de ROS et/ou d'une défaillance des systèmes antioxydants (BLOKHINA *et al.*, 2003).

Les données aujourd'hui disponibles semblent pencher en faveur d'un modèle où l'augmentation de la production de ROS est le facteur primaire responsable des dommages oxydatifs. Il est possible que cette augmentation de la production de ROS endommage de façon secondaire les systèmes protéolytiques (SOHAL 2002b). Les ROS agiraient aléatoirement, mais leurs cibles se différencieraient par leur proximité et leur sensibilité aux attaques, rendant ainsi le phénomène spécifique à certaines protéines (SOHAL, 2002b).

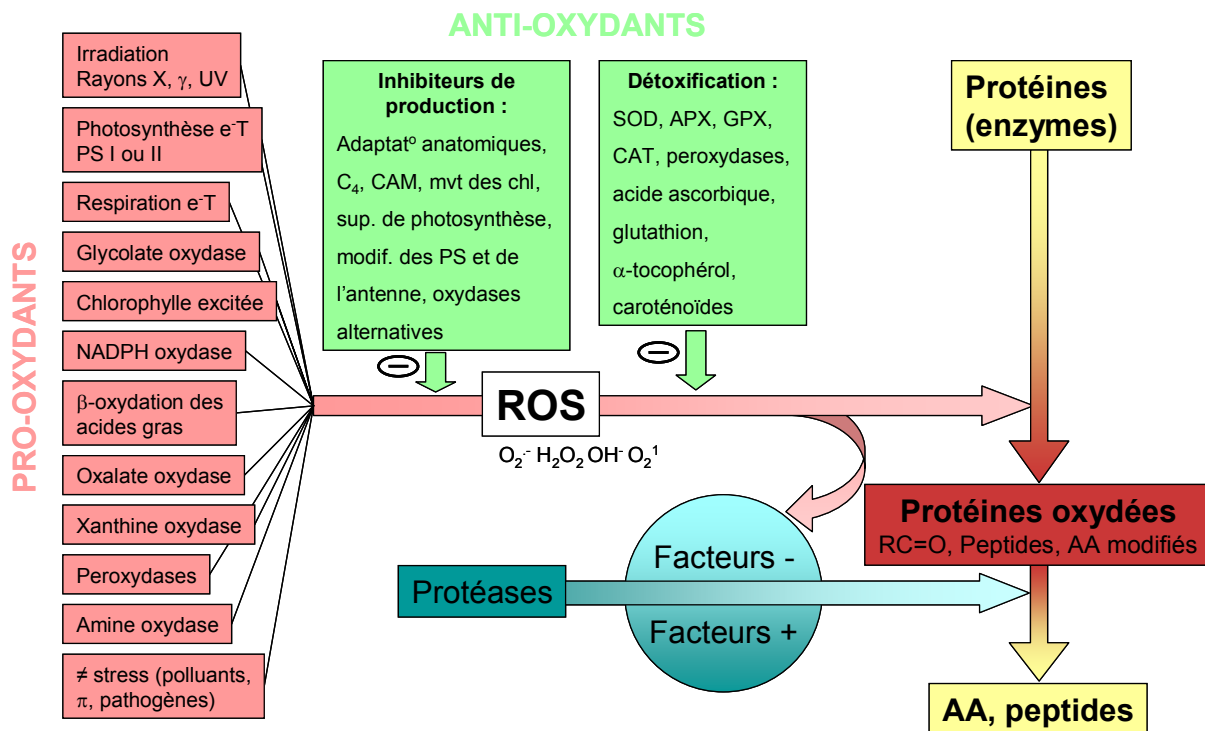


Figure 5. Balance des systèmes pro- et anti- oxydants et ses conséquences sur la production des formes actives d'oxygène (ROS) intervenant dans l'oxydation protéique (adapté de MITTLER, 2002).

Les approches utilisées jusqu'à présent pour démontrer cette théorie font principalement appel à des animaux transgéniques surexprimant des enzymes antioxydantes et à des mutants unigéniques. L'interprétation de ces études est cependant délicate et prête à controverse. En effet, la durée de vie chronologique ne peut être utilisée comme seul indicateur du taux de vieillissement et doit être mise en relation avec l'intensité du métabolisme. Les augmentations de durée de vie des mutants unigènes impliquent dans la majorité des cas une perte de fonction spécifique qui diminue le taux d'utilisation énergétique. On a donc affaire à des animaux hypométaboliques qui, bien que vivant plus longtemps, ne possèdent pas les mêmes taux de reproduction et de consommation d'oxygène que les souches sauvages (SOHAL, 2002).

2.3 Définitions

2.3.1 Note préliminaire

A l'heure actuelle, parmi les différents concepts menant à la mort végétale, il n'y a pas de consensus général quant aux limites et aux chevauchements de notions telles que vieillissement, mort, sénescence, maturation, détériorations post-récolte, réaction d'hypersensibilité, lésions, chlorose et nécrose (THOMAS *et al.*, 2003). Les définitions présentées ci-dessous sont néanmoins celles qui sont le plus souvent rencontrées dans la littérature récente. Elles sont présentées, pour la plupart, dans un contexte végétal strict et constituent un préalable essentiel à la discussion des résultats. Certaines des définitions présentées sont volontairement extensives. Dans un souci de cohérence, elles comportent, en plus des notions à caractère biochimique ou physiologique, un volet agronomique assez large.

2.3.2 Mort cellulaire programmée (PCD : Programmed Cell Death)

Au niveau cellulaire, la PCD est définie comme un processus par lequel une cellule végétale se suicide activement. Elle implique l'activation d'une série d'événements spécifiques déclenchée par des stimuli développementaux ou environnementaux (VAN DOORN & WOLTERING, 2004). Physiologiquement parlant, elle se caractérise par une augmentation transitoire des concentrations en ROS qui initie des cascades de transduction de signal. Ces signaux modifient *in fine* l'expression génique (VAN BREUSEGEM & DAT, 2006). Il est également à noter que la réaction d'hypersensibilité observée en cas d'interaction incompatible entre une plante et un pathogène est un type particulièrement rapide de PCD (HEATH, 1998, VAN BREUSEGEM & DAT, 2006). Cette réaction se caractérise par une surproduction de ROS couplée à une inhibition des antioxydants enzymatiques impliquant notamment l'acide salicylique (MITTLER, 2002).

2.3.3 Apoptose

L'apoptose est un type particulier de PCD que l'on rencontre principalement chez les cellules animales. Elle se caractérise par des changements ultrastructuraux et biochimiques tels que la condensation chromatique, le bourgeonnement de la membrane nucléaire (*blebbing*), le clivage de l'ADN en fragments nucléosomaux et l'activation de protéases à cystéine spécifiques appelées caspases (HEATH, 1998). Plusieurs changements morphologiques spécifiques à l'apoptose animale se retrouvent chez les végétaux notamment en cas de réaction d'hypersensibilité résultant d'un stress biotique (condensation et fragmentation nucléaires, diminution du volume du cytoplasme, DANON *et al.*, 2000 ; YOSHIDA, 2003). Cependant, certaines caractéristiques cytologiques telles que la fragmentation cellulaire et la phagocytose des corps apoptotiques en résultant n'ont à ce jour pas été décrites chez les plantes (DANON *et al.*, 2000).

2.3.4 Nécrose

Ce concept désigne une mort cellulaire accidentelle, passive et non discriminante causée par des facteurs extrinsèques tels que l'accumulation phytotoxique de molécules spécifiques après un épisode de stress traumatique (SPITTELER, 2003 ; VAN BREUSEGEM & DAT, 2006). Ce processus menant à la mort cellulaire par accumulation de ROS à un niveau phytotoxique est généralement très rapide (VAN DOORN & WOLTERING, 2004).

2.3.5 Vieillesse et âge physiologique

A l'échelle d'un organe végétal, le vieillissement est principalement dû à des processus dégénératifs stochastiques dirigés par des forces extérieures (par exemple, les

conditions environnementales) qui dépassent progressivement le métabolisme domestique (*housekeeping*) contrôlé génétiquement et son potentiel de protection (HADFIELD & BENNETT, 1997 ; BECK & SCHEIBE, 2003). Il désigne l'évolution de l'âge physiologique du tubercule de pomme de terre. Le taux de vieillissement est fonction du cultivar, de l'individu et de la température (REUST, 1982 ; COLEMAN, 2000).

L'âge physiologique caractérise quant à lui l'état physiologique du tubercule à un moment donné, cet état influençant sa capacité de production de tubercules fils (REUST, 1982 ; REUST, 1986 ; COLEMAN, 2000). Il dépend d'une part, de son âge chronologique et d'autre part, des conditions subies pendant la croissance, la récolte et la conservation. Un tubercule sera d'autant plus âgé que le temps écoulé à partir de sa date de formation aura été long et la température élevée (BURTON, 1966 ; REUST, 1982).

L'âge physiologique est donc la conséquence d'une évolution qui se déroule selon une séquence bien définie au sein des tissus de réserve, et qui s'exprime d'une manière visible par l'influence qu'elle exerce à tout instant sur les processus de croissance et de tubérisation des germes (MADEC, 1958 ; PERENNEC & MADEC, 1960).

Les modèles de croissance suivis par les tubercules de pomme de terre dépendent ainsi fortement du processus de vieillissement (KRIJTHE, 1962 ; REUST, 1982 ; HARTMANS & VAN LOON, 1987 ; VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987 ; FAUCONNIER *et al.*, 2002). Quatre stades définis sur base morphologique sont classiquement reconnus (Figure 6) :

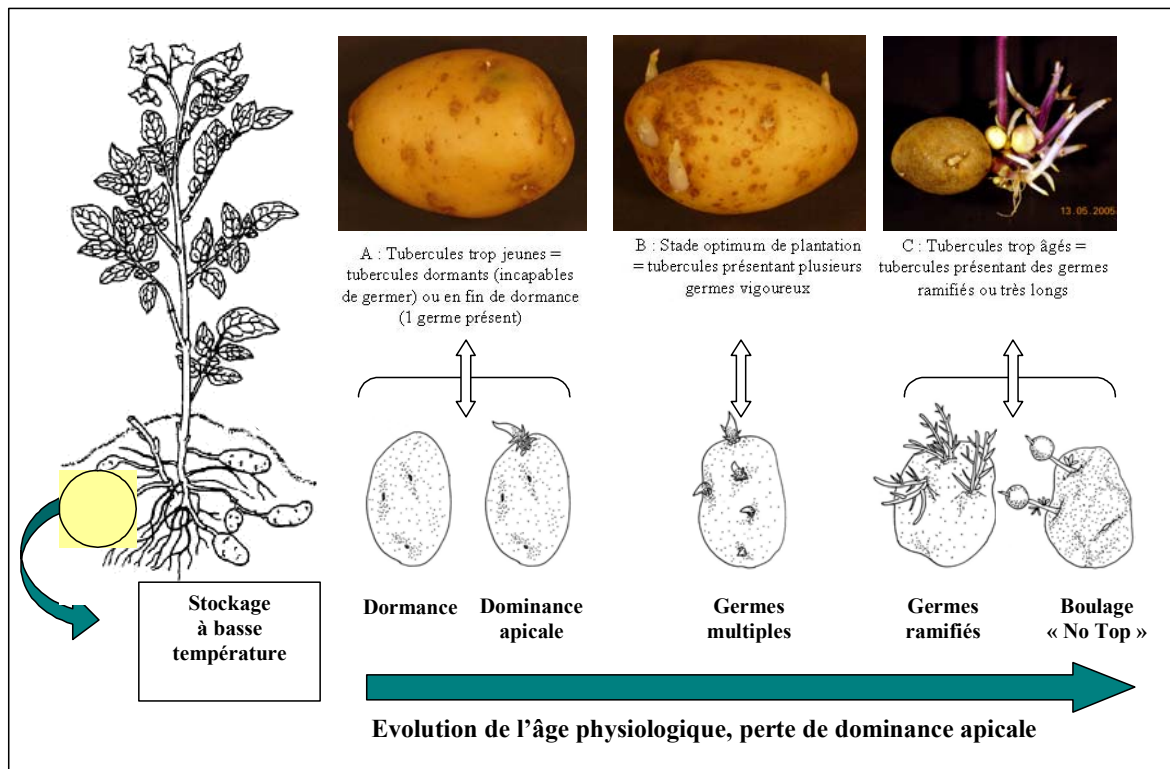


Figure 6. Evolution du profil de germination en fonction de l'âge physiologique.

Stade monogerme : ce stade est caractérisé par la dominance apicale. De tels tubercules semences produiront des plantes avec peu de tiges. Un faible nombre de tiges donnera peu de tubercules, mais ceux-ci seront de plus gros calibre (JOHNSON, 1997).

Stade germes multiples : des tubercules de ce stade présentent des germinations multiples. Tous les yeux du tubercule sont susceptibles de germer. Ces tubercules produiront des plantes avec plusieurs tiges, ce qui augmentera le nombre de tubercules fils (JOHNSON, 1997).

Stade germes ramifiés : ce stade est caractérisé par une ramification importante des germes. Ces derniers sont chétifs et donneront des plantes peu vigoureuses. Celles-ci produiront un grand nombre de tubercules, mais de petit calibre (JOHNSON, 1997).

Stade de formation de tubercules fils (boulage) : stade ultime débutant par l'initiation de tubercules fils sur les germes et suivi d'une période de grossissement qui dure jusqu'à l'épuisement du tubercule mère (ROUSSELLE *et al.*, 1996). Des tubercules de cet âge physiologique sont inutilisables comme semences (JOHNSON, 1997).

Une caractérisation des vitesses de vieillissement au niveau variétal a été publiée par MARTIN & GRAVOUEILLE (2001), se basant sur la sensibilité à l'égermage. Pour chaque variété, des tubercules sont égermés trois fois en cours de stockage avant plantation et comparés à des tubercules non égermés conservés en chambre frigorifique. Les variétés sont notées de 1 (très sensible à l'égermage, vieillissement très rapide) à 9 (très peu sensible à l'égermage, vieillissement très lent) (Figure 7).

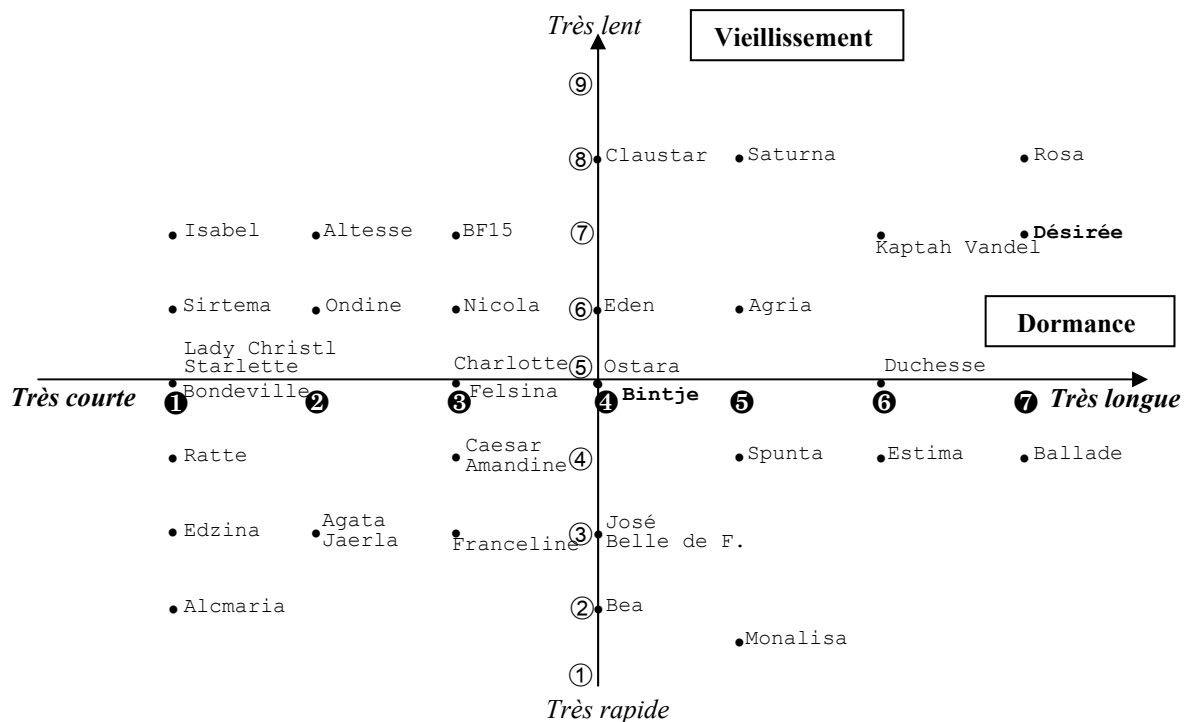


Figure 7. Diagramme précisant les caractéristiques de sensibilité au vieillissement et de dormance des principales variétés cultivées de pomme de terre (adapté de MARTIN & GRAVOUEILLE, 2001).

Au niveau agronomique (Figure 8), l'âge physiologique optimal des tubercules semences dépend de la durée du cycle de production prévu (REUST, 1982).

Des plants issus de tubercules semences physiologiquement âgés ont un taux de croissance initial plus rapide, développent davantage de tiges, tubérisent plus tôt, produisent moins de feuilles et montrent des signes de sénescence plus précocement que ceux issus de tubercules jeunes (VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987). Il semblerait cependant que le vieillissement physiologique affecte principalement l'émergence, ce qui conditionne par exemple la précocité de la tubérisation subséquente (VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987). L'âge physiologique des tubercules semences influence ainsi les performances de la culture qui en découle : taux et pourcentage d'émergence, nombre de tiges par tubercule, date d'initiation de la tubérisation, vigueur de croissance, distribution de la matière sèche et rendement (REUST, 1982 ; CALDIZ *et al.*, 2001).

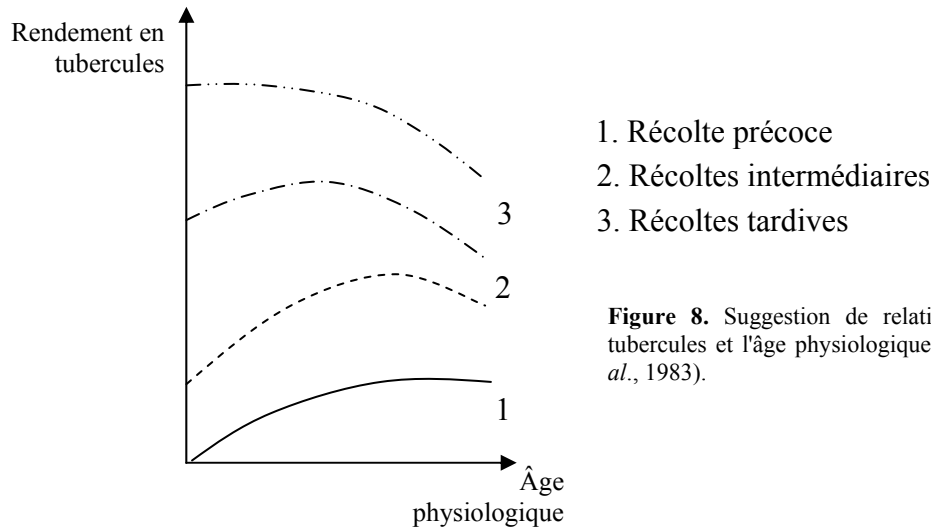


Figure 8. Suggestion de relation entre le rendement en tubercules et l'âge physiologique de la semence (O'BRIEN *et al.*, 1983).

Le vieillissement physiologique provoque finalement le « sucrage de sénescence » résultant de l'accumulation de sucres réducteurs dans le tubercule (BURTON, 1989 ; ROUSSELLE *et al.*, 1996). Conceptuellement, cette dénomination est pourtant trompeuse et ne devrait pas être strictement associée à des événements liés à une sénescence avancée telle que définie pour les pétales d'œillet sénescents (HARTMANN, 1992).

Il est à remarquer que la définition du vieillissement se rapproche parfois chez certains auteurs du concept de sénescence, principalement dans les domaines liés à la physiologie du vieillissement humain. Au niveau végétal, ces concepts sont cependant distincts.

2.3.6 Sénescence

Le vieillissement et la sénescence des végétaux désignent l'ensemble des changements métaboliques dont la conséquence à brève ou à longue échéance sera la mort de l'ensemble ou d'une partie de l'organisme (HARTMANN, 1992). La distinction entre ces deux notions intervient au niveau de la cause première de ces changements. L'usure progressive et passive d'un système vivant, principalement à la suite des attaques du milieu extérieur, relève du vieillissement alors que la sénescence implique des changements qualitatifs qui trouvent leur origine au niveau du génome. Elle est définie comme la dernière phase du développement végétal où s'initient des séries d'événements de plus en plus irréversibles qui conduisent à la dégénérescence cellulaire et parfois à une PCD pouvant être réversible à l'échelle d'un organe (HARTMANN, 1992 ; GAN & AMASINO, 1997, THOMAS, 2002 ; DERTINGER *et al.*, 2003 ; YOSHIDA, 2003 ; JONES & SMIRNOFF, 2005, ZENTGRAF, 2007). Ce programme dépendant du patrimoine génétique de l'individu peut également être régulé par

des facteurs internes (par exemple, le développement reproductif, l'âge physiologique ou les niveaux de phytohormones) ou environnementaux tels que des infections par des pathogènes, des blessures ou encore l'ombrage dans le cas d'une feuille (HARTMANN, 1992 ; GAN & AMASINO, 1997 ; ZENTGRAF, 2007). Chez les plantes, en plus de ces caractéristiques, la sénescence implique plusieurs processus de mobilisation et de recyclage des biomolécules (SPITELLER, 2003 ; BECK & SCHEIBE, 2003, THOMAS *et al.*, 2003).

2.3.7 *Dormance*

La dormance désigne le repos végétatif des tubercules. On distingue l'endodormance, la paradormance et l'écodormance (LANG *et al.*, 1987).

Endodormance : période pendant laquelle aucune germination n'a lieu sur les tubercules, même conservés dans des conditions idéales de germination (REUST, 1982). L'endodormance est régulée par des facteurs physiologiques internes au méristème (LANG *et al.*, 1987). Elle débute dès l'initiation du tubercule sur la plante mère.

Paradormance : la paradormance est régulée par des facteurs physiologiques extérieurs à la structure concernée (LANG *et al.*, 1987). L'inhibition de la germination des germes proximaux par le germe apical en est une illustration.

Écodormance : l'écodormance peut être maintenue par des conditions environnementales (LANG *et al.*, 1987). Des températures basses (4 °C) peuvent par exemple prolonger la dormance des tubercules (REUST, 1986).

On considère qu'un lot de tubercules est non dormant (germé) lorsque 80 % des tubercules le composant montrent un ou plusieurs germes supérieurs à 1-3 mm (REUST, 1982), 2 mm (FAUCONNIER *et al.*, 2002), 3 mm (O'BRIEN *et al.*, 1983) ou 5 mm (REUST, 1986 ; CALDIZ *et al.*, 2001). Cette mesure peut encore être affinée en utilisant la moyenne des dates de germination des tubercules individuels (CALDIZ *et al.*, 2001).

La dormance des tubercules de petit calibre (35 mm) est plus longue que celle des tubercules de plus grand calibre (50 mm) (REUST, 1982).

Selon EMILSSON (1949), les viroses ne semblent pas affecter la dormance des tubercules ; elles augmentent seulement la variabilité de la mesure de la période d'incubation (*Cf.* 2.2.7. Période d'incubation) pour les tubercules contaminés.

2.3.8 *Période d'incubation*

La période d'incubation désigne le temps s'écoulant entre le début de la germination du tubercule (éventuellement égermé si des germes étaient déjà présents) et la formation de tubercules fils sur les nouvelles pousses durant un stockage à l'obscurité à 15-20 °C et 90-95 pourcents d'humidité relative (REUST, 1982 ; HARTMANS & VAN LOON, 1987 ; CALDIZ *et al.*, 2001), une température de 25°C étant moins favorable (REUST, 1982). Cette mesure n'est pas d'application pour les tubercules dits épuisés, incapables de régénérer une plante.

D'un point de vue pratique, la période d'incubation a été évaluée sur des lots de 48 tubercules (dégermés si les germes étaient présents) enterrés (sommet affleurant) dans de la perlite humide et maintenus à l'obscurité à 17,5-18,5 °C et 85-90 % de HR (HARTMANS & VAN LOON, 1987). Afin d'éviter les nécroses subapicales des germes, ces derniers peuvent être humectés tous les deux jours avec une solution aqueuse de CaSO₄ 0,01 M (DYSON & DIGBY, 1975).

Selon CLAVER (1973), la période d'incubation prend fin lorsque les bourgeons des germes ou les stolons forment de petits tubercules d'environ 3 mm de diamètre. REUST

(1986) considère, quant à lui, que la période d'incubation prend fin lorsqu'un renflement tubéreux atteint le double du diamètre du stolon qui le porte sur 80 % des tiges principales ou, en cas d'absence de stolon, lorsque des renflements tubéreux sessiles atteignent 2 mm de diamètre pour 90 % des tubercules.

La durée de la période d'incubation est fonction de la variété, de l'éclairage et de la température, mais est indépendante de l'année de production (HARTMANS & VAN LOON, 1987). De hautes températures subies durant la période de croissance avancent l'âge physiologique et réduisent de ce fait la durée de la période d'incubation (CALDIZ *et al.*, 2001).

2.3.9 *Vigueur de croissance*

La vigueur de croissance d'un tubercule semence est définie comme étant le potentiel du tubercule à produire des germes et des fanes dans des conditions favorables à la croissance (VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987).

2.3.10 *Capacité germinative*

La capacité germinative désigne le poids des germes produits après une incubation de 4 semaines à 20°C (KRIJTHE, 1962) ou 18°C à l'obscurité (HARTMANS & VAN LOON, 1987). Elle peut être exprimée en pourcentage du poids frais initial (KRIJTHE, 1962) ou par tubercule d'un lot de 40 unités (HARTMANS & VAN LOON, 1987). Cette dernière variante permet d'éviter le biais lié aux pertes de poids à haute température de stockage, mais nécessite des tubercules de calibre homogène.

2.4 Méthodes d'évaluation de l'âge physiologique des tubercules

2.4.1 *Généralités*

En raison de son importance agronomique, de nombreuses tentatives ont été réalisées afin de développer un indicateur de l'âge physiologique de tubercules semences. On distingue ainsi trois grandes classes d'indicateurs (CALDIZ *et al.*, 2001) :

Les **indicateurs biophysiques** incluent l'accumulation de degrés-jours depuis la levée de dormance (O'BRIEN *et al.*, 1983), la somme de températures de stockage (SCHOLTE, 1987, notion décrite par STRUIK & WIERSEMA, 1999) et les indices de vigueur de croissance relative (BODLAENDER *et al.*, 1987 ; VAN ITTERSUM, 1992).

Des **indicateurs physiologiques** tels que le type de germe (KRIJTHE, 1958), la capacité germinative (KRIJTHE, 1962), la longueur du plus grand germe (O'BRIEN & ALLEN, 1981) et la longueur de la période d'incubation (REUST & MUNSTER, 1975 ; CALDIZ, 1991) ont été utilisés afin d'établir l'âge physiologique.

Des **indicateurs biochimiques** notamment basés sur le contenu en sucres du tubercule ou des germes (VAN ES & HARTMANS, 1984), l'activité enzymatique (VAN ES & HARTMANS, 1987 ; CALDIZ *et al.*, 1996), le contenu en acides organiques (REUST & AERNY, 1985), en polyamines (APELBAUM, 1984), en ATP, ADP et phosphates liés (BIOTTO & SIEGENTHALER, 1991) ou le contenu en électrolytes (DE WEERD *et al.*, 1995) ont également été développés.

Un indicateur d'âge physiologique idéal doit être (a) facile à mesurer, objectif, reproductible et fiable ; (b) capable de prendre en compte l'environnement, le cultivar et leur interaction ; (c) sensible au traitement des tubercules semences ; (d) discriminant en fonction

du lot, de son origine et de son histoire de stockage ; (e) compatible avec la notion d'âge chronologique en intégrant la variable « durée de stockage » dans l'évolution de l'âge (CALDIZ *et al.*, 2001).

L'évaluation des différents indicateurs décrits dans les paragraphes suivants sera réalisée au chapitre 2 : Options méthodologiques et objectifs poursuivis. Il est cependant très délicat – voire impossible – d'évaluer chaque indicateur sur base de l'ensemble des critères précités car cela suppose de disposer des données initiales complètes ayant servi de base à chacune des publications. Cette comparaison détaillée n'a toujours pas été réalisée dans les revues de littératures les plus récentes (COLEMAN, 2000).

2.4.2 Indicateurs biophysiques

Différentes techniques basées sur la température ont été mises au point, mais aucune ne rencontre entièrement les objectifs poursuivis.

- **Rapport de vigueur de croissance précoce**

VAN ITTERSUM, SCHOLTE & KUPERS (1990) ont proposé d'utiliser le rapport de vigueur de croissance précoce de tubercules issus de deux (ou plusieurs) températures de stockage afin de mesurer le taux de vieillissement physiologique. Ils ont cependant rencontré un manque de transposabilité de leurs résultats de laboratoire en conditions de plein champ ainsi qu'une variabilité interannuelle importante.

- **Index plastochrone ou phyllochrone**

L'utilisation de ces deux index est également envisageable. L'index phyllochrone consiste à mesurer le taux d'apparence des feuilles supérieures à 10 mm et est exprimé en Kelvin*jour en considérant une température de base de 0°C. Les résultats obtenus par FIRMAN, O'BRIEN & ALLEN (1995) sur les variétés cultivées (cv. : *cultivated variety*) Vanessa, Désirée et Cara se sont cependant révélés contradictoires pour au moins deux des quatre dates de plantation examinées.

- **Vigueur de croissance relative**

VAN DER ZAAG & VAN LOON (1987) ont établi des courbes de vigueur de croissance relative en fonction de la durée de stockage (Figure 9) et ont ainsi mis en évidence des corrélations linéaires avant et après la période de maximum de croissance.

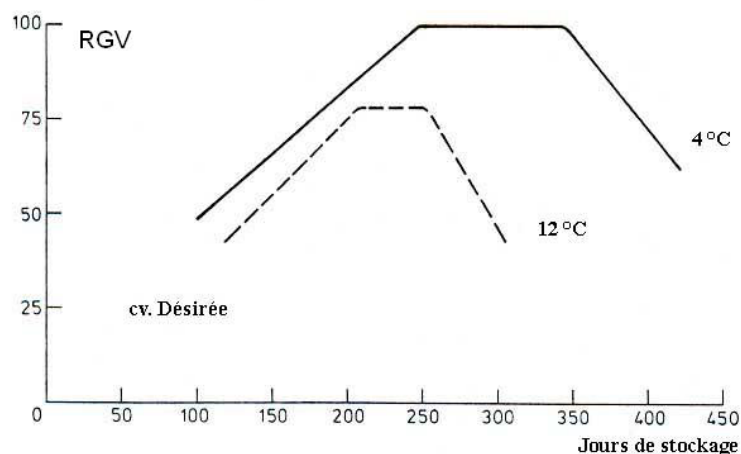


Figure 9. Relation évaluée entre l'âge chronologique du tubercule plant et sa vigueur de croissance relative pour le cv. Désirée stocké à 4 et 12 °C (VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987).

- **Echelles thermiques**

Au Royaume-Uni, une échelle thermique pour le vieillissement a été développée afin de mettre en relation le rendement des tubercules et leur « histoire thermique ». Les études initiales ont permis de mettre en évidence une corrélation positive entre, d'une part, la croissance des pousses et le rendement en tubercules et, d'autre part, le nombre de degrés-jours au-dessus d'une température basale de 4 °C accumulés après la fin de la dormance (WURR, 1978 ; O'BRIEN *et al.*, 1983). O'BRIEN & ALLEN (1978) et REUST (1982) ont utilisé quant à eux une température seuil de 0 °C.

On trouve cependant plusieurs arguments en défaveur de ces échelles thermiques au-dessus de 4 °C :

- O'BRIEN & ALLEN (1981) mettent en doute le vieillissement du tubercule à des températures trop basses pour la germination, ce qui contredit les données obtenues par KRIJTJE (1962),
- KRIJTJE (1962) n'a pas observé de différence dans les profils de germination suivis par des tubercules stockés à 2 et 5 °C,
- WURR (1979) et STRUIK *et al.* (2006) ont montré qu'un même nombre de degrés-jours accumulés peut correspondre à des âges physiologiques différents selon que la température de stockage est stable ou variable,
- les essais visant à mettre en relation la vigueur du tubercule (le poids sec des pousses, par exemple) et les températures accumulées durant le stockage se sont révélés infructueux (SCHOLTE, 1987).

2.4.3 Indicateurs physiologiques

Comme nous l'avons vu, le profil de germination suivi par un tubercule est fonction de son âge physiologique. Certains auteurs ont tenté de caractériser ces « réponses de germination » afin d'évaluer l'âge physiologique des tubercules.

- **Capacité germinative**

Les mesures de capacité germinative (en pourcentage du poids frais initial) effectuées par KRIJTJE (1962) sur des tubercules stockés à 2 °C se sont révélées très variables, peu quantitatives et dépendantes du lot et de la saison de culture.

HARTMANS & VAN LOON (1987) ont également mesuré la capacité germinative (par tubercule) de tubercules des variétés Jaerla et Désirée préalablement stockés à l'obscurité à 4 et 12 °C. Cette variable mesure la vitesse de production de matériel végétal influencée par l'année de récolte, la température de stockage et la durée de ce dernier. Elle atteint son maximum après minimum 300 jours (10 mois) de stockage à 4 °C pour la variété Désirée (Figure 10). Cette mesure est très nettement corrélée ($R = 0,87$) – et donc interchangeable – avec la longueur du plus grand germe par tubercule, mais est cependant plus adéquate en cas de ramification ou de nécrose apicale des germes.

Il est possible d'intégrer cette capacité de production au fil du temps et de dresser ainsi des courbes cumulatives de forme sigmoïdale (COLEMAN, 2000).

Différentes améliorations à apporter à la définition de la capacité germinative ont été proposées par COLEMAN (2000) : température de 15 °C, lots de masse homogène, utilisation du nombre de germes ou de la longueur du plus grand germe après 2 à 3 semaines au lieu du poids frais de germes après 4 semaines. Les lots stockés à 4 °C montreront cependant encore des variations annuelles liées à la maturité de la culture et à ses effets sur le statut métabolique des tubercules fils (COLEMAN, 2000).

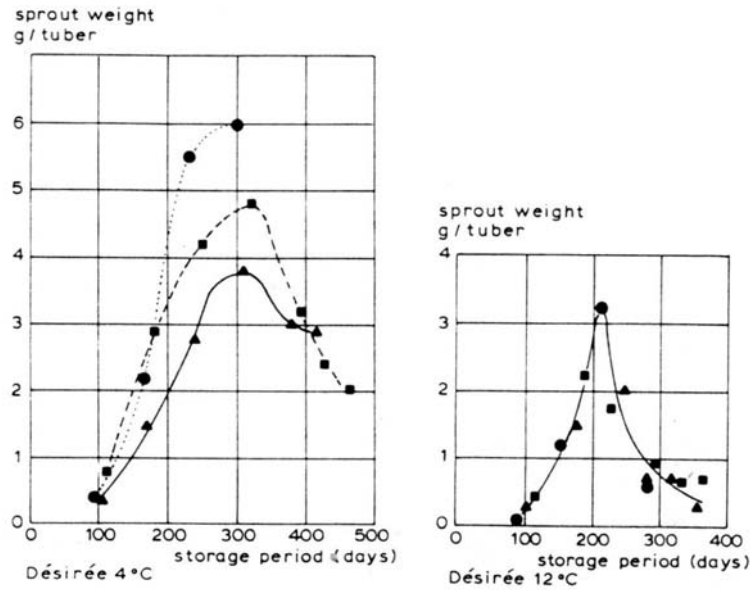


Figure 10. Influence de la durée de conservation à 4 et 12 °C sur la capacité germinative exprimée en g de poids frais par tubercule égermé mis en germination à 18 °C pendant 4 semaines (HARTMANS & VAN LOON, 1987).

Il est intéressant de noter que la capacité germinative et la période d'incubation peuvent décrire des réponses spécifiques aux cultivars, mais indépendantes de l'année de production, si l'on stocke les tubercules à 12 °C (COLEMAN, 2000).

- **Période d'incubation et Index d'âge physiologique**

La période d'incubation décroît de façon linéaire ($R=-0,99$) avec le temps de stockage (HARTMANS & VAN LOON, 1987). Pour le cv. Désirée, une vigueur maximale de croissance des germes est obtenue lorsque sa valeur se situe entre 85 et 55 jours (VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987).

Un index d'âge physiologique (PAI : *Physiological Age Index*) basé sur la période d'incubation peut être défini afin de permettre des comparaisons inter-variétés (COLEMAN, 2000 ; CALDIZ *et al.*, 2001) :

$$PAI = \frac{(T - T_0)}{(T_1 - T_0)}$$

où T est la date de détermination de l'âge physiologique, T_0 est la date de défanage (voire la date de fin de dormance, afin de réduire la variabilité annuelle) et T_1 est la date de fin de période d'incubation (boulage) à une température donnée (COLEMAN, 2000).

La valeur de ce PAI se situe entre 0 et 1 selon que les tubercules sont respectivement physiologiquement jeunes ou vieux. Cet index s'est révélé utile pour mesurer les différences dues aux conditions de croissance, au cultivar, à la date de défanage, à l'origine des tubercules, au système de stockage et aux systèmes de préplantation (CALDIZ *et al.*, 2001). Ce PAI est par ailleurs corrélé avec la durée de couverture du sol et le rendement de la culture future. Il est facile à mesurer, non invasif, reproductible et fiable (CALDIZ *et al.*, 2001). Il nécessite cependant d'attendre la fin de la période d'incubation pour déterminer l'âge physiologique (valeur prédictive faible).

2.4.4 Indicateurs biochimiques et moléculaires

- **Protéines**

Durant le vieillissement des tubercules (de 3 à 30 mois de stockage à 4 °C), une diminution de leur contenu en protéines solubles (majoritairement représentées par la patatine de 40 KDa) a été observée (KUMAR & KNOWLES, 1993a).

Cette modification du contenu en protéines solubles résulte d'une diminution de la capacité de synthèse protéique (KUMAR & KNOWLES, 1993a) ainsi que d'une protéolyse accrue liée (1) à une augmentation de la concentration en protéases de 84, 95 et 125 KDa, (2) à une diminution de la concentration en multicystatine (PMC : *Potato MultiCystatin*, un inhibiteur des protéases à cystéine) et (3) à des modifications non enzymatiques (oxydation accrue, glycation, désamination) des protéines, les rendant plus sensibles à la dégradation (KUMAR *et al.*, 1999).

La diminution de capacité de synthèse de protéines aurait des conséquences sur la disponibilité de certaines enzymes impliquées dans la germination et pourrait ainsi expliquer la perte de potentiel de croissance qui intervient au cours du vieillissement (KUMAR & KNOWLES, 1993a).

Historiquement, plusieurs approches globales basées sur l'électrophorèse bidimensionnelle ont été développées afin d'étudier l'évolution du protéome de tubercules de pomme de terre en stockage.

Les premières recherches menées sur ce sujet n'ont cependant pas permis d'identifier les protéines différenciellement exprimées au cours de la transition puits – source (BORGMANN *et al.*, 1994), de la levée de dormance (DESIRE *et al.*, 1995) ou du stockage à basse température (ESPEN *et al.*, 1999). DESIRE *et al.* (1995) ont ainsi utilisé un système de microtubercules synchrones stockés à 4 °C pendant 25 semaines. L'analyse des profils protéiques a montré des différences entre prélèvements, tant qualitatives que quantitatives, se traduisant par (1) une diminution de concentration pour un grand nombre de polypeptides, (2) une augmentation de concentration pour certaines protéines, (3) la disparition ou l'apparition de quelques polypeptides durant certaines étapes spécifiques du stockage. Une approche similaire a été suivie par ESPEN *et al.* (1999) afin de caractériser les profils protéiques de tubercules immatures, matures et stockés pendant maximum 113 jours à 3 °C. Cette technique est une version plus moderne que celle de DESIRE *et al.* (1995) car elle utilise des gradients de pH immobilisés (IPG : *Immobilized pH Gradients*) lors de la première dimension. Certains des changements observés dans les profils protéiques semblent influencés par la température de stockage et résulteraient d'une acclimatation au froid. Ici encore, aucune identification de protéines n'a été effectuée.

Plus récemment, LEHESRANTA *et al.* (2006) ont réalisé une analyse protéomique du cycle de vie du tubercule de pomme de terre en utilisant une approche technique plus moderne couplée à une identification protéique par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Leurs résultats indiquent que le processus de développement du tubercule est caractérisé par l'accumulation d'isoformes de patatine et d'enzymes impliquées dans les réactions de défense contre les pathogènes et les ravageurs. Les enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et dans la transformation protéique sont également associées au développement, mais voient leur concentration diminuer en cours de maturation. Bien que fondamentalement très intéressante, cette étude ne considère cependant que des périodes de stockage de 4 semaines à 5°C sans caractérisation physiologique poussée du matériel végétal.

- **Polyamines**

Une augmentation de la synthèse d'acides nucléiques et de protéines marque la fin de la dormance des tubercules (APELBAUM, 1984 ; MACDONALD & OSBORNE, 1988). Du fait du rôle essentiel des polyamines dans les synthèses protéiques, une enzyme appartenant à leur voie métabolique (l'ornithine décarboxylase) a été proposée comme indicateur d'âge physiologique (APELBAUM, 1984).

- **Lipides**

Les lipides représentent environ 0,1 % du poids frais d'un tubercule de pomme de terre. Ce dernier ne contenant pas de réserve importante de lipides, on admet que la composition totale en acides gras du tubercule reflète la composition de ses membranes (SPYCHALLA & DESBOROUGH, 1990b).

Les changements membranaires et la perte du contrôle homéostatique sont souvent considérés comme des réponses généralisées au vieillissement. On a donc longtemps supposé que le **taux de perte d'électrolytes** était un indicateur effectif du vieillissement physiologique des tubercules (COLEMAN, 2000). Plusieurs auteurs ont ainsi observé au cours du stockage une décroissance du **pourcentage d'intégrité membranaire** (KNOWLES & KNOWLES, 1989 ; DE WEERD *et al.*, 1995, ZABROUSKOV *et al.*, 2002 ; FAUCONNIER *et al.*, 2002). Cette décroissance est accentuée lorsque les conditions expérimentales permettent la croissance des germes (DE WEERD *et al.*, 1995 ; FAUCONNIER *et al.*, 2002).

D'après COLEMAN (2000), les modifications d'intégrité membranaire liées au vieillissement sont la conséquence des changements subis par le degré de saturation des membranes, l'index de double liaison (DBI : *Double Bond Index*) étant inversement corrélé avec le taux de perte d'électrolytes (KNOWLES & KNOWLES, 1989). Ces résultats ont cependant été infirmés par FAUCONNIER *et al.* (2002), aucune corrélation claire n'ayant pu être établie entre la perte d'intégrité membranaire et la diminution du DBI.

Le mécanisme précis de détérioration des membranes n'est pas encore parfaitement connu. La cause la plus souvent avancée est la peroxydation par les radicaux libres des acides gras insaturés dans la bicouche lipidique (KNOWLES & KNOWLES, 1989 ; KUMAR & KNOWLES, 1993a). D'autres causes sont cependant possibles : la désestérification et l'accumulation d'acides gras libres (FFA : *Free Fatty Acids*) dans la bicouche, la perte de lipides de type diacylglycérol ou la transition des membranes et de leurs composés acyl-lipidiques d'une structure cristalline-liquide normale et flexible vers une structure gel solide (SPYCHALLA & DESBOROUGH, 1990b). LOJKOWSKA & HOLUBOWSKA (1989) ont également émis l'hypothèse que la dégradation des membranes cellulaires est catalysée par des phospholipases endogènes, telles que l'acyl hydrolase lipolytique (LAH : *Lipolytic Acyl Hydrolase*), certains produits de l'activité LAH étant des substrats des enzymes lipoxygénases (LOX) (TURNBULL & COBB, 1992).

En ce qui concerne l'hypothèse oxydative de dégradation des membranes, les contenus en malone-dialdéhyde et en éthane sont souvent présentés comme des indicateurs de peroxydation lipidique, mais ils ne sont que des indicateurs indirects résultant de la métabolisation des produits de ces attaques oxydatives. La concentration en malone-dialdéhyde augmente (KUMAR & KNOWLES, 1993b ; DIPIERRO & DE LEONARDIS, 1997) ou reste stable au cours du vieillissement à 4°C (ZABROUSKOV *et al.*, 2002). FAUCONNIER *et al.* (2002) ont de plus démontré que la concentration en hydroperoxydes (HPO) totaux diminuait au cours du vieillissement des tubercules de pomme de terre. Ces HPO sont des marqueurs directs de peroxydation lipidique : ils peuvent être formés par autooxydation ou par l'action d'enzymes telles que l' α -dioxygénase ou la lipoxygénase (LOX) sur les acides gras polyinsaturés (PUFA : *Polyunsaturated Fatty Acids*).

Les LOX sont également impliquées dans le vieillissement et la sénescence de différents organes végétaux (pour exemples, voir FAUCONNIER *et al.*, 2002). Bien que les LOX soient souvent considérées comme responsables des dommages peroxydatifs subis par les lipides membranaires durant le vieillissement et la sénescence, leur rôle dans le processus de vieillissement du tubercule de pomme de terre demeure peu clair. En effet, au cours du stockage de tubercules de *Solanum tuberosum* L., l'activité décroissante et l'expression génique des LOX ne sont pas corrélées avec l'évolution de la composition en acides gras de la membrane (FAUCONNIER *et al.*, 2002 ; ZABROUSKOV *et al.*, 2002). Il semble donc nécessaire d'identifier le métabolisme impliqué dans la dégradation des membranes au cours du stockage car les LOX ne semblent pas être directement impliquées dans ce processus ; l'origine principale des pertes d'électrolytes n'est pas l'oxydation des acides gras insaturés (FAUCONNIER *et al.*, 2002).

- **Polysaccharides**

HARTMANS & VAN ES (1984) ont étudié l'évolution du contenu en amidon et en sucres des germes au cours du vieillissement. Leurs conclusions suggèrent que le processus de vieillissement diminue l'efficacité d'utilisation des composés hydrocarbonés, sans affecter leur translocation dans le tubercule. Des sucres réducteurs (glucose, fructose) découlant de la dépolymérisation de l'amidon s'accumulent dans les tubercules stockés à basse température (FAUCONNIER *et al.*, 2002). Des tubercules de la variété Désirée en stockage à 20 °C et traités au CIPC ont par ailleurs montré une très nette augmentation de la concentration en saccharose après 120 jours de stockage (FAUCONNIER *et al.*, 2002).

- **Calcium et régulateurs de croissance**

Il semblerait que la vigueur germinative des tubercules dépende de leur capacité à transporter l'ion calcium vers les méristèmes (COLEMAN, 2000). Le calcium est en effet souvent considéré comme un ion antisénescence dont le mode d'action passe par une augmentation de l'intégrité membranaire (KUMAR & KNOWLES, 1993a). LINDBLOM (1966) a suggéré que la dominance apicale observée dans les premiers stades du vieillissement est déterminée par le rapport des concentrations en acide indole acétique (IAA : *Indole Acetic Acid*) et en acide gibbérellique GA₃.

- **Taux respiratoire**

Au cours du vieillissement, les taux respiratoires et la capacité de production et de consommation d'adénosine triphosphate (ATP) augmentent tandis que la vigueur germinative diminue et que la dominance apicale est levée. Cette évolution intervient que les tubercules aient ou non été égermés, mais son rôle physiologique reste encore à élucider (KUMAR & KNOWLES, 1996a).

- **Evolution des systèmes antioxydants**

La théorie des attaques oxydatives est basée sur le concept que des dégâts oxydatifs liés à des radicaux libres s'accumulent au cours du vieillissement (cf. 2.2.3.). Malgré l'augmentation des capacités antioxydantes au cours du processus de vieillissement du tubercule de pomme de terre, cette évolution physiologique s'accompagnerait d'une augmentation des stress oxydatifs résultant d'un déséquilibre dans la balance pro- et anti-oxydants (KUMAR & KNOWLES, 1996b).

De nombreuses études partielles ont déjà été menées sur ces sujets sans faire de lien direct avec une mesure de l'âge physiologique ou en considérant des durées de stockage peu réalistes au niveau agronomique. Par ailleurs, les résultats obtenus semblent parfois contradictoires, mais cela peut être dû aux unités utilisées ainsi qu'aux durées de stockage très disparates (cf. Tableau 17 du Chapitre 6). Une augmentation (1) des activités catalase (CAT) et superoxyde dismutase (SOD) et (2) du contenu en α -tocophérol a ainsi été mesurée

par SPYCHALLA et DESBOROUGH (1990a) au cours d'un stockage de tubercules à basse température (3 et 9°C) durant 40 semaines. KUMAR et KNOWLES (1996b) ont, quant à eux, observé une activité accrue du système d'élimination des radicaux libres impliquant le glutathion dans des tubercules âgés après un stockage de 30 mois à 4°C. Une augmentation au cours du stockage à basse température des activités glutathion réductase (GR), peroxydase (POX), ascorbate peroxydase (APX) et monodéhydroascorbate réductase a également été publiée par ZABROUSKOV *et al.* (2002). Finalement, BURTON (1989), DIPIERRO & DE LEONARDIS (1997) et MIZUNO *et al.* (1997) ont mis en évidence une décroissance rapide du pool d'ascorbate.

- **Méthylation de l'ADN**

L'expression génique au cours du vieillissement pourrait être influencée par le degré de méthylation de l'ADN (COLEMAN, 2000 ; SEMSEI, 2000). Les résultats de LAW & SUTTLE (2002) n'ont cependant pas permis de mettre en évidence des changements significatifs de concentration en 5-méthylcytosine à l'échelle du génome de cellules méristématiques du tubercule. Une déméthylation transitoire des résidus cytosine des séquences 5'-CCGG-3' a été détectée, mais elle est indépendante de l'âge du tubercule et serait plutôt impliquée dans l'évolution de la dormance.

- **Expression génique (*partim* transcriptomique)**

Une approche cDNA-AFLP (*complementary DesoxyriboNucleicAcid - Amplified Fragment Length Polymorphism*) a été développée afin d'étudier l'évolution du transcriptome de microtubercules de pomme de terre au cours de leur cycle de développement (principalement lors des étapes de tubérisation, de dormance et de germination) (BACHEM *et al.*, 1996 ; BACHEM *et al.*, 2000 ; TRINDADE *et al.*, 2004).

Des banques d'*Expressed Sequence Tag* (EST) construites à partir de stolons, de microtubercules en développement, de tubercules dormants et de germes en croissance ont été comparées par RONNING *et al.* (2003) et FLINN *et al.* (2005). Des études utilisant des puces à ADNc ont finalement été réalisées par KLOOSTERMAN *et al.* (2005) afin d'évaluer l'expression génique au cours du processus de tubérisation. Ces études présentent des perspectives techniques intéressantes, mais n'ont pas ciblé le processus de vieillissement *sensu stricto* lors du stockage post-récolte à basse température. Leurs résultats restent donc à l'heure actuelle d'un intérêt limité pour la problématique qui nous préoccupe.

3 METABOLISME DES FORMES ACTIVES DE L'OXYGÈNE, ROLE SIGNAL ET STRESS OXYDATIF

3.1 Introduction

Chaque organisme vivant peut être considéré comme un système redox résultant d'un équilibre intrinsèque entre systèmes pro- et anti- oxydants (FOYER & NOCTOR, 2003 ; HALLIWELL, 2006). Afin d'évaluer correctement l'hypothèse oxydative du vieillissement des tubercules de pomme de terre, il importe donc de décrire les différents acteurs de cet équilibre redox. L'ensemble de ces systèmes ainsi que leur localisation subcellulaire sont synthétisés dans le Tableau 1.

Les sites majeurs de production des ROS lors de stress abiotiques sont les chloroplastes, les mitochondries et les microcorpuscules (peroxysomes non spécialisés et glyoxysomes). Ces organites se caractérisent par une activité métabolique oxydante importante ou par la présence de flux soutenu d'électrons (VAN BREUSEGEM *et al.*, 2001). Récemment, le rôle signal de la production d'H₂O₂ par les NADPH-oxydases membranaires

a également été mis en évidence lors de stress biotiques et abiotiques ainsi que lors du développement cellulaire (LALOI *et al.*, 2004 ; JONES & SMIRNOFF, 2005).

Mécanisme physiologique	Localisation	ROS primaire (produit ou substrat)
Système pro- oxydant (production des ROS)		
Transport d'électrons lors de la photosynthèse, PSI ou II	Chl	O ₂ ^{•-}
Transport d'électrons lors de la respiration	Mit	O ₂ ^{•-}
Glycolate oxydase	Per	H ₂ O ₂
Chlorophylles excitées	Chl	¹ O ₂
NADPH oxydase (réponse à des stress biotiques et abiotiques)	PM	O ₂ ^{•-}
B-oxydation des acides gras	Per, Gly	H ₂ O ₂
Oxalate oxydase	Apo	H ₂ O ₂
Xanthine oxydase	Per	O ₂ ^{•-}
Peroxydases, Mn ²⁺ et NADH	P	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-}
Amine oxydase	Apo	H ₂ O ₂
Lipoxygénase	Cyt (majoritairement), PM, Chl, Ol	¹ O ₂ , O ₂ ^{•-}
Système anti- oxydant (élimination directe des ROS)		
Superoxyde dismutase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo, Pl	O ₂ ^{•-}
Ascorbate peroxydase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo, Pl	H ₂ O ₂
Catalase	Per, Cyt, Gly	H ₂ O ₂
Glutathion peroxydase	Cyt	H ₂ O ₂ , ROOH
Peroxydases	P, Cyt, Vac	H ₂ O ₂
Thiorédoxines peroxydases	Chl, Cyt, Mit	H ₂ O ₂
Ascorbate	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo, Pl, Vac	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-}
Glutathion	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo, Pl	H ₂ O ₂
α-tocophérol	Membranes	ROOH, ¹ O ₂
Caroténoïdes	Chl, Pl	¹ O ₂
Composés phénoliques	Cyt, Vac, P, Chl, Noy	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂
Polyamines	Cyt, Mit, Pl, Chl, Vac, P	-
Système anti-oxydant (empêchant la formation des ROS)		
Adaptations anatomiques	Structure foliaire, épiderme	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , ¹ O ₂
Métabolismes C ₄ ou CAM	Chl, Cyt, Vac	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂
Mouvement des chloroplastes	Cyt	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , ¹ O ₂
Suppression de la photosynthèse	Chl	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂
Modulations des photosystèmes et de l'antenne	Chl	O ₂ ^{•-} , ¹ O ₂
Oxydases alternatives	Chl, Mit	O ₂ ^{•-}
<i>Abréviations : Apo, apoplasme ; Chl, chloroplaste ; Cyt, cytosol ; Gly, glyoxysome ; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène ; Mit, mitochondrie ; Noy, noyau ; ¹O₂, oxygène singulet ; O₂^{•-}, superoxyde ; Ol, Oléosome ; P, paroi ; Per, peroxydase ; Pl, plastid ; PM, plasmalemma ; PS, photosystème ; ROOH, peroxydes organiques ; ROS, Reactive Oxygen Species ; Vac, vacuole.</i>		

Tableau 1. Localisation, substrats et produits des systèmes pro- et anti- oxydants végétaux (BUCCHANAN *et al.*, 2000 ; ARORA *et al.*, 2002 ; MITTLER, 2002 ; FEUSSNER & WASTERNAK, 2002 ; BLOKHINA *et al.*, 2003 ; KAUR-SAWHNEY *et al.*, 2003 ; FEIERABEND, 2005 ; MITTLER & POULOS, 2005 ; SMIRNOFF, 2005).

3.2 Principales formes actives de l'oxygène (Figure 11)

Traditionnellement, les dérivés partiellement réduits de l'oxygène étaient simplement considérés comme des sous-produits toxiques du métabolisme (ARORA *et al.*, 2002). A l'heure actuelle, ils sont également perçus comme des molécules signal qui contrôlent des processus comme la PCD, les réponses aux stress abiotiques et biotiques, le développement et le signalement systémique (MITTLER, 2002 ; MITTLER *et al.*, 2004 ; GAPPER & DOLAN, 2006 ; GADJEV *et al.*, 2006).

Différents termes sont utilisés dans la littérature pour décrire les radicaux oxygénés et les espèces moléculaires apparentées, mais non radicalaires. Ces molécules hautement réactives dérivées de l'oxygène moléculaire O₂ portent le nom de formes actives de l'oxygène. Un radical libre est une espèce chimique capable d'exister indépendamment, qui contient un ou plusieurs électrons non appariés occupant donc individuellement une orbitale moléculaire (HALLIWELL, 2006). Selon cette définition, l'O₂ moléculaire est un radical libre car il possède deux électrons non appariés de spins parallèles.

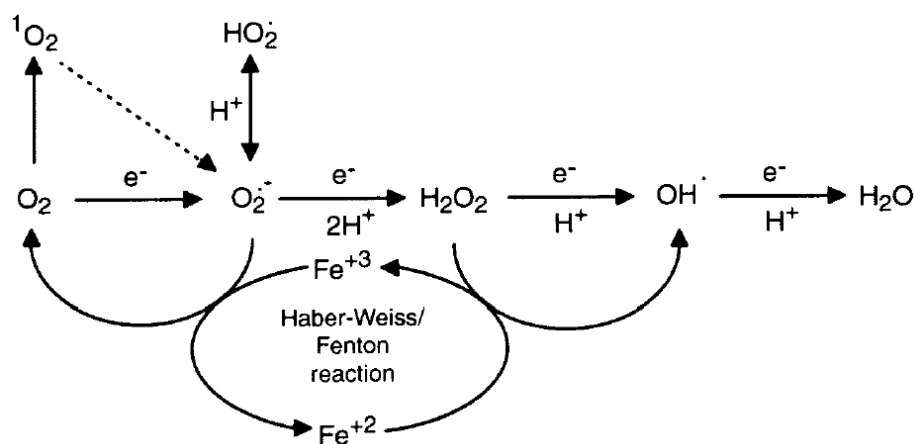


Figure 11. Version simplifiée des réactions utilisant l'oxygène moléculaire pour produire des ROS (VRANOVA *et al.*, 2002).

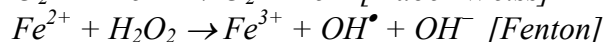
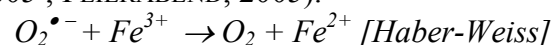
Les oxygènes singlets $^1\text{O}_2$ quant à eux sont des formes plus réactives (demi-vie = 4 μs) d'oxygène qui se caractérisent par une modification des spins des électrons des orbitales antiliantes π^* (les spins deviennent antiparallèles). Ils existent sous deux formes dont une seule se rencontre dans les systèmes biologiques ($^1\Delta_g\text{O}_2$ qui n'est plus un radical libre, HALLIWELL, 2006). L'oxygène singlet est formé par transfert d'énergie au départ de photosensibilisateurs. Il peut réagir avec les acides aminés tels que la cystéine, la méthionine, le tryptophane et l'histidine ; c'est un initiateur majeur de la peroxydation lipidique menant à des dégâts membranaires (SMIRNOFF, 1995). L'oxygène singlet est également un produit de l'activité LOX (ARORA *et al.*, 2002).

Lorsqu'un seul électron est ajouté à la configuration électronique de l' O_2 moléculaire, il se positionne dans une des orbitales π^* et produit l'anion radicalaire superoxyde, $\text{O}_2^{\bullet-}$ (HALLIWELL, 2006). Cette réaction est endothermique (MCKERSIE, 1996). Ces ions superoxydes peuvent être formés par autooxydation de divers constituants de la chaîne transporteuse d'électrons dans la mitochondrie et dans les chloroplastes. Leur formation peut également être catalysée par les membranes microsomiales et a été mise en évidence dans les peroxysomes et les glyoxysomes (SMIRNOFF, 1995 ; DEL RIO *et al.*, 2006). Parmi les sources de $\text{O}_2^{\bullet-}$ existant dans le tubercule de pomme de terre dépourvu de chloroplastes, la chaîne transporteuse d'électrons mitochondriale est certainement la plus importante (Halliwell, 2006). Les sites de production d'ions superoxydes sont localisés au niveau du segment NADH déhydrogénase (complexe I) et dans la région ubiquinone-cytochrome b de la chaîne transporteuse d'électrons mitochondriale (ARORA *et al.*, 2002, BLOKHINA *et al.*, 2003). Les ions superoxydes peuvent agir en tant qu'oxydants (demi-vie : 2 à 4 μs), leur action délétère s'expliquant surtout par la formation d' H_2O_2 et de radicaux hydroxyles OH^\bullet .

Lorsqu'un deuxième électron est ajouté à l'anion superoxyde, il y a formation de l'ion peroxyde O_2^{2-} présent sous forme protonée (H_2O_2 , demi-vie : 1 ms) au niveau biologique. Le peroxyde d'hydrogène est formé grâce aux oxydases qui catalysent le transfert de 2 électrons vers l'oxygène moléculaire ou les dismutases comme la SOD. Il réagit rapidement avec un nombre relativement restreint de molécules (HALLIWELL, 2006).

D'autres réactions impliquant le peroxyde d'hydrogène et le radical superoxyde permettent finalement la formation du radical hydroxyle OH^\bullet (ARORA *et al.*, 2002). Cette ROS est extrêmement réactive et dommageable car elle réagit avec la plupart des biomolécules telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques. L'une des voies majeures de formation de radicaux hydroxyles *in vivo* est la réaction d'Haber-Weiss ou de

Fenton catalysée par des métaux de transition comme le fer (SMIRNOFF, 1995 ; ARORA *et al.*, 2002 ; DESIKAN *et al.*, 2005 ; FEIERABEND, 2005).



3.3 Le système antioxydant végétal (Figure 12)

Le système antioxydant comprend des antioxydants de faible masse moléculaire (ascorbate, glutathion, tocophérols,...), des enzymes régénérant les formes réduites de ces antioxydants et des enzymes interagissant directement avec les ROS (SOD, POX, CAT,...).

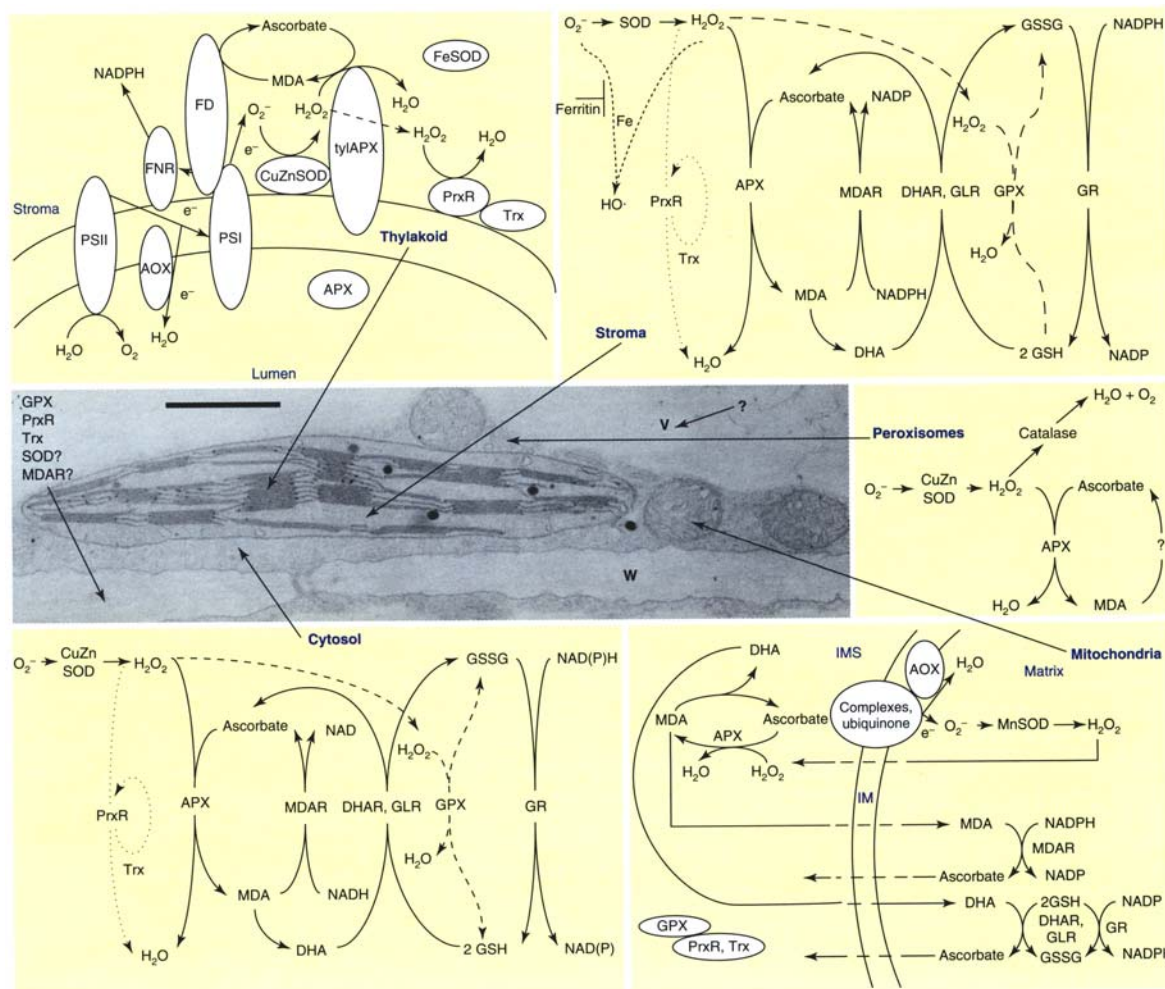


Figure 12. Localisation et acteurs du système antioxydant présents dans les cellules végétales (MITTLER *et al.*, 2004). Abréviations : APX, ascorbate peroxydase ; AsA, ascorbate réduit ; CAT, catalase ; DHA, déhydroascorbate ; DHAR, DHA réductase ; FD, ferrédoxine ; FNR, ferrédoxine NADPH réductase ; GLR, glutarédoxine ; GPX, glutathion peroxydase ; GR, glutathion réductase ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; IM, membrane interne ; IMS, espace intermembranaire ; MDA, monodéhydroascorbate ; MDAR, MDA réductase ; PrxR, peroxyrédoxine ; PSI, photosystème I ; PSII, photosystème II ; SOD, superoxyde dismutase ; Trx, thiorédoxine ; tyl, thylakoïde.

Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques présents dans les cellules végétales possèdent chacun leur propre affinité pour certaines ROS. Ces différents acteurs du système antioxydant n'agissent pas individuellement, mais interagissent activement, notamment dans le cycle ubiquiste d'Halliwell-Asada ou cycle de l'ascorbate-glutathion (BLOKHINA *et al.*, 2003 ; MITTLER & POULOS, 2005). Leur localisation subcellulaire (Tableau 1) conditionne également leur rôle physiologique. A titre d'exemple, le cycle de l'ascorbate-glutathion se retrouve dans de très nombreux compartiments cellulaires (y compris les peroxysomes, DEL RIO *et al.*, 2006). Cette position-clé couplée à la très haute affinité de

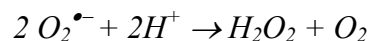
l'APX pour le peroxyde d'hydrogène suggère que ce cycle joue un rôle majeur dans le contrôle des concentrations en ROS de ces compartiments. *A contrario*, l'enzyme CAT est majoritairement présente dans les peroxysomes. Son rôle est cependant capital lorsque les niveaux de ROS produits sont importants (DEL RIO *et al.*, 2006).

3.3.1 Antioxydants enzymatiques majeurs

3.3.1.1 Superoxyde dismutase

Les superoxyde dismutases (SOD) sont des enzymes antioxydantes multimériques à cofacteur métallique. Elles sont traditionnellement réparties en 3 classes selon leur cofacteur métallique et leur localisation subcellulaire principale : les Cu/ZnSOD (sensibles au KCN et à l' H_2O_2) présentes dans le cytosol et le stroma, les MnSOD mitochondriales (résistantes au KCN et à l' H_2O_2) et les FeSOD (résistantes au KCN et sensibles à l' H_2O_2) présentes dans le stroma de certaines espèces végétales. Cette répartition subcellulaire a cependant été remise en question par des études récentes. A l'heure actuelle, on considère que presque toutes ces isozymes se retrouvent dans la plupart des constituants cellulaires susceptibles de subir un stress oxydatif (ARORA *et al.*, 2002 ; BLOKHINA *et al.*, 2003). La présence de SOD dans les peroxysomes a ainsi été mise en évidence chez au moins 9 espèces végétales différentes (DEL RIO *et al.*, 2006).

Les SOD inactivent les ions superoxydes $O_2^{\bullet-}$ en catalysant leur dismutation, un $O_2^{\bullet-}$ étant réduit en H_2O_2 , l'autre étant oxydé en O_2 (SMIRNOFF, 1995 ; HALLIWELL, 2006).



L'activité SOD augmente dans des conditions qui favorisent le stress oxydatif (SMIRNOFF, 1995). La dismutation des anions superoxydes doit néanmoins être couplée à des réactions qui éliminent spécifiquement le H_2O_2 . Du fait de leur localisation subcellulaire (peroxisomes), les catalases ne sont cependant pas les enzymes les plus importantes dans le contexte d'élimination du superoxyde mitochondrial. Ce sont les (ascorbate) peroxydases qui assument ce rôle (HALLIWELL, 2006).

3.3.1.2 Ascorbate peroxydase

Parmi les différentes peroxydases qui inactivent l' H_2O_2 , les ascorbate peroxydases (APX) occupent une place importante (HALLIWELL, 2006). Les APX sont surtout présentes dans les chloroplastes et le cytosol ; elles éliminent le peroxyde d'hydrogène en utilisant l'ascorbate (vitamine C) comme co-substrat et en l'oxydant (HALLIWELL, 2006). En plus du site de liaison pour l'ascorbate, elles possèdent un second site de liaison potentiel pour les composés phénoliques (MITTLER & POULOS, 2005).

Leur activité enzymatique est régulée par la disponibilité en ascorbate et les concentrations en ROS, un environnement cellulaire plus oxydant se traduisant par une surexpression de l'activité APX (SMIRNOFF, 1995 ; MITTLER & POULOS 2005). Certaines isoformes sont en fait régulées quantitativement et d'autres, qualitativement (présence/absence, MITTLER & POULOS, 2005). L'affinité de l'APX pour l' H_2O_2 (μM) suggère que cette enzyme est impliquée dans une régulation fine des ROS, notamment dans un contexte signal (MITTLER, 2002).

3.3.1.3 Catalase

Les catalases végétales sont des enzymes tétramériques constituées de 4 chaînes polypeptidiques qui contiennent chacune un groupement hème. Elles appartiennent à la clade I des catalases à petites sous-unités de 55-60 KDa (FEIERABEND, 2005). Les sous-unités sont

encodées par une petite famille de gènes catalase propres aux plantes. Des sous-unités encodées par des gènes différents peuvent être exprimées au sein d'une même cellule et être associées en hétérotétramères (Figure 13, FEIERABEND, 2005).

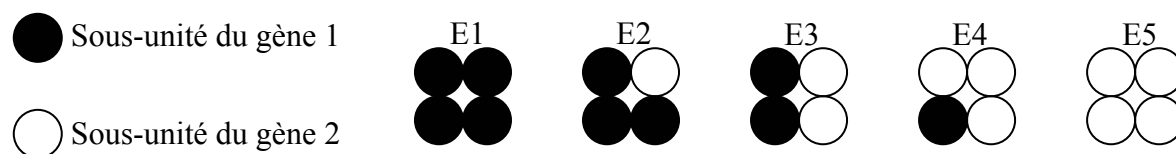
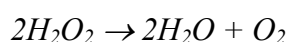


Figure 13. Génération d'hétérotétramères et d'homotétramères au départ de sous-unités CAT provenant de 2 gènes distincts (FEIERABEND, 2005).

Les catalases végétales sont réparties en 3 classes selon leur localisation et leur fonction physiologique. Les catalases de classe 1 se retrouvent dans les tissus photosynthétiques et sont impliquées dans l'élimination de l' H_2O_2 produit lors de la photorespiration. Les catalases de classe 2 sont produites en abondance dans les tissus vasculaires et pourraient jouer un rôle dans la lignification. On les retrouve cependant également dans les tubercules de pomme de terre présentant des tissus vasculaires non lignifiés. Les catalases de classe 3 sont surtout présentes dans les graines et les jeunes plantes ; elles sont impliquées dans l'élimination de l'excès de H_2O_2 produit lors de la dégradation des acides gras au sein du cycle du glyoxylate dans les glyoxisomes (VAN BREUSEGEM *et al.*, 2001 ; FEIERABEND, 2005).

La plupart des catalases se retrouvent principalement dans les peroxyosomes afin d'éliminer le peroxyde d'hydrogène produit par les oxydases agissant sur des substrats tels que l'Acétyl-CoA (lors de la β -oxydation des acides gras), le glycolate (provenant de la photorespiration), l'urate et les acides aminés *D* (HALLIWELL, 2006). Certaines catalases se retrouvent également dans les glyoxisomes, où se déroule la β -oxydation des acides gras génératrice d' H_2O_2 , et dans les organites apparentés. Elles sont inactivées ou inhibées en présence de radicaux superoxydes ou de hautes concentrations en H_2O_2 (FEIERABEND, 2005 ; DEL RIO *et al.*, 2006). Les catalases catalysent la réaction suivante (HALLIWELL, 2006) :



L'activité CAT augmente lors de stress oxydatifs (SMIRNOFF, 1995 ; FEIERABEND, 2005). L'affinité des CAT pour l' H_2O_2 suggère que ces enzymes sont impliquées dans l'élimination des ROS dans un contexte de stress oxydatif (INZE & VAN MONTAGU, 1995 ; MITTLER, 2002 ; FEIERABEND, 2005). La catalase n'est en effet efficace que lorsque la concentration en H_2O_2 est élevée (mM).

3.3.2 Antioxydants non enzymatiques principaux

3.3.2.1 Ascorbate

L'ascorbate est quantitativement l'antioxydant non enzymatique le plus important chez les plantes (BLOKHINA *et al.*, 2003). Il est présent sous sa forme anionique à pH physiologique (POTTERS *et al.*, 2002) et se retrouve dans tous les compartiments cellulaires à une concentration moyenne variant de 2 à 25 mM (SMIRNOFF, 2000 ; ARORA *et al.*, 2002). Le pool d'ascorbate est généralement constitué de plus de 90% d'ascorbate réduit (AsA, BLOKHINA *et al.*, 2003). L'ascorbate et le glutathion peuvent inactiver enzymatiquement ou non enzymatiquement la plupart des ROS, y compris l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les radicaux hydroxyles OH^{\bullet} , peroxydes RO_2^{\bullet} et l'acide peroxyntrique ONOOH (SMIRNOFF, 1995 ; MCKERSIE, 1996 ; HALLIWELL, 2006). L'ascorbate peut agir

comme antioxydant indirect en régénérant la forme réduite de l' α -tocophérol (MCKERSIE, 1996 ; BLOKHINA *et al.*, 2003 ; SMIRNOFF, 2005).

Suite à son oxydation catalysée par l'ascorbate peroxydase, l'ascorbate oxydase ou les dioxygénases, l'AsA est transformé en radical monodéhydroascorbate (MDHA ou MDA). Une oxydation plus poussée peut mener spontanément à la formation de déhydroascorbate (DHA). Il est bon de noter que le MDHA qui n'aurait pas été réduit rapidement en AsA par la MDHA réductase sera converti en AsA et DHA. Ce DHA est instable, particulièrement à haut pH et se saponifie irréversiblement en acide dikétogulonique et en acide 2-(*thréo*-1,2,3-trihydroxypropyl) tartronique après réarrangement. L'oxydation de l'AsA peut donc entraîner sa sortie du cycle de l'ascorbate. *A contrario*, il peut être régénéré au départ de ses formes oxydées par les MDHA et DHA réductases, les glutarédoxines, les glutathion-S-transférases, les protéine disulfides isoméras, les thiorédoxine réductases et les inhibiteurs de trypsine de type Kunitz (SMIRNOFF, 1995 ; ARORA *et al.*, 2002 ; SMIRNOFF, 2005). Ces régénérations consomment du NAD(P)H et du GSH (Figure 14). Le DHA peut finalement être réduit non enzymatiquement par le GSH (SMIRNOFF, 2005).

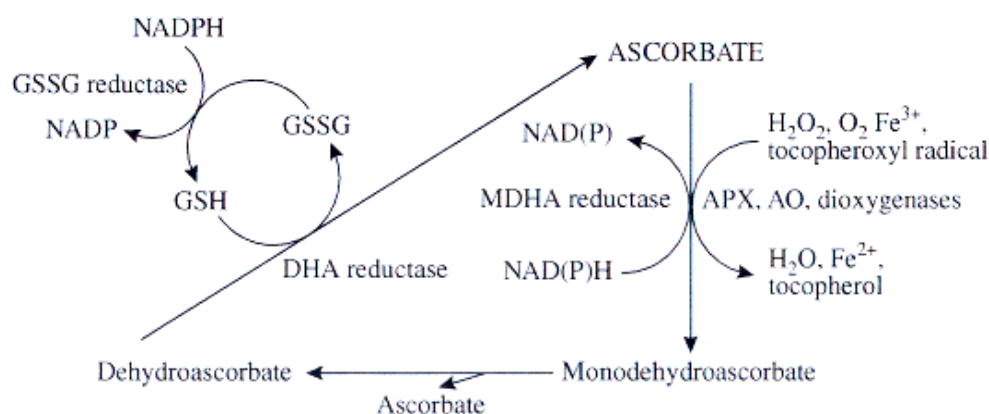


Figure 14. Cycle de l'ascorbate-glutathion ou cycle de Halliwell-Asada permettant l'élimination de l' H_2O_2 tout en recyclant l'AsA et le GSH (SMIRNOFF, 2005).

En cas de stress oxydatif sévère, l'oxydation de l'AsA entraîne une déplétion du contenu en ascorbate total. Cette propriété peut être utilisée comme marqueur indirect de stress oxydatif (SMIRNOFF, 1995). La valeur du rapport forme réduite / forme oxydée de l'ascorbate et du glutathion est également un bon indicateur du degré de stress oxydatif subi par la plante (NOCTOR & FOYER, 1998 ; NOCTOR *et al.*, 1998). L'AsA peut paradoxalement jouer le rôle de prooxydant en réduisant le Fe, le Cu et le Mn. Ces métaux de transition réduits peuvent ensuite participer aux réactions de Fenton (SMIRNOFF, 2005).

3.3.2.2 Glutathion

Le glutathion forme réduite (GSH) est un tripeptide γ -L-glutamyl-cystéinyl-glycine. Dans la plupart des végétaux, il s'agit du composé thiol soluble majeur. Les concentrations en GSH rencontrées dans les feuilles et les racines oscillent entre 0,1 et 1 mM. L'oxydation du groupement thiol du GSH génère la forme oxydée du glutathion, le GSSG dans lequel 2 molécules de GSH sont liées par un pont disulfure. Le pool glutathion contient habituellement 90% de GSH. Le GSSG peut être réduit en GSH par la GSSG réductase. Le GSH intervient dans le recyclage de l'acide ascorbique au départ de sa forme oxydée, le déhydroascorbate (réaction catalysée par la déhydroascorbate réductase, Figure 14). Le GSH est également impliqué dans l'élimination de l' H_2O_2 catalysée par la glutathion peroxydase (GPX, Figure 12).

Des conditions physiologiques oxydantes (augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène, par exemple) diminuent initialement le rapport GSH/GSSG et activent ensuite la synthèse de GSH (INZE & VAN MONTAGU, 1995 ; FOYER *et al.*, 2005). En cas d'accumulation importante de GSSG lors de stress oxydatifs sévères, le cycle cellulaire est stoppé et la synthèse protéique est inhibée (SMIRNOFF, 1995 ; FOYER *et al.*, 2005). Une déplétion du pool de glutathion en GSH provoque également un arrêt du cycle cellulaire (FOYER *et al.*, 2005).

3.3.2.3 Caroténoïdes

Les caroténoïdes constituent une large famille de composés lipophiles (isoprénoïdes en C₄₀ et tétraterpènes) qui contient plus de 600 molécules différentes (MCKERSIE, 1996). Dans le tubercule de pomme de terre, la néoxanthine, la violaxanthine, la zéaxanthine, la lutéine et le β -carotène sont les caroténoïdes principaux, mais leur concentration individuelle peut varier selon la variété et les conditions de stockage (MORRIS *et al.*, 2004). Ces composés sont responsables de la couleur jaune-orange de l'épiderme de la chair des tubercules de pomme de terre (MORRIS *et al.*, 2004).

Les caroténoïdes sont des antioxydants importants qui limitent les concentrations en radicaux libres dans les membranes végétales (HOWITT & POGSON, 2006). Ils assurent généralement la protection cellulaire contre l'oxygène singulet (MITTLER *et al.*, 2004) car ils peuvent inactiver les triplets chlorophylliens et l'¹O₂ (SMIRNOFF, 2005 ; HALLIWELL, 2006). Ils réagissent également directement avec les anions superoxydes et les autres radicaux libres (SMIRNOFF, 2005). Ils peuvent de surcroît protéger les membranes de la peroxydation lipidique et limiter ainsi le vieillissement de graines en réagissant avec les radicaux lipidiques peroxydes (HOWITT & POGSON, 2006). Cette protection membranaire s'opère en interaction avec les tocophérols et l'ascorbate (Figure 15). Les caroténoïdes et les tocophérols peuvent réagir avec les radicaux lipidiques peroxydes ROO[•]. Le radical tocophéryle est régénéré par l'AsA qui est converti en MDHA. Ce dernier est reconverti en AsA par la MDHAR. Le radical caroténoïde (CAR^{•+}) peut être reconverti en caroténoïde par les tocophérols ou l'ascorbate (SMIRNOFF, 2005).

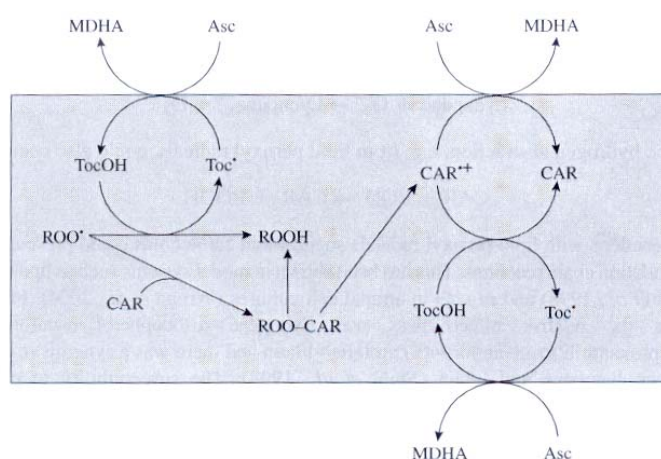


Figure 15. Proposition d'interaction entre les tocophérols, les caroténoïdes et l'ascorbate dans l'élimination des radicaux lipidiques peroxyde membranaires (SMIRNOFF, 2005).

3.3.2.4 Polyphénols et α -tocophérol

Les polyphénols (flavonoïdes, tannins, esters hydroxycinnamiques et lignine) sont des métabolites secondaires présents sous forme libre ou liée aux parois des tissus végétaux (NARA *et al.*, 2006). Ils dérivent tous d'un intermédiaire commun, la phénylalanine ou de son précurseur, l'acide shikimique (ARTS *et al.*, 2005). Au niveau tissulaire, plus de 50 % des

polyphénols sont localisés dans l'épiderme du tubercule de pomme de terre (FRIEDMAN, 1997). Dans ce tissu, le polyphénol libre majoritaire est l'acide chlorogénique qui représente plus de 90 % (17 mg / 100 g de tubercules) des composés phénoliques totaux (FRIEDMAN, 1997 ; LEWIS *et al.*, 1998). L'acide ferrulique est quant à lui le polyphénol lié le plus abondant (NARA *et al.*, 2006).

Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour inactiver les ROS et sont impliqués dans les cascades d'élimination du peroxyde d'hydrogène par couplage redox avec l'ascorbate et la MDHAR (Figure 16A, TAKAHAMA & ONIKI, 1997). Leur activité antioxydante *in vitro* est à ce titre plus importante que celle des tocophérols ou de l'ascorbate (BLOKHINA *et al.*, 2003). Leurs propriétés antioxydantes principales découlent (1) de leur grande réactivité en tant que donneurs d'hydrogène ou d'électron pour les peroxydases notamment (GRACE, 2005), (2) de la capacité du radical dérivé d'un polyphénol à stabiliser et délocaliser l'électron non apparié et (3) de leur capacité à chélater les métaux de transition, terminant ainsi les réactions de Fenton (BLOKHINA *et al.*, 2003). Les capacités antioxydantes des polyphénols observées *in vitro* ne sont cependant pas transposables directement *in vivo*. Du fait de leur localisation subcellulaire, il semblerait que les polyphénols inactivent l'H₂O₂ en présence de peroxydases lors de stress oxydatifs sévères entraînant une diffusion de cette ROS depuis les organites de production (GRACE, 2005). Notons également que les voies de biosynthèse des polyphénols sont généralement activées en cas de stress environnemental (GRACE, 2005).

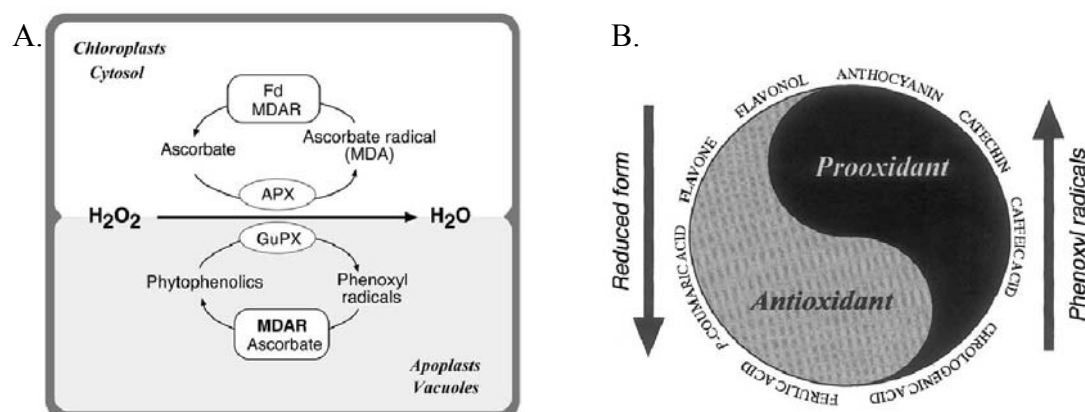
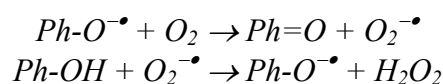
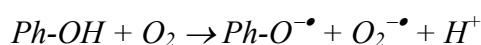


Figure 16. A. Cycle des polyphénols et couplage redox avec l'AsA. B. Fonction prooxydante des composés phénoliques oxydés (SAKIHAMA *et al.*, 2002).

Les composés phénoliques peuvent *a contrario* se comporter comme prooxydants (Figure 16B) en présence de métaux de transition tels que l'Al, le Cu, le Ca, le Mg et le Cd lorsque des radicaux phénoxyles sont produits au cours de réactions antioxydantes (SAKIHAMA *et al.*, 2002). Les réactions prooxydantes des composés phénoliques et des radicaux phénoxyles Ph-O[•] génèrent des anions superoxydes pouvant être convertis en H₂O₂ et OH[•] (GRACE, 2005) :



ou



L' α -tocophérol ou vitamine E est un polyphénol antioxydant lipophile important, principalement dans les membranes des systèmes photosynthétiques. Son activité

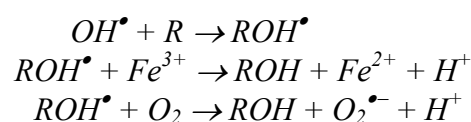
antioxydante est supérieure à celle des β -, γ -, et δ - tocophérols (BLOKHINA *et al.*, 2003). Au vu de sa localisation sub-cellulaire, il prévient l'oxydation lipidique en inactivant l'oxygène singulet, les radicaux superoxyde et hydroxyle ainsi que les radicaux lipidiques (SMIRNOFF, 1995 ; SMIRNOFF, 2005). Il répare les radicaux oxydés et prévient ainsi les réactions en chaîne (BLOKHINA *et al.*, 2003). En plus de ses propriétés antioxydantes, l' α -tocophérol modifie la fluidité et la perméabilité ionique des membranes (BLOKHINA *et al.*, 2003). Il peut également stabiliser la structure membranaire en interagissant avec les acides gras polyinsaturés (PUFA, SMIRNOFF, 2005).

3.4 Impacts des ROS sur les lipides et les protéines

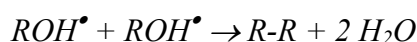
Etant donné l'extrême réactivité des ROS au niveau biologique, il est souvent préférable de rechercher les conséquences physiologiques des attaques oxydatives (*e. g.* activation des systèmes antioxydants, accumulation de dégâts oxydatifs) plutôt que de chercher à doser incorrectement les ROS impliquées (SMIRNOFF, 1995 ; MCKERSIE, 1996, VELJOVIC-JOVANOVIC *et al.*, 2002 ; RHOADS *et al.*, 2006 ; SHULAEV & OLIVER, 2006).

Deux réactions distinctes peuvent intervenir lors de l'oxydation des composés organiques par les ROS : une addition d'une fonction OH ou une soustraction d'un atome d'hydrogène.

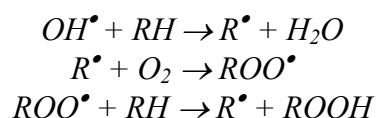
Dans la réaction d'**addition**, un radical hydroxyle réagit avec un substrat organique et forme un produit radicalaire hydroxylé qui est ensuite oxydé en un produit stable par des ions ferriques, l'oxygène ou d'autres agents.



Les produits radicalaires hydroxylés ROH^\bullet peuvent aussi se dismuter et former des produits polymérisés :



Dans la réaction de **soustraction**, les radicaux hydroxyles oxydent un substrat organique en formant de l'eau et un radical organique. Ce dernier produit peut réagir avec l'oxygène moléculaire et former un radical peroxyde pouvant soustraire un second hydrogène à un substrat organique. Cette seconde soustraction s'accompagne de la formation d'un nouveau radical organique qui entretient ainsi une réaction en chaîne (MCKERSIE, 1996 ; ARORA *et al.*, 2002)



3.4.1 Dégâts oxydatifs sur les lipides

La bicouche lipidique membranaire se compose d'un mélange de phospholipides et de glycolipides estérifiés au glycérol sur les atomes de carbones 1 et 2. Les réactions de peroxydation de ces acides gras polyinsaturés diffèrent selon le nombre et la position des doubles liaisons sur les chaînes acyles.

De manière générale, la peroxydation lipidique est un processus destructif et informationnel (BLOKHINA *et al.*, 2003) qui implique 3 étapes distinctes : l'initiation, la propagation et la terminaison. L'**initiation** de la réaction entre un acide gras insaturé (*e.g.* le linoléate) et un radical hydroxyle implique la soustraction d'un atome d'hydrogène du groupe

méthylvinylique sur l'acide gras. Le radical carboné R^\bullet qui en résulte forme une structure en résonance partageant l'électron non apparié entre les carbones 9 à 13. Dans la réaction de **propagation**, cette structure résonante réagit avec l'oxygène moléculaire et forme un radical peroxy ROO^\bullet (sur le carbone 9 ou 13 pour le linoléate). Ce radical peroxy soustrait un hydrogène d'un second acide gras, formant ainsi un hydroperoxyde lipidique $ROOH$ et générant un nouveau radical libre R^\bullet capable d'entretenir la réaction en chaîne (Figure 17).

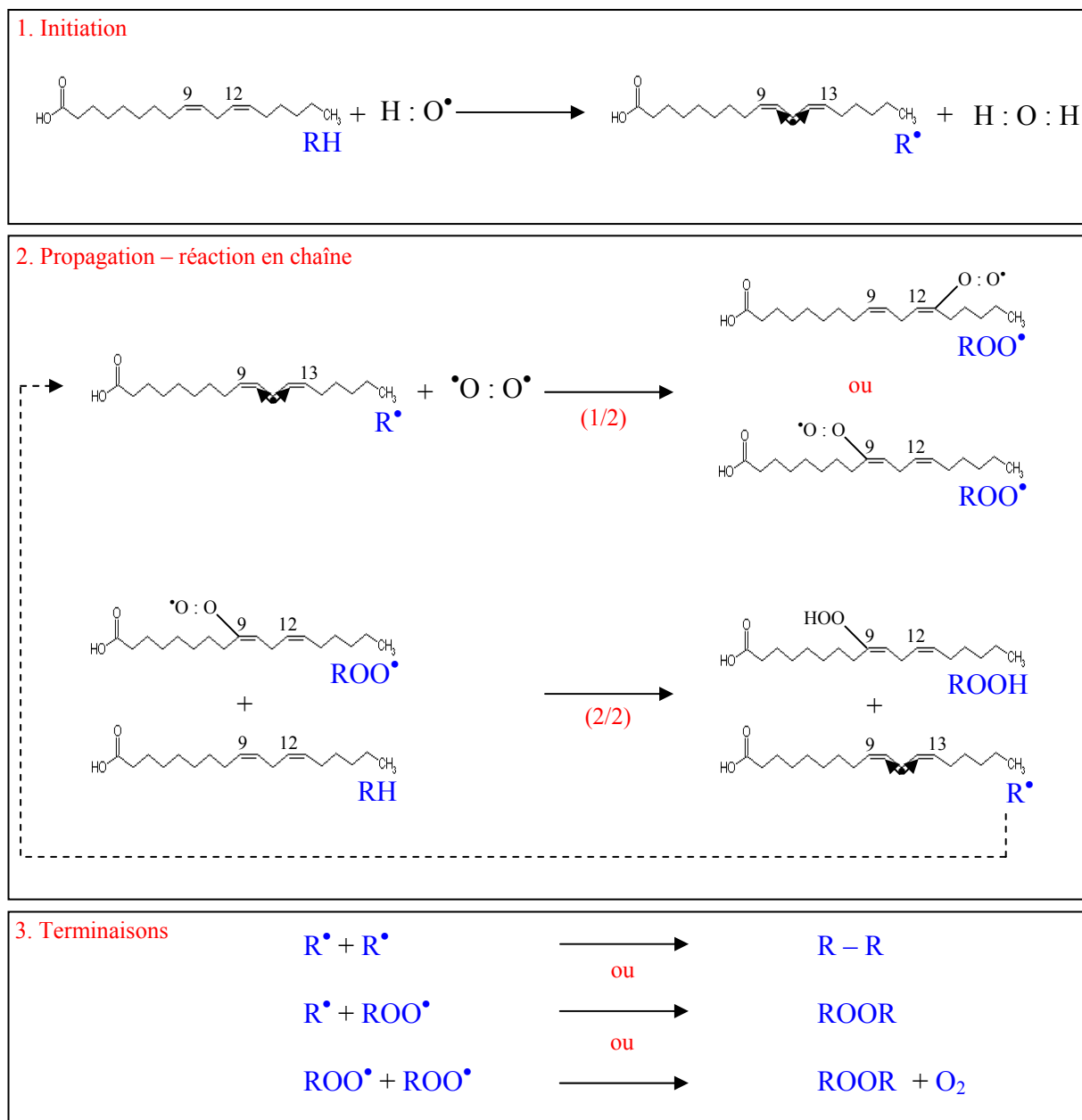
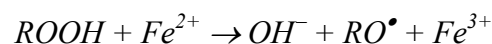


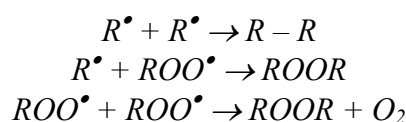
Figure 17. Réactions d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique par un radical hydroxyle.

L'hydroperoxyde lipidique ($ROOH$) formé est instable en présence de catalyseurs métalliques et intervient dans la réaction de Fenton générant des radicaux réactifs alkoxy RO^\bullet .



Notons que parmi les produits de dégradation des hydroperoxydes lipidiques, on retrouve des aldéhydes tels que le malonedialdéhyde et des hydrocarbures comme l'éthane et l'éthylène qui sont généralement considérés comme de bons marqueurs indirects de dégâts oxydatifs (SHULAEV & OLIVER, 2006).

Enfin, la réaction de **terminaison** implique une polymérisation des radicaux carbonés R^\bullet ou peroxy ROO^\bullet formant des produits conjugués non radicalaires :



En résumé, les PUFA sont sensibles à la peroxydation, un processus par lequel les radicaux hydroxyles ou l'oxygène singulet peuvent réagir avec les groupements méthylènes en formant des diènes conjugués, des radicaux peroxy lipidiques et des hydroperoxydes. Ces radicaux peroxy peuvent arracher un proton à d'autres acides gras insaturés, générant ainsi une réaction en chaîne (SMIRNOFF, 1995).

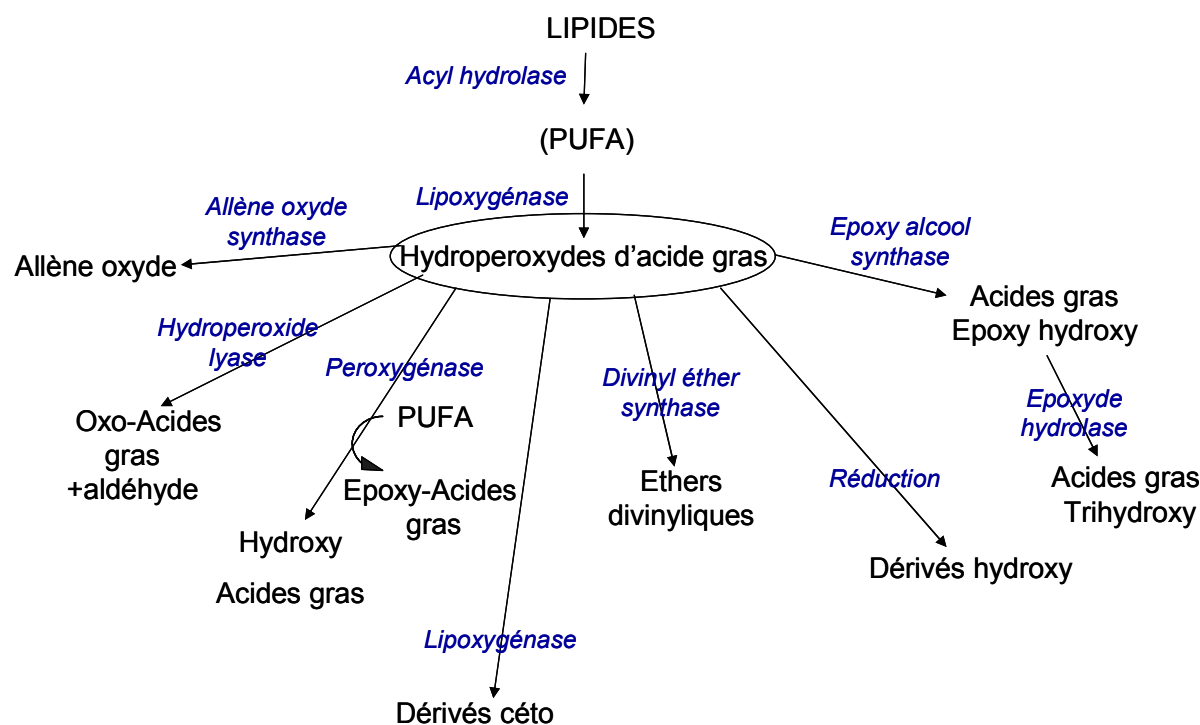


Figure 18. Voies enzymatiques utilisant les hydroperoxydes d'acide gras (HPO) comme substrats métaboliques.

Notons cependant que les hydroperoxydes d'acide gras (HPO) peuvent également être formés enzymatiquement par action d'enzymes comme la LOX ou l' α -dioxygénase sur les PUFA. Ils sont en fait des intermédiaires clés dans la voie de la LOX et peuvent être convertis enzymatiquement en un très grand nombre de métabolites appelés oxylipines (Figure 18). Pas moins de sept voies enzymatiques utilisent les HPO comme substrats : l'hydroperoxyde lyase qui clive les HPO en aldéhydes et en oxo-acides, l'allène oxyde synthase qui forme les précurseurs des α - et γ - cétoles et de l'acide jasmonique, la peroxygénase qui provoque l'époxydation et la réduction des HPOs, l'époxy alcool synthase qui transforme les HPOs en acides gras époxy hydroxy, la réductase qui réduit les HPOs en

dérivés hydroxy, la divinyl éther synthase qui produit des éthers divinyls et finalement la LOX qui génère des dérivés céto (FAUCONNIER *et al.*, 2003).

La peroxydation lipidique génère des dysfonctionnements structurels et fonctionnels (SMIRNOFF, 1995), mais elle n'est pourtant pas la seule voie de dégradation oxydative des lipides (MCKERSIE, 1996). Une alternative, basée sur l'observation des ions superoxydes réagissant avec les esters en clivant la liaison C-O, a été proposée par NIEHAUS en 1978. L'attaque oxydative d'un ion superoxyde sur une bicouche phospholipidique produirait donc des acides gras libres par désestérification. Ces réactions ne seraient pas sélectives et ne cibleraient pas nécessairement des PUFA. Expérimentalement, un stress oxydatif se traduirait donc par des pertes de phospholipides sans changement dans leur degré de saturation. Ce phénomène est fréquemment mis en évidence chez les plantes en conditions de stress, mais est souvent attribué (à tort ?) à une activité lipase spécifique (MCKERSIE, 1996).

3.4.2 Modifications protéiques liées au stress oxydatif et au vieillissement

L'oxydation protéique fait partie des nombreuses modifications subies par les protéines au cours du vieillissement telles que la glycation, la glycoxydation, la désamidation, l'ubiquitination et la conjugaison avec les produits de peroxydation lipidique (Figure 19, CARRARD *et al.*, 2002).

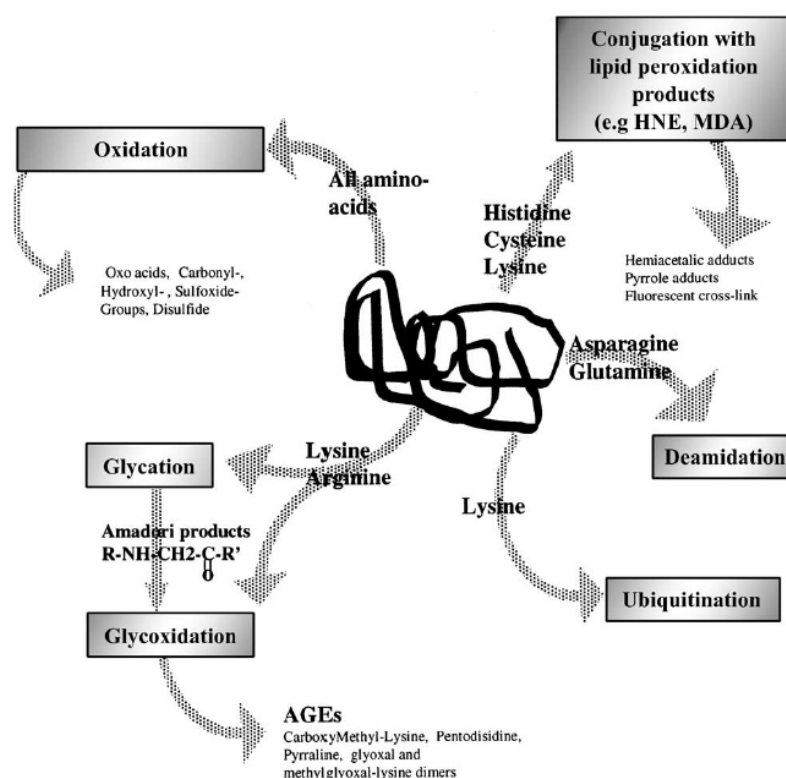


Figure 19. Voies d'altération protéiques activées au cours du vieillissement (CARRARD *et al.*, 2002).

Les attaques oxydatives sur protéines provoquent des modifications d'acides aminés (SHULAEV & OLIVER, 2006), des oxydations et des fragmentations de la chaîne peptidique (RHOADS *et al.*, 2006), une agrégation des produits réactionnels polymérisés, une altération du point isoélectrique et une sensibilité accrue à la protéolyse. Les acides aminés d'un peptide diffèrent par leur sensibilité aux attaques et les différentes ROS se distinguent par leur réactivité potentielle. Les structures primaires, secondaires et tertiaires modifient de plus

la sensibilité aux attaques des différents acides aminés. Les réactions menant à ces différentes modifications sont complexes et ont été synthétisées par BERLETT & STADTMAN (1997).

Malgré les nombreux paramètres influençant la susceptibilité protéique à l'oxydation, des règles générales peuvent être tirées (MCKERSIE, 1996 ; ADAMS *et al.*, 2001) :

- les acides aminés contenant spécifiquement du soufre et des groupements thiols sont très sensibles à l'oxydation. La cystéine oxydée forme ainsi des ponts disulfures tandis que l'oxydation de la méthionine génère de la méthionine sulfoxyde (RHOADS *et al.*, 2006),
- de nombreux acides aminés subissent des modifications irréversibles spécifiques en cas d'oxydation. Le tryptophane est ainsi facilement polymérisé et forme des produits bi-tyrosines (DAVIES, 1987),
- l'histidine, la lysine, la proline, l'arginine, la thréonine et la sérine forment des résidus carbonyles par oxydation directe (Figure 20) ou par réaction avec des cétoamines et des cétoaldéhydes résultant de l'action des ROS sur les lipides et les sucres (STADTMAN, 1986 ; DALLE-DONNE *et al.*, 2003 ; RHOADS *et al.*, 2006 ; SHULAEV & OLIVER, 2006). Ce contenu en carbonyles augmente au cours du stockage des tubercules de pomme de terre à 4°C pendant 30 mois (KUMAR *et al.*, 1999),
- la dégradation oxydative des protéines est accrue en présence de cofacteurs métalliques (RHOADS *et al.*, 2006),
- les modifications oxydatives de certains acides aminés spécifiques sont un mécanisme de marquage de la protéine entraînant sa protéolyse (STADTMAN, 1986),
- les aldéhydes formés par la peroxydation lipidique peuvent se conjuguer et inactiver des protéines (SMIRNOFF, 1995),
- les protéines peuvent réagir avec les produits de peroxydation lipidique et les formes actives de l'azote résultant d'interactions avec les ROS (RHOADS *et al.*, 2006).

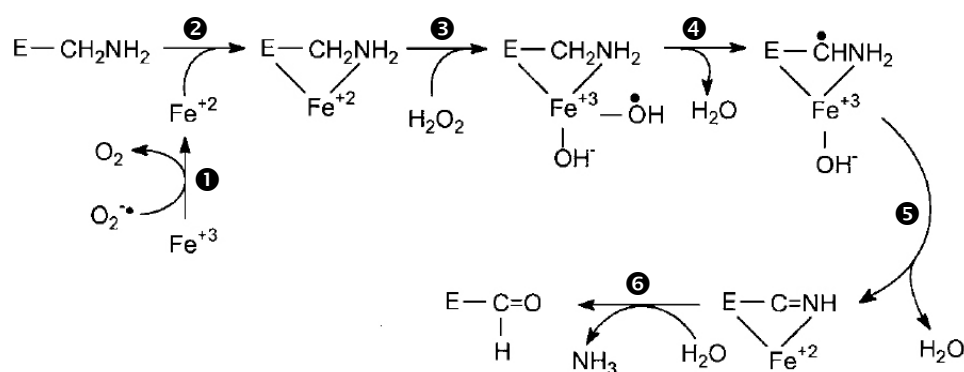


Figure 20. Exemple de réaction d'oxydation de la lysine formant un résidu carbonyle de type aldéhyde. Le radical carboné produit par la réaction 4 peut cliver la chaîne peptidique ou mener à une liaison covalente de deux chaînes polypeptidiques, voire à l'hydrolyse du groupement aminé ϵ , générant ainsi un aldéhyde (réaction 6) (SHULAEV & OLIVER, 2006).

Pratiquement parlant, on considère que la mesure du contenu en carbonyles constitue une bonne évaluation du degré d'oxydation protéique (DALLE-DONNE *et al.*, 2003 ; SHULAEV & OLIVER, 2006). Ces résidus carbonyles ne résultent cependant pas uniquement de modifications oxydatives directes des chaînes latérales, des réactions comme la glycation pouvant également générer des résidus carbonyles sur les acides aminés (SHACTER *et al.*,

1996 ; ADAMS *et al.*, 2001). Cette mesure du contenu en carbonyles peut être réalisée spectrophotométriquement (REZNICK & PACKER, 1994) après dérivation à la 2,4-dinitrophényl hydrazine (DNPH). Des mesures immunochimiques sont également réalisables en utilisant des anticorps anti-DNP en ELISA ou après résolution des protéines en électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE : *sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) ou en électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE, SHULAEV & OLIVER, 2006).

Cette mesure de l'oxydation protéique nous renseigne par ailleurs sur les sites de production des ROS et de développement du stress oxydatif, du fait de la localisation subcellulaire des protéines et des ROS. En effet, même si l'H₂O₂ peut traverser les membranes (DESIKAN *et al.*, 2005), ce n'est pas le cas des anions superoxydes et des radicaux hydroxyles (SHULAEV & OLIVER, 2006).

3.5 Stress oxydatif et rôle signal des ROS

Un état de stress oxydatif se caractérise par un déséquilibre de la balance des systèmes pro- et anti- oxydants qui entraîne des dommages moléculaires potentiels. Ces dégâts peuvent résulter d'un stress oxydatif accru ou d'une diminution de l'efficacité des systèmes de recyclage ou de réparation. Un stress oxydatif est donc généré lorsque la production de ROS augmente ou lorsque l'activité des systèmes antioxydants diminue (HALLIWELL, 2006).

La production de ROS mitochondriale est souvent considérée comme une nuisance et une conséquence inévitable de la perte d'électrons en aérobiose. Cependant, outre les rôles physiologiques multiples joués par les ROS, ces variations de production d'H₂O₂ mitochondriale sont aussi des signaux qui renseignent le cytoplasme et le noyau sur l'activité mitochondriale, entraînant ainsi des modifications d'expression génique via une régulation redox et une phosphorylation des facteurs de transcription (VRANOVA *et al.*, 2002 ; HALLIWELL, 2006).

Les conséquences cellulaires d'un stress oxydatif dépendent du type de cellule et du niveau de stress appliqué (Figure 21). Habituellement, la concentration en Ca²⁺ intracellulaire augmente tout comme la concentration en fer qui catalyse les réactions radicalaires. Plusieurs types cellulaires répondent à un stress oxydatif modéré en entrant en mitose (DESIKAN *et al.*, 2005 ; JONES & SMIRNOFF, 2005 ; SMIRNOFF, 2005). Ces cellules peuvent également s'adapter au stress en surrégulant les systèmes de défense et de réparation ou en diminuant l'activité des systèmes producteurs de ROS. Cette réponse à un stress oxydatif peut (1) complètement protéger les biomolécules contre les dégâts, (2) permettre une protection partielle ou (3) entraîner une surprotection temporaire qui rend les cellules résistantes à des stress oxydatifs accrus appliqués ultérieurement (DESIKAN *et al.*, 2005 ; HALLIWELL, 2006).

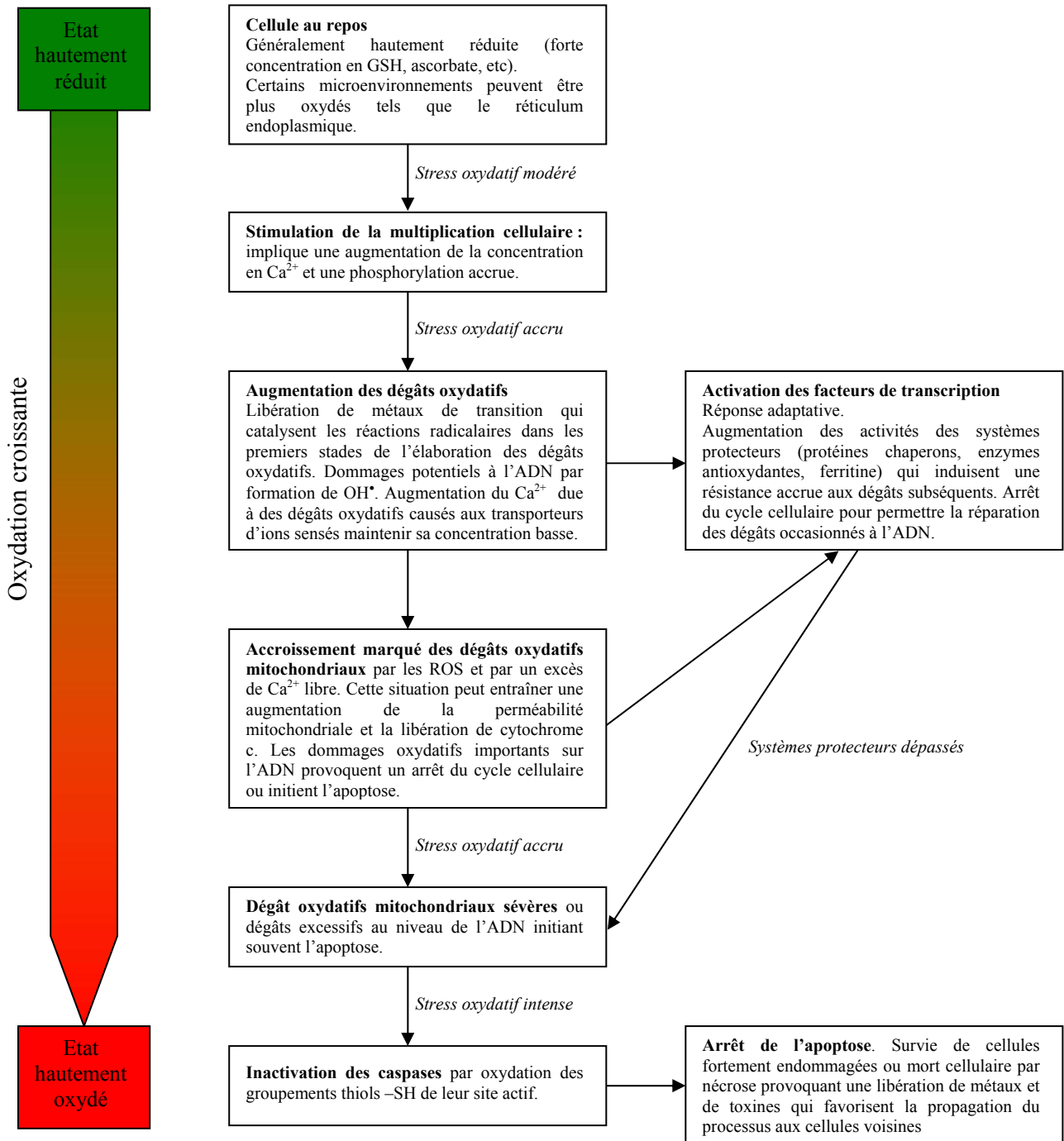


Figure 21. Réponse cellulaire végétale schématisée à un stress oxydatif de plus en plus poussé (traduit de HALLIWELL, 2006).

Les ROS peuvent en fait influencer l'expression génique à différents niveaux, depuis le niveau transcriptionnel (via l'expression ou l'activation de facteurs de transcription spécifiques) jusqu'au niveau fonctionnel en oxydant directement ou indirectement les enzymes grâce à des molécules ubiquistes rédox-sensibles comme le GSH ou les thiorédoxines (VRANOVA *et al.*, 2002 ; DESIKAN *et al.*, 2005).

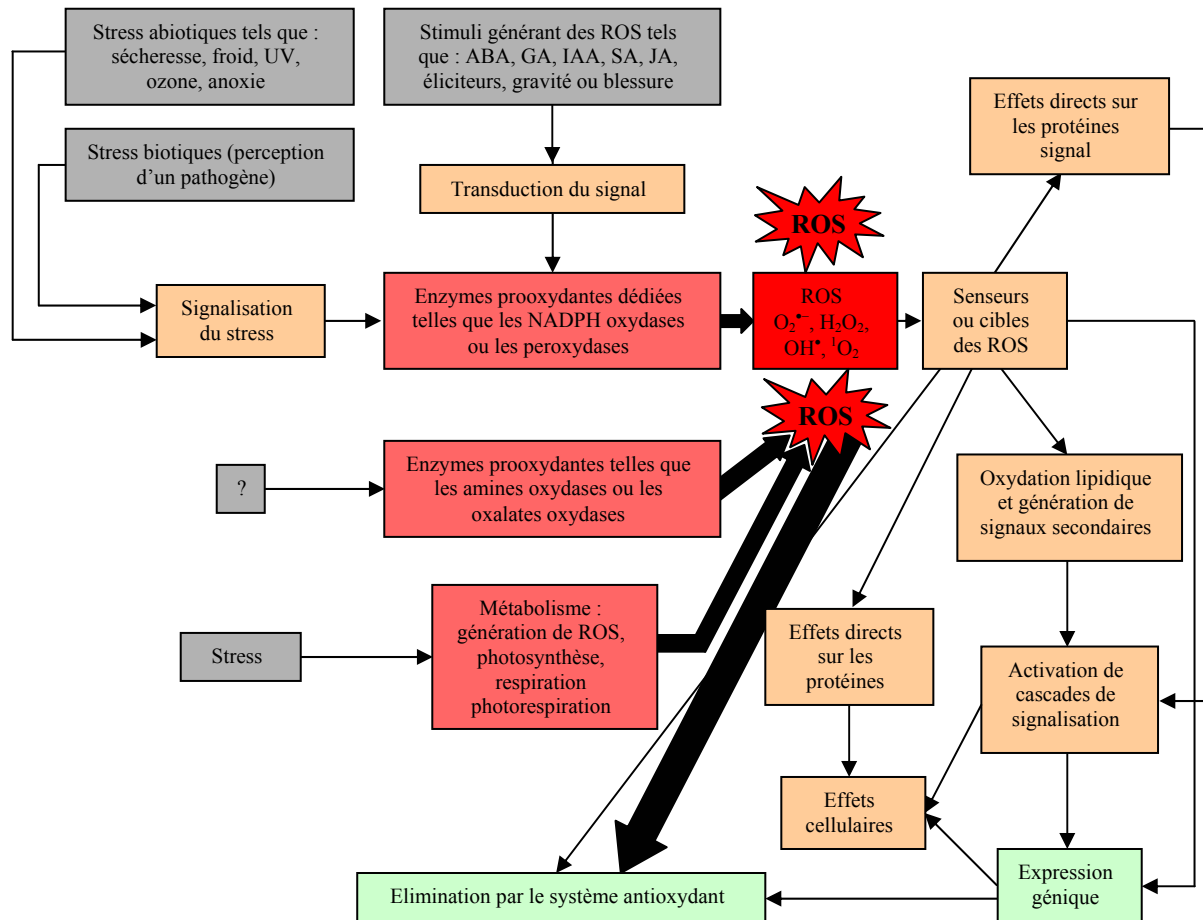


Figure 22. Le rôle central des ROS dans la signalisation végétale (traduit de DESIKAN *et al.*, 2005).

Les stress abiotiques ou biotiques, la signalisation hormonale et les stimuli environnementaux peuvent tous mener à la génération de ROS, produisant ainsi de multiples modifications dans la cellule. Les ROS sont finement régulées par les enzymes qui les produisent et les mécanismes antioxydants qui les éliminent. Elles sont générées et consommées dans différents compartiments cellulaires et leur accumulation peut produire des dégâts moléculaires et des réponses aberrantes. Il est également possible que les systèmes prooxydants et les protéines signal qui les activent et qui sont activées par ces systèmes soient co-localisés en complexes macromoléculaires dans des microdomaines spécifiques au sein de la cellule végétale. Ces différents processus sont résumés à la Figure 22 (DESIKAN *et al.*, 2005).

Des études récentes ont identifié plusieurs composés cellulaires impliqués dans la perception et la transduction en aval du signal lié aux ROS. Ces composés incluent les kinases protéiques activées par des agents mitogènes (MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*) ainsi que la calmoduline (KOVTON *et al.*, 2000 ; MITTLER, 2002). Un modèle généralisé de régulation de l'expression génique en cas de stress oxydatif est présenté à la Figure 23.

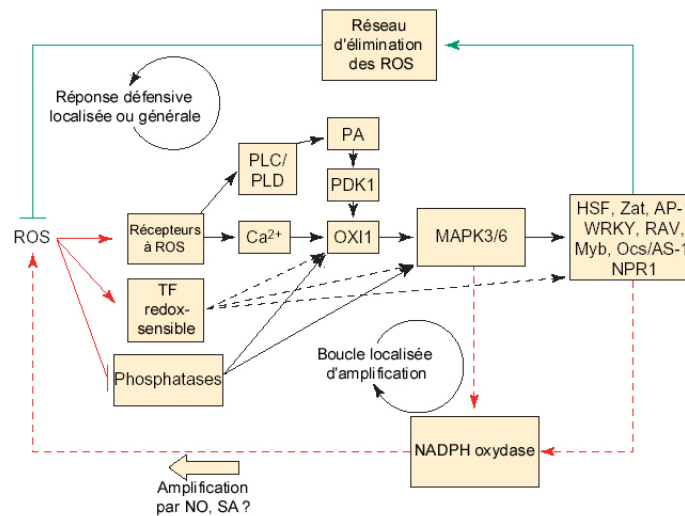


Figure 23. Modèle généralisé de l'activation de la transduction du signal lié aux ROS (MITTLER *et al.*, 2004).

Les ROS peuvent être détectées par au moins trois mécanismes distincts : (1) les récepteurs à ROS, (2) les facteurs de transcription sensibles au statut redox tels que NPR1 ou les *Heat Shock Factors* (HSF) et (3) les phosphatases. La perception des ROS implique un grand nombre d'acteurs en aval de la voie de signalisation tels que le Ca^{2+} et les protéines fixant le Ca^{2+} (par exemple, les calmodulines). Elle active également les protéines G et une phospholipase C/D (PLC/PLD) qui génère de l'acide phosphatique (PA). Le Ca^{2+} et le PA (via une kinase phosphoinositide-dépendante, PDK1) activent ensuite la kinase protéique OXI1. L'activation d'OXI1 induit l'activation d'une cascade de MAPK (MAPK3/6) et de différents facteurs de transcription des familles WRKY, Zat, RAV, GRAS et Myb qui activent les voies de défense impliquant notamment les systèmes antioxydants et les protéines de choc thermique (HSP : *Heat Shock Proteins* activées par l' H_2O_2). Ces facteurs de transcription inhibent aussi certains mécanismes prooxydants (MITTLER, 2002, MITTLER *et al.*, 2004). L'activation ou l'inhibition des facteurs de transcription sensibles au statut redox par les ROS affecte également l'expression de OXI1 et d'autres kinases et induit l'expression de facteurs de transcription ROS-spécifiques. L'inhibition des phosphatases telles que ABI1 et ABI2 par les ROS peut finalement induire l'activation de kinases telles que OXI1 et MAPK3/6 (MITTLER *et al.*, 2004 ; DESIKAN *et al.*, 2005).

Ce modèle d'activation de l'expression génique a été affiné par GADJEV *et al.* (2006). En comparant plusieurs études transcriptomiques liées à des stress oxydatifs, ces auteurs ont démontré que le type de ROS majoritaire généré au cours d'un stress induisait des réponses ROS-spécifiques (voir aussi DESIKAN *et al.*, 2005) ainsi que des réponses généralisées communes à l'ensemble des ROS générées par les différents stress. Par ailleurs, l'activité biologique de ces ROS est liée au site intracellulaire de production (LALOI *et al.*, 2004 ; DESIKAN *et al.*, 2005).

CHAPITRE 2 : OPTIONS METHODOLOGIQUES ET OBJECTIFS POURSUIVIS

1 INTRODUCTION - CONTEXTE

L'étude du processus de vieillissement des tubercules de pomme de terre présente des finalités appliquées et fondamentales. Afin de caractériser cet âge physiologique, deux approches complémentaires ont été développées (Figure 25). Dans un premier temps, des marqueurs physiologiques ont été sélectionnés et comparés afin d'établir un cadre de référence plus précis que l'âge chronologique. Parallèlement, une étude biochimique comportant deux volets a été réalisée afin de mettre en évidence des corrélations entre l'âge physiologique des tubercules et les profils d'expression de divers métabolites.

2 CHOIX DES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DE L'AGE PHYSIOLOGIQUE

2.1 Caractérisation physiologique

A l'heure actuelle, aucun des indicateurs biophysiques ne rencontre entièrement les objectifs poursuivis (voir point 2.4.1 de la Synthèse bibliographique). Les variations interannuelles sont en effet trop importantes ; les résultats obtenus sont par ailleurs peu transposables, voire contradictoires. Pour bon nombre de ces indicateurs, des valeurs semblables ne reflètent d'ailleurs pas exactement le même âge physiologique (CALDIZ *et al.*, 1985 ; VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987).

Les comparaisons utilisant des indicateurs physiologiques existants et leurs relations avec les rendements se sont révélées délicates, à l'exception des résultats obtenus avec la période d'incubation (HARTMANS & VAN LOON, 1987) et avec le PAI de CALDIZ *et al.* (2001).

Il a donc été décidé de caractériser l'âge physiologique des tubercules à l'aide de ce PAI et de mesurer la longueur de leur période d'incubation. L'objectif poursuivi est d'établir un cadre de référence permettant d'assurer une base de comparaison indépendante de l'année de production et de la variété.

Une corrélation sera également établie entre les valeurs de PAI calculées et les profils de levée en chambre conditionnée. En fonction de la disponibilité du matériel végétal, des mesures de variations interannuelles seront aussi réalisées.

2.2 Caractérisation biochimique

2.2.1 Approche sans a priori basée sur le DIGE

Cette approche biochimique cherche à évaluer les variations s'opérant au niveau du protéome au cours du vieillissement des tubercules de pomme de terre. Le protéome joue en effet un rôle-clé dans la régulation des réactions métaboliques. Il occupe de plus une position stratégique dans les étapes de l'expression génique (Figure 24). Cette démarche a

pour but de quantifier et d'identifier les protéines majeures différemment exprimées au cours du processus de vieillissement.

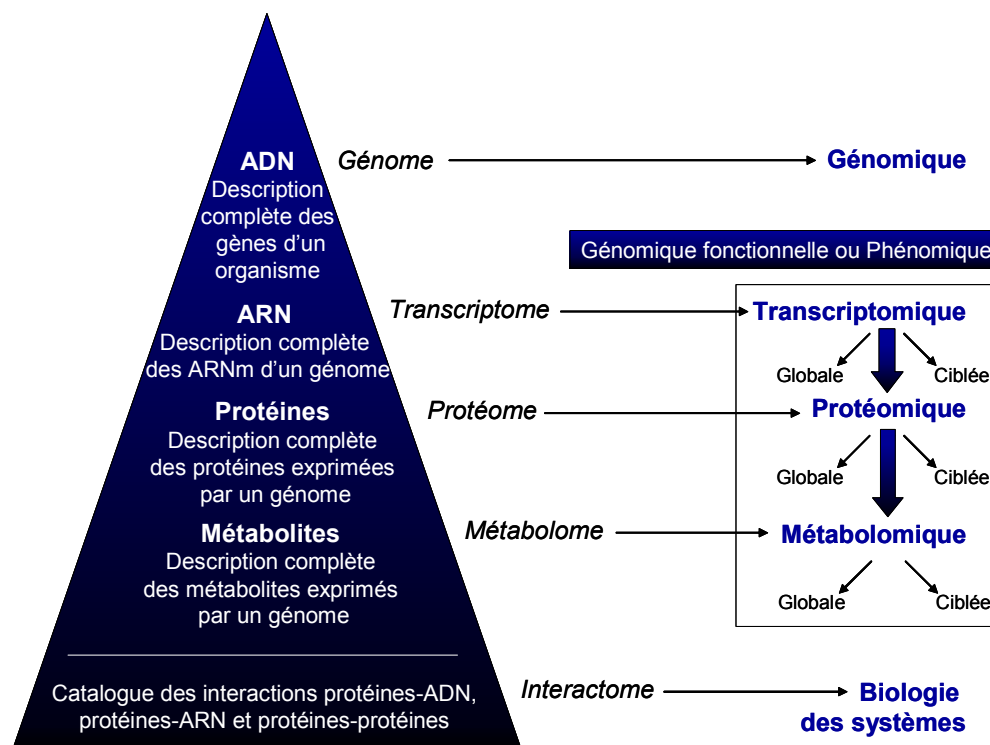


Figure 24. Les différentes étapes de l'expression génique. Le nom des disciplines étudiant chacune de ces étapes est également mentionné (SIMPSON, 2003).

L'étude protéomique nécessite au préalable la mise au point d'une méthode d'extraction protéique adaptée au tubercule de pomme de terre. Afin de séparer les protéines extraites, notre choix s'est porté sur une version multiplexée de l'électrophorèse bidimensionnelle : l'électrophorèse différentielle en gel de polyacrylamide couplée à un marquage fluorescent (DIGE : *Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*). Ce choix a été influencé par :

- la non-nécessité de connaissance *a priori* du protéome,
- son caractère quantitatif, afin de ne pas se cantonner à des recherches de marqueurs de type "présence-absence", des variations d'abondance significatives de l'ordre de 10% pouvant être mise en évidence grâce à sa puissance statistique,
- l'intervalle linéaire de la coloration : 5 logs,
- la puissance statistique de la méthode,
- sa haute résolution, en effet, elle permet la visualisation de plusieurs centaines d'espèces protéiques simultanément,
- sa sensibilité inférieure à 1 ng,
- la possibilité de séparer sur gel des isoformes d'une même protéine,
- la possibilité d'identifier en spectrométrie de masse en tandem les marqueurs protéiques sélectionnés sur gels préparatifs,
- la position des protéines en aval de la cascade d'expression génique.

2.2.2 Approche ciblée (hypothèse oxydative du vieillissement)

Le but poursuivi est de caractériser l'évolution des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques au cours du vieillissement des tubercules. De nombreux antioxydants ont déjà

été dosés au cours du stockage des tubercules de pomme de terre (voir point 2.4.4. du chapitre 1). Certains de ces dosages se sont cependant révélés contradictoires ou mal adaptés à une caractérisation fine de l'évolution physiologique des tubercules semences, du fait d'un intervalle de stockage inadapté à la réalité agronomique ou d'une absence de caractérisation physiologique du matériel végétal. Par ailleurs, aucune étude globale n'a été réalisée afin de mettre en évidence d'éventuels effets compensatoires ou synergiques entre antioxydants.

Au niveau enzymatique, les activités SOD, POX, APX et CAT seront dosées sur gels natifs (Native-PAGE : *Native-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) couplés à des colorations spécifiques. Les activités spécifiques SOD, APX et CAT seront de plus mesurées par spectrophotométrie.

En ce qui concerne les antioxydants non enzymatiques, l'ascorbate, le glutathion et les caroténoïdes seront dosés en spectrophotométrie. Si nécessaire, des dosages séparés des formes réduites, oxydées et totales seront réalisés. Les composés phénoliques majeurs seront dosés par chromatographie liquide haute performance (HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*) couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD : *Diode Array Detector*) ou fluorimétrie.

En complément de cette évaluation fine, le système antioxydant sera évalué globalement via une mesure de l'activité d'élimination des radicaux libres.

Finalement, une attention particulière sera apportée à la caractérisation des profils en oxylipines par HPLC-DAD, ces dernières constituant – avec les protéines – une des cibles préférentielles des attaques oxydatives (SOHAL, 2002b ; SPITELLER, 2003). Un dosage des résidus carbonyles sera finalement effectué afin de mesurer globalement le degré d'oxydation protéique.

3 SYNTHÈSE DES OBJECTIFS (FIGURE 25)

L'ensemble des objectifs intermédiaires et généraux poursuivis au cours de cette thèse peuvent se résumer comme suit.

D'un point de vue physiologique, nos objectifs sont de caractériser finement l'évolution du matériel végétal au cours du vieillissement et d'établir des comparaisons intervariétales et interannuelles des vitesses de vieillissement. Les valeurs de PAI obtenues seront corrélées avec les paramètres de levée tels que l'intervalle pré-émergence ou le nombre de tiges produites. Elles permettront d'exprimer les résultats biochimiques sur base de l'âge physiologique des tubercules. Une corrélation directe pourra ainsi être établie entre certains indicateurs biochimiques sélectionnés et les paramètres de levée.

En ce qui concerne la caractérisation biochimique du vieillissement, l'évolution du protéome sera évaluée à l'aide du DIGE. Les protéines majeures différenciellement exprimées seront identifiées par spectrométrie de masse. En parallèle, le système antioxydant sera caractérisé globalement. Une mesure directe des dégâts oxydatifs sera réalisée sur les lipides et les protéines. L'ensemble des données obtenues permettra d'évaluer l'hypothèse oxydative du vieillissement. Ces résultats seront discutés en tenant compte du rôle signal des ROS.

Finalement, un modèle physiologique et biochimique intégré décrivant le processus de vieillissement du tubercule de pomme de terre sera élaboré et comparé avec d'autres systèmes végétaux liés à la sénescence et au vieillissement.

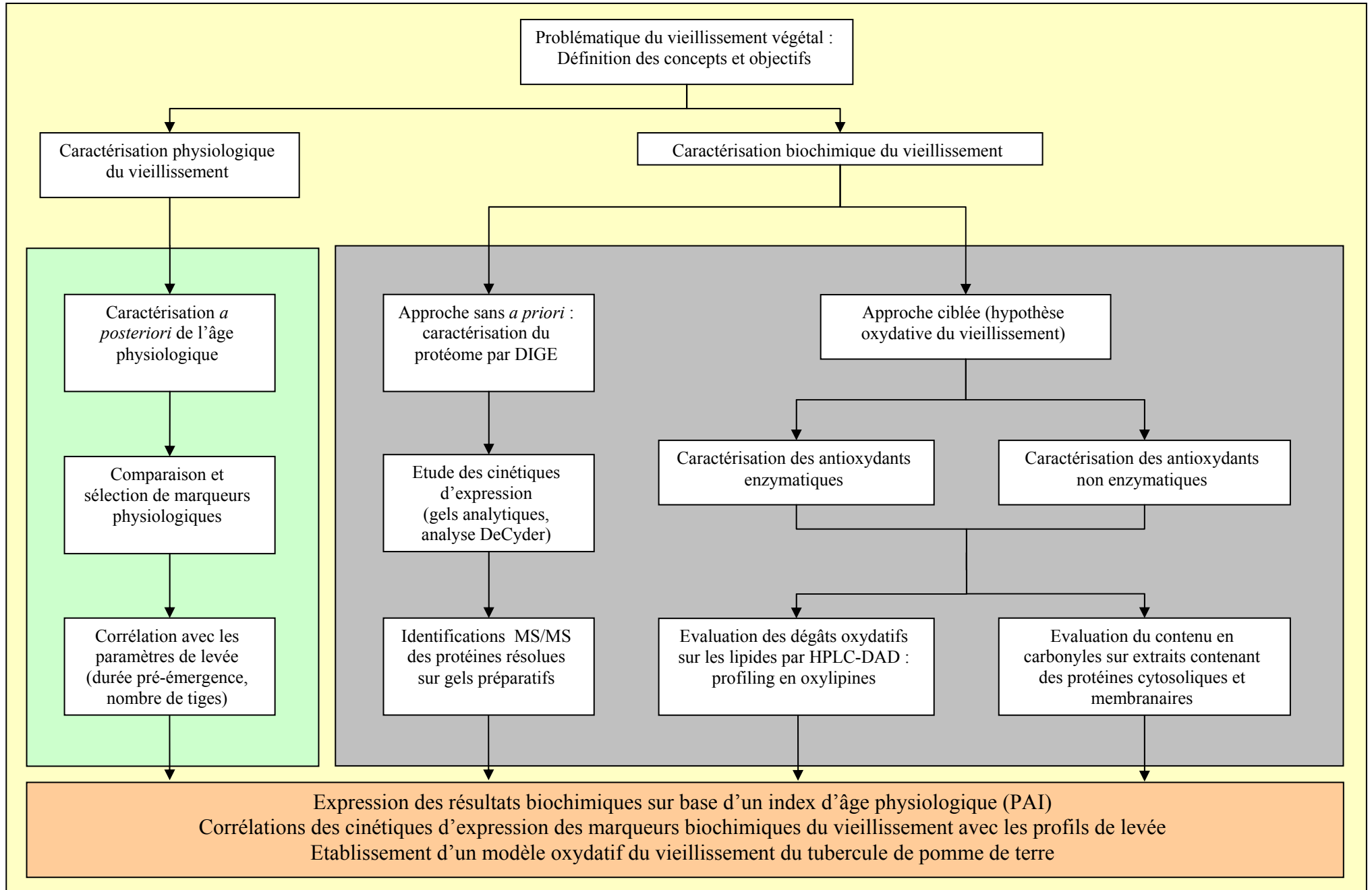


Figure 25. Schéma du travail expérimental.

CHAPITRE 3 : CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT

1 INTRODUCTION

Une caractérisation physiologique préalable du matériel végétal étudié est essentielle afin d'interpréter correctement les variations biochimiques observées au cours du vieillissement. Dans cette optique, différents paramètres liés à la germination (PAI, PI et durée de dormance) et à la levée (pourcentage de germination, nombre de tiges produites, délai avant levée, aspect visuel) ont été mesurés et font l'objet du présent chapitre.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel biologique

Les tubercules de *Solanum tuberosum* L. cv. Bintje et Désirée ont été produits dans la ferme Dardenne à Roux-Miroir (Belgique) et calibrés manuellement entre 35 et 40 mm. Les différentes étapes agronomiques précédant le stockage à 4°C, 95 % HR à l'obscurité sont résumées dans le Tableau 2.

Etapes agronomiques	cv. Désirée	cv. Bintje
Année de récolte :	2004	2004
Date de défanage	08/09/2004	08/09/2004
Date de récolte	01/10/2004	08/10/2004
Date de lavage	04/10/2004	11/10/2004
Date de début de cicatrisation à 20°C	05/10/2004	12/10/2004
Date de début de stockage à 4°C	18/10/2004	22/10/2004
Calibre	35-40 mm	35-40 mm
Année de récolte :	2005	2005
Date de défanage	13/09/2005	18/09/2005
Date de récolte	23/09/2005	30/09/2005
Date de lavage	23/09/2005	30/09/2005
Date de début de cicatrisation à 20°C	24/09/2005	01/10/2005
Date de début de stockage à 4°C	07/10/2005	14/10/2005
Calibre	35-40 mm	35-40 mm
Année de récolte :	2006	2006
Date de défanage	21/09/2006	16/09/2006
Date de récolte	29/09/2006	22/09/2006
Date de lavage	29/09/2006	22/09/2006
Date de début de cicatrisation à 20°C	30/09/2006	23/09/2006
Date de début de stockage à 4°C	13/10/2006	06/10/2006
Calibre	35-40 mm	35-40 mm

Tableau 2. Paramètres agronomiques des tubercules récoltés au cours des années 2004, 2005 et 2006.

Les tubercules du cv. Désirée récoltés en 2005 n'ont pas pu être exploités pour les études physiologiques et biochimiques à cause d'un fort pourcentage de tubercules

« flottants » ou vitreux. Le contenu en amidon de ces tubercules était faible ou hétérogène. Ces accidents physiologiques ont entraîné des pertes très lourdes lors du stockage et de la germination des tubercules.

2.2 Evaluation des paramètres physiologiques

2.2.1 Période d'incubation et index d'âge physiologique

Pour les récoltes 2004 et 2005, dix prélèvements aléatoires ont été réalisés après 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 et 270 jours de stockage à 4°C. Pour la récolte 2006, six prélèvements ont été effectués pour chaque cv. après 0, 30, 90, 150, 210 et 270 jours.

Chaque prélèvement est constitué de 40 tubercules. Ces derniers sont placés en chambre de germination (20°C, 85 % HR, obscurité) dans des caisses contenant de la vermiculite humide (55% m/m). Les tubercules sont disposés longitudinalement et enfoncés à mi-hauteur dans la vermiculite. Ils sont pulvérisés à l'aide de CaSO₄ 0,01M trois fois par semaine pour ralentir l'apparition d'éventuelles nécroses apicales des germes. Les observations liées à la germination et au boulage sont également réalisées trois fois par semaine.

2.2.1.1 Période d'incubation

La période d'incubation est calculée pour chaque tubercule par différence entre sa date de germination (apparition d'un premier germe supérieur à 5 mm) et sa date de boulage (apparition du premier tubercule fils de diamètre supérieur au double de celui du stolon ou apparition du premier tubercule fils sessile de diamètre supérieur à 3 mm).

2.2.1.2 Index d'âge physiologique

Le PAI est calculé pour chaque tubercule selon la formule suivante (CALDIZ *et al.*, 2001) :

$$PAI = \frac{(T - T_0)}{(T_1 - T_0)}$$

où T est la date de détermination de l'âge physiologique, T₀ est la date de défanage et T₁ est la date de fin de période d'incubation calculée individuellement à 20°C.

2.2.2 Evaluation des paramètres de levée

Les paramètres de levée des tubercules du cv. Bintje récoltés en 2005 ont été évalués après 30, 90, 150, 210 et 270 jours de stockage à 4°C. La levée des tubercules des cv. Désirée et Bintje récoltés en 2006 a été caractérisée après 0, 30, 90, 150, 210 et 270 jours de stockage à 4°C.

Pour chaque durée de stockage, 27 tubercules répartis en 3 répétitions sont mis en germination dans du terreau en conditions contrôlées (photopériode de 12 h, 70 % HR, température diurne de 25 °C, température nocturne de 18 °C). Chaque tubercule est placé dans un pot préalablement rempli d'une couche de 3 cm de substrat et est ensuite recouvert de terreau jusqu'au sommet du pot. Le nombre de tiges aériennes produites par chaque tubercule est évalué trois fois par semaine.

2.2.3 Analyse statistique

Après vérification des conditions d'application, chaque groupe de données a fait l'objet d'une analyse de la variance à un critère de classification. Les valeurs du paramètre p permettant de tester l'hypothèse nulle d'égalité des moyennes sont présentées graphiquement.

En cas d'influence significative de la variable étudiée ($p \leq 0,05$), les moyennes sont classées qualitativement selon le test de Newman et Keuls. Des valeurs non significativement différentes ($\alpha = 5\%$) partagent une même lettre.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Evolution des paramètres liés à la germination

Les tubercules des cv. Bintje et Désirée récoltés en 2004, 2005 et 2006 ont fait l'objet de mesures liées à la germination permettant de calculer les valeurs de PAI, de PI et de durée de dormance propres à chaque prélèvement. Les données chiffrées n'apparaissent pas sur les graphiques, mais sont synthétisées dans le Tableau 3. Ce tableau reprend l'ensemble des points de prélèvement communs aux différentes récoltes. Selon les années, le nombre de jours écoulés entre le défanage et le stockage à 4°C est variable et correspond aux recommandations prodiguées par les organismes de conseil tels que la FIWAP (Filière Wallonne de la Pomme de terre).

Cultivar et année de récolte	Mesures effectuées	Durée de stockage à 4°C [jours]					
		0	30	90	150	210	270
Bintje 2004 (44)	PAI	0,17 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,51 ± 0,03	0,66 ± 0,03	0,77 ± 0,01	0,86 ± 0,02
	PI	178 ± 23	161 ± 19	117 ± 15	93 ± 12	72 ± 6	51 ± 7
	Dormance	41 ± 15	21 ± 6	14 ± 3	7 ± 3	2 ± 2	0 ± 0
Bintje 2005 (26)	PAI	0,12 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,66 ± 0,02	0,77 ± 0,02	0,86 ± 0,02
	PI	173 ± 22	160 ± 19	118 ± 15	86 ± 8	70 ± 10	47 ± 10
	Dormance	30 ± 18	18 ± 3	12 ± 3	5 ± 3	0 ± 0	0 ± 0
Bintje 2006 (20)	PAI	0,08 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,60 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,81 ± 0,02
	PI	166 ± 24	162 ± 19	134 ± 14	106 ± 12	90 ± 18	68 ± 11
	Dormance	54 ± 21	23 ± 6	12 ± 3	7 ± 3	6 ± 3	1 ± 2
Désirée 2004 (40)	PAI	0,14 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,62 ± 0,03	0,75 ± 0,02	0,83 ± 0,02
	PI	188 ± 27	165 ± 24	150 ± 18	114 ± 17	80 ± 8	66 ± 11
	Dormance	54 ± 22	30 ± 11	7 ± 3	4 ± 2	3 ± 3	0 ± 0
Désirée 2005 (-)	PAI						
	PI						
	Dormance						
Désirée 2006 (22)	PAI	0,09 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,42 ± 0,03	0,57 ± 0,05	0,68 ± 0,05	0,79 ± 0,03
	PI	170 ± 34	161 ± 29	148 ± 22	125 ± 29	103 ± 22	71 ± 14
	Dormance	63 ± 26	26 ± 18	10 ± 3	7 ± 1	8 ± 3	7 ± 3

Tableau 3. Synthèse des paramètres physiologiques mesurés au cours du vieillissement des tubercules récoltés en 2004, 2005 et 2006. Seuls les 6 points de prélèvement correspondant à ceux étudiés au niveau biochimique sont mentionnés. Les nombres apparaissant entre parenthèses derrière l'année de récolte correspondent au nombre de jours écoulés entre le défanage et le début du stockage à 4°C. PAI : *physiological age index* ; PI : période d'incubation.

3.1.1 Evolution du PAI

Le PAI varie entre 0 et 1 selon que les tubercules sont respectivement jeunes ou vieux (CALDIZ *et al.*, 2001). Dans l'étude de notre modèle, l'âge physiologique minimal mesuré est de 0,08 (cv. Bintje en 2006). A l'opposé, la valeur maximale observée est de 0,86 (Bintje en 2004 et 2005). L'intervalle de stockage considéré (270 jours) est donc compatible avec une étude détaillée de l'ensemble du processus de vieillissement dans un contexte agronomique.

Les valeurs mesurées se caractérisent par une très faible variabilité (Figure 26). Le PAI augmente constamment au cours du vieillissement pour les 2 cv. étudiés, quelle que soit l'année de récolte. Pour le cv. Désirée, les tubercules récoltés en 2006 présentent un âge physiologique initial plus faible, ce qui est compatible avec un intervalle post-défantage plus réduit (22 jours au lieu de 40) et un retard de croissance potentiel des cultures lié à des conditions météorologiques exceptionnellement chaudes et sèches (contrastant avec les moyennes des 18 dernières années) pour les mois de juin et de juillet (B-CGMS, 2006). Cette

différence d'âge physiologique est maintenue tout au long du stockage, même si elle a tendance à légèrement diminuer. En effet, l'écart entre les deux récoltes n'est plus que de 0,04 unité de PAI après 270 jours de stockage à 4°C.

Pour le cv. Bintje, les récoltes 2004 et 2005 sont proches en terme d'âge physiologique. Là aussi, les différences de PAI observées ont tendance à diminuer au cours du stockage jusqu'à atteindre une valeur finale identique (0,86). La récolte Bintje 2006 se distingue par contre nettement des deux autres, les valeurs de PAI mesurées en 2006 étant systématiquement plus faibles. Pour chaque cv., l'utilisation du PAI permet donc de mettre en évidence des variations interannuelles initiales et d'évaluer leur évolution au cours du stockage.

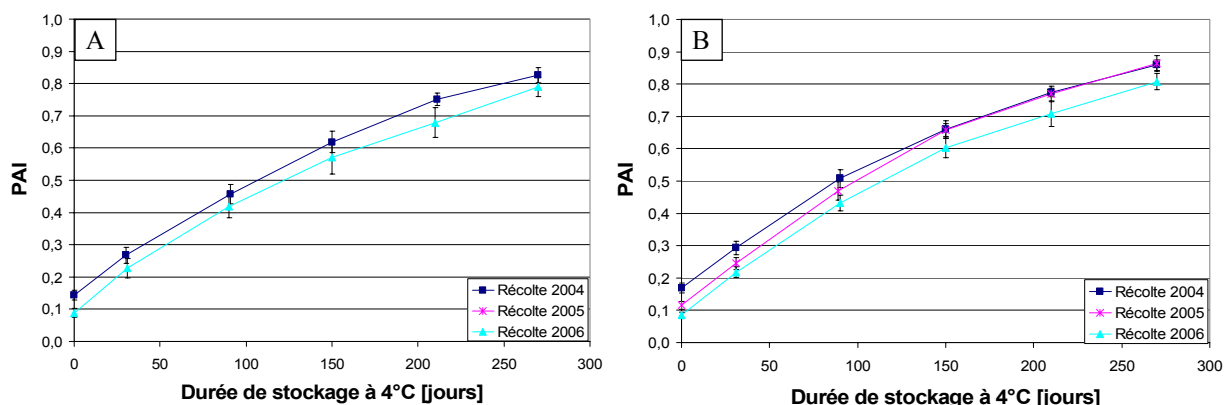


Figure 26. Evolution du PAI en fonction de la durée de stockage des tubercules des cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004, 2005 et 2006. Les résultats présentés sont les moyennes des mesures effectuées sur 40 tubercules +/- écart-type.

Les variations inter-variétales sont quant à elles plus nuancées. Les tubercules récoltés en 2004 permettent de mettre clairement en évidence des différences entre nos deux cv. d'intérêt, Bintje possédant un âge physiologique initial plus avancé que Désirée. Ces différences se maintiennent également au cours du stockage (Tableau 3). Les valeurs obtenues en 2006 sont par contre différentes et ne permettent pas de mettre en évidence de variations inter-variétales en début de stockage. En fin de stockage par contre, l'âge physiologique des tubercules Désirée est significativement ($p \leq 0,05$) plus faible que celui des tubercules Bintje. Comme nous le verrons dans le paragraphe consacré à la levée (point 3.2), ces mesures sont non seulement cohérentes avec le phénotype de levée observé, mais elles ne contredisent pas non plus le classement établi par MARTIN & GRAVOUEILLE (2001).

Les données complètes obtenues en 2004, 2005 et 2006 ont permis d'établir une modélisation fine de l'évolution de notre index d'âge physiologique en fonction de la durée de stockage (facteur fixe quantitatif). Au préalable, une analyse de la variance à 3 critères de classification (AV3) a été réalisée en utilisant un modèle croisé mixte tenant compte des facteurs cultivar, année de récolte (2004 et 2006), durée de stockage et des interactions possibles. Cette caractérisation préalable a permis de mettre en évidence des interactions significatives entre les trois facteurs étudiés (Année*Cultivar*Durée de stockage) ainsi qu'entre l'année de récolte et le cv (Année*Cultivar). Pratiquement parlant, cela signifie que l'influence de l'année de récolte sur le PAI peut être évaluée pour chaque cultivar indépendamment en considérant une durée de stockage donnée (12 AV1). La même démarche peut être répétée pour l'effet du cv. sur le PAI en fixant cette fois-ci l'année de récolte et la durée de stockage (12 AV1). Les résultats de cette décomposition de l'AV3 nous indiquent que l'effet de l'année de récolte sur le PAI est très hautement significatif pour chacun des deux cv. et pour chacune des 6 durées de stockage. L'effet du cv. est quant à lui également très hautement significatif pour 9 des 12 tests réalisés, seuls les 3 premiers points

de la cinétique de vieillissement réalisée sur la récolte 2006 n'étant pas significativement différents entre les deux cv. étudiés.

En ce qui concerne la modélisation, les résultats sont présentés dans le Tableau 4. Le but de cette modélisation n'est pas d'expliquer les données obtenues, mais d'ajuster un modèle polynomial permettant de rendre compte des variations observées au niveau du nuage de points. Comme indiqué, les composantes linéaire, quadratique et cubique ont systématiquement été évaluées en fonction de leur contribution au modèle. Les différents modèles qui résultent de leur intégration ont de plus été comparés en utilisant les écart-types résiduels estimés. Les pentes à 0 et 270 jours de stockage ont finalement été calculées afin d'évaluer les vitesses de vieillissement initiales et finales. Comme le montrent nos résultats, les tubercules Bintje récoltés en 2004 vieillissent plus vite que ceux de Désirée, quel que soit l'âge physiologique. Cette tendance se retrouve initialement en 2006, mais elle s'inverse en fin de stockage. Les vitesses de vieillissement observées diminuent également au cours du vieillissement. Remarquons que les comparaisons inter-variétales (test de Newman et Keuls, $\alpha = 5\%$) effectuées en 2004 et 2006 sur les extrêmes des cinétiques ont montrés que les différences mesurées entre Bintje et Désirée étaient significatives, à l'exception de celle observée en début de stockage des récoltes 2006. Cela confirme donc notre interprétation des tendances observées sur les courbes.

Caractéristiques		cv. Bintje	cv. Désirée
2004	Composante linéaire	Très hautement significative	Très hautement significative
	Composante quadratique	Très hautement significative	Très hautement significative
	Composante cubique	Hautement significative	Non significative
	Modèle retenu	$PAI = 0,16737 + 0,00448 D - 0,000009 D^2 + 0,00000001 D^3$ $R^2 = 98,9\%$ $Sr = 0,02343$	$PAI = 0,14877 + 0,00388 D - 0,000005 D^2$ $R^2 = 98,5\%$ $Sr = 0,02733$
	dPAI/dD à 0 jour	0,00448 UA Jour ⁻¹ à PAI = 0,17	0,00388 UA Jour ⁻¹ à PAI = 0,14
	dPAI/dD à 270 jours	0,00125 UA Jour ⁻¹ à PAI = 0,86	0,00119 UA Jour ⁻¹ à PAI = 0,83
2005	Composante linéaire	Très hautement significative	
	Composante quadratique	Très hautement significative	
	Composante cubique	Significative	
	Modèle retenu	$PAI = 0,11037 + 0,00477 D - 0,000009 D^2 + 0,00000001 D^3$ $R^2 = 99,0\%$ $Sr = 0,02345$	
	dPAI/dD à 0 jour	0,00477 UA Jour ⁻¹ à PAI = 0,12	
	dPAI/dD à 270 jours	0,00114 UA Jour ⁻¹ à PAI = 0,86	
2006	Composante linéaire	Très hautement significative	Très hautement significative
	Composante quadratique	Très hautement significative	Très hautement significative
	Composante cubique	Hautement significative	Significative
	Modèle retenu	$PAI = 0,08215 + 0,00483 D - 0,000011 D^2 + 0,00000001 D^3$ $R^2 = 99,1\%$ $Sr = 0,02541$	$PAI = 0,08985 + 0,00745 D - 0,000014 D^2 + 0,00000002 D^3$ $R^2 = 97,8\%$ $Sr = 0,03650$
	dPAI/dD à 0 jour	0,00483 UA Jour ⁻¹ à PAI = 0,08	0,00475 UA Jour ⁻¹ à PAI = 0,09
	dPAI/dD à 270 jours	0,00141 UA Jour ⁻¹ à PAI = 0,81	0,00193 UA Jour ⁻¹ à PAI = 0,79

Tableau 4. Modélisation par la méthode des polynômes orthogonaux de l'évolution du PAI au cours du vieillissement des tubercules récoltés en 2004 et 2005.

Au final, le PAI remplit en grande partie les objectifs fixés au point 2.4.1 de la Synthèse bibliographique. Il est fiable et facile à mesurer. Il rend compte des effets de l'année de récolte, du cultivar et de leur interaction. Il est également influencé par l'histoire des lots (intervalle post-défanage) et compatible avec la notion d'âge chronologique (durée de stockage).

3.1.2 Evolution de la PI

La période d'incubation constitue un deuxième indicateur reconnu de l'âge physiologique des tubercules (HARTMANS & VAN LOON, 1987 ; COLEMAN, 2000). Ce paramètre est d'autant plus petit que l'âge physiologique est avancé (Figure 27).

Les mesures réalisées se caractérisent par une dispersion plus importante que celle mesurée sur le PAI, ce qui peut générer des problèmes lors de la mise en évidence de variations. Ainsi, alors que le PAI permettait de mettre en évidence des variations inter-annuelles faibles pour le cv. Désirée, les courbes obtenues avec la PI sont très similaires, même si une légère tendance indiquant que les tubercules récoltés en 2006 sont plus jeunes que ceux de 2004 s'observe en fin de vieillissement. Aucune distinction n'est possible entre les récoltes 2004 et 2005 de Bintje. La récolte 2006 de ce dernier cv. se distingue cependant nettement des deux autres récoltes tant sur base du PAI que sur base de la PI. Comme l'avaient suggéré HARTMANS & VAN LOON (1987), la période d'incubation ne permet donc pas de distinguer des variations interannuelles modérées. L'évolution des courbes de PI est de plus irrégulière, ce qui peut générer des incohérences dans l'interprétation ponctuelle des résultats.

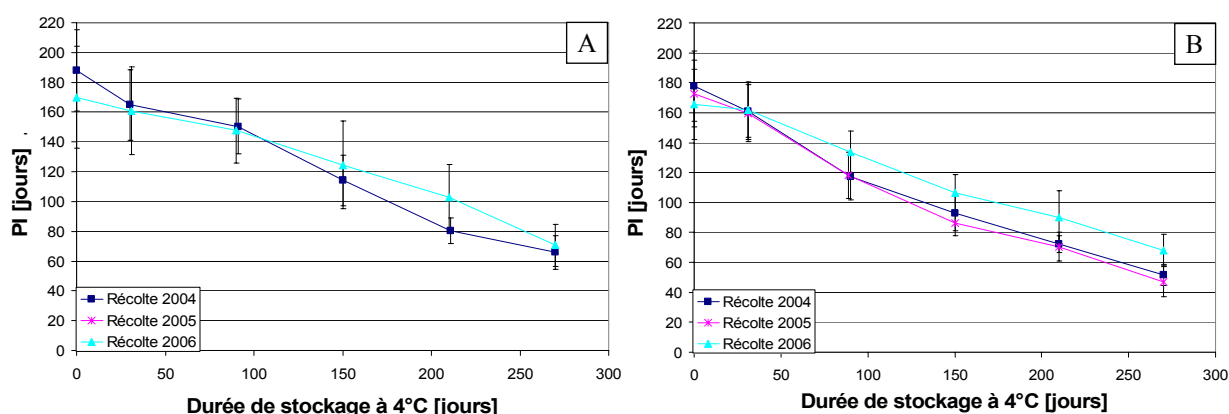


Figure 27. Evolution de la PI en fonction de la durée de stockage des tubercules des cvs. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004, 2005 et 2006. Les résultats présentés sont les moyennes des mesures effectuées sur 40 tubercules +/- écart-type.

Les variations inter-variétales observées en 2004 et 2006 sont globalement cohérentes avec les données publiées (MARTIN & GRAVOUEILLE, 2001). La variabilité expérimentale de la PI nuit cependant à son pouvoir discriminatoire si l'on évalue des variations ponctuelles. La PI semble donc être un indicateur valable de l'âge physiologique, mais elle est cependant moins adaptée que le PAI lorsqu'il s'agit d'évaluer finement des variations.

En ce qui concerne la modélisation des données, une démarche similaire à celle menée sur le PAI a été réalisée. Des interactions sont également présentes, mais uniquement entre l'année de récolte et la durée de stockage. Dans un souci de cohérence, nous avons décomposé l'AV3 de la même manière que celle utilisée pour le PAI. L'effet cv évalué en fixant systématiquement la durée de stockage et l'année de récolte (2004 ou 2006) est cohérent d'une année à l'autre sauf pour le point à 270 jours (très hautement significatif en 2004 et non significatif en 2006). Les deux premières durées de stockage ne permettent pas de mettre des différences en évidence. L'effet de l'année de récolte est, quant à lui, très dépendant de la durée de stockage et du cv. Quatre des six durées de stockage utilisées pour

Désirée ne permettent pas de mettre des différences en évidence alors que seule la différence observée à 30 jours de stockage est non significative pour Bintje.

La variabilité expérimentale intrinsèque pose également problème lors de la modélisation et peut mener à des incohérences (Tableau 5). Ainsi, alors que les différences observées entre cv. sont logiques si l'on compare les vitesses de vieillissement initiales en 2004 et en 2006, cette tendance s'inverse pour les valeurs finales de taux de vieillissement, Désirée vieillissant *in fine* plus vite que Bintje. Nous retrouvons cependant des valeurs très proches pour les années 2004 et 2005 du cv. Bintje, ce qui confirme les variations faibles observées entre ces deux années. Il est par contre impossible de distinguer au niveau statistique chacune des valeurs initiales et finales mesurées pour la période d'incubation.

	Caractéristiques	cv. Bintje	cv. Désirée
2004	Composante linéaire	Très hautement significative	Très hautement significative
	Composante quadratique	Très hautement significative	Non significative
	Composante cubique	Non significative	Hautement significative
	Modèle retenu	$PI = 177,398 - 0,69088 D + 0,0008026 D^2$ $R^2 = 88,3 \%$ $Sr = 14,7058$	$PI = 187,134 - 0,48320 D + 0,00000014 D^3$ $R^2 = 83,0 \%$ $Sr = 18,5030$
	dPI/dD à 0 jour	-0,69088 Jour Jour ⁻¹ à PI = 178 Jours	-0,48320 Jour Jour ⁻¹ à PI = 188 Jours
	dPI/dD à 270 jours	-0,25748 Jour Jour ⁻¹ à PI = 51 Jours	-0,45258 Jour Jour ⁻¹ à PI = 66 Jours
2005	Composante linéaire	Très hautement significative	
	Composante quadratique	Très hautement significative	
	Composante cubique	Non significative	
	Modèle retenu	$PI = 175,772 - 0,68729 D + 0,0008283 D^2$ $R^2 = 89,2 \%$ $Sr = 14,0028$	
	dPI/dD à 0 jour	-0,68729 Jour Jour ⁻¹ à PI = 173 Jours	
	dPI/dD à 270 jours	-0,24001 Jour Jour ⁻¹ à PI = 47 Jours	
2006	Composante linéaire	Très hautement significative	Très hautement significative
	Composante quadratique	Hautement significative	Significative
	Composante cubique	Non significative	Non significative
	Modèle retenu	$PI = 177,649 - 0,53411 D + 0,0004903 D^2$ $R^2 = 82,8 \%$ $Sr = 15,0850$	$PI = 166,576 - 0,15774 D - 0,0007268 D^2$ $R^2 = 66,3 \%$ $Sr = 23,5620$
	dPI/dD à 0 jour	-0,53411 Jour Jour ⁻¹ à PI = 166 Jours	-0,15774 Jour Jour ⁻¹ à PI = 170 Jours
	dPI/dD à 270 jours	-0,26935 Jour Jour ⁻¹ à PI = 68 Jours	-0,55021 Jour Jour ⁻¹ à PI = 71 Jours

Tableau 5. Modélisation par la méthode des polynômes orthogonaux de l'évolution de la PI au cours du vieillissement des tubercules récoltés en 2004 et 2005.

En conclusion, les résultats obtenus avec la période d'incubation sont globalement cohérents avec ceux obtenus à l'aide d'autres indicateurs (PAI, sensibilité à l'égermage). La période d'incubation se révèle cependant moins bien adaptée que le PAI afin de caractériser l'âge physiologique des tubercules. En effet, outre le fait que son usage soit moins intuitif (des valeurs de PI élevées correspondent à un âge physiologique peu avancé), la capacité de cet indicateur à distinguer les différences inter-annuelles ou inter-variétales est plus faible. Les évolutions observées au cours du stockage sont irrégulières, mais rendent cependant bien compte de l'influence de la durée de stockage.

3.1.3 Evolution de la durée de dormance

Une mesure de la durée de dormance après passage à 20°C a finalement été réalisée afin d'évaluer si les tubercules utilisés pour les analyses biochimiques étaient encore endodormants ou non (Figure 28).

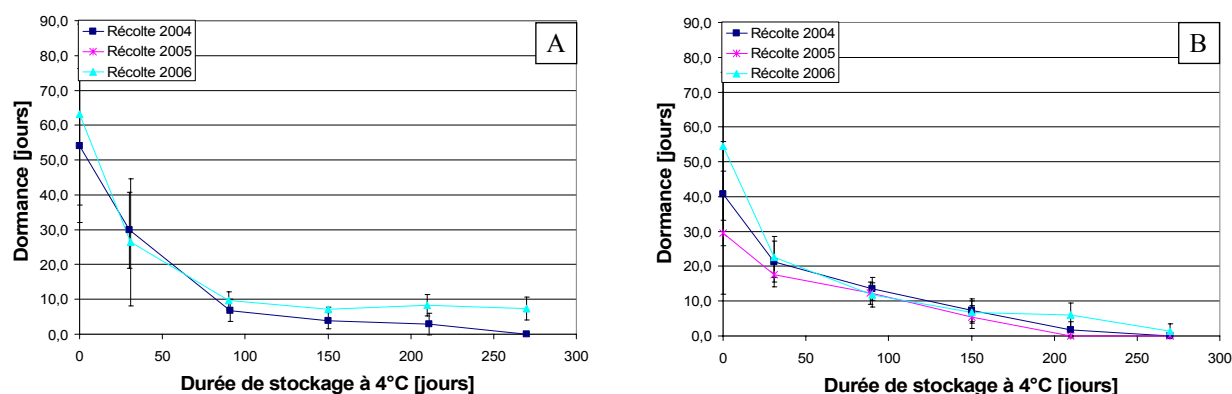


Figure 28. Evolution de la durée de dormance en fonction de la durée de stockage à 4°C des tubercules des cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004, 2005 et 2006. Les résultats présentés sont les moyennes des mesures effectuées sur 40 tubercules +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.2.3 de la section Matériel et Méthodes.

Nos résultats indiquent que les tubercules des deux premiers prélèvements (PAI inférieur à 0,3) sont encore dormants au moment de leur sortie de stockage à 4°C. Les autres prélèvements présentent une durée de dormance réduite liée au réchauffement des tubercules lors de leur passage à 20°C. Cette phase plancher est très marquée pour les deux récoltes du cv. Désirée ; elle est plus progressive pour chacune des récoltes du cv. Bintje. Les valeurs de dormance initiales présentent une forte hétérogénéité ne permettant pas de les distinguer significativement. Cependant, pour une même année de récolte, les valeurs observées pour Désirée sont sensiblement plus élevées que celles de Bintje, ce qui est cohérent avec les données publiées (Figure 7). Remarquons également que les valeurs de dormance mesurées pour la récolte 2006 des deux cv. sont cohérentes avec l'intervalle post-défanage et les valeurs de PAI. Pour chaque récolte, le dernier point de prélèvement caractérisé par des valeurs de PAI supérieures ou égales à 0,79 présente généralement des durées de dormance très faibles. Cette dernière observation nous indique que, dans nos conditions de stockage, une température de 4°C n'est pas suffisante pour empêcher la germination en fin de stockage. Ce paramètre devra être pris en compte dans l'interprétation des résultats biochimiques.

3.2 Evolution des paramètres liés à la levée

Les tubercules des cv. Bintje et Désirée récoltés en 2005 et en 2006 ont fait l'objet d'une caractérisation physiologique sur base des paramètres de germination (paragraphe 3.1). Parallèlement, différentes mesures liées à la levée ont également été effectuées afin d'identifier les valeurs de PAI critiques correspondant aux différents stades du vieillissement (Figure 6). Ces mesures permettront également de valider les mesures du PAI effectuées en 2006, en comparant les vitesses de vieillissement des deux cv. sur base de leur profil de levée.

3.2.1 Evolution du pourcentage de germination

Pour chaque prélèvement, le pourcentage de germination a été évalué durant 100 jours après plantation (Figure 29). Ce paramètre ne tient compte que des tubercules ayant effectivement levé au terme des 100 jours. Les plantes ne présentant pas de tiges ne sont pas comptabilisées car l'absence de levée après 100 jours est liée à des problèmes phytosanitaires et non physiologiques.

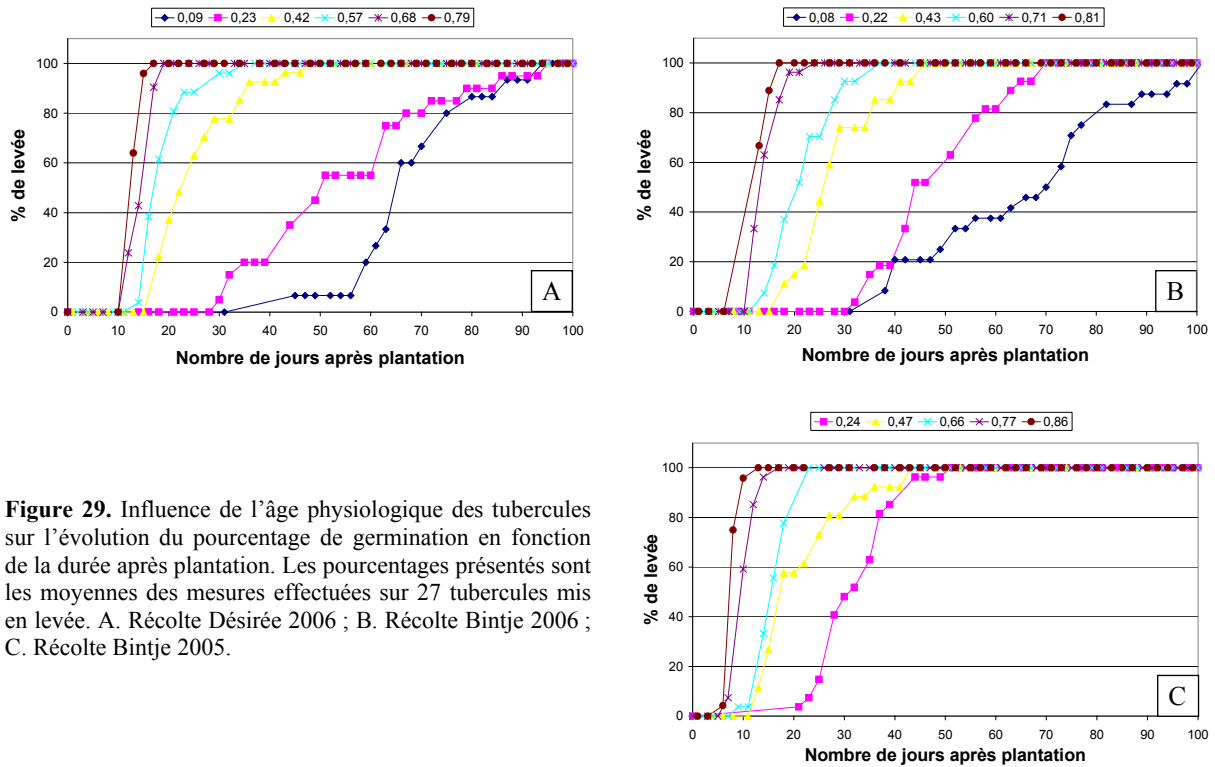


Figure 29. Influence de l'âge physiologique des tubercules sur l'évolution du pourcentage de germination en fonction de la durée après plantation. Les pourcentages présentés sont les moyennes des mesures effectuées sur 27 tubercules mis en levée. A. Récolte Désirée 2006 ; B. Récolte Bintje 2006 ; C. Récolte Bintje 2005.

Pour chaque cv., les courbes de levée présentent une allure sigmoïde typique à l'exception des prélèvements très jeunes (PAI < 0,2). Plus l'âge physiologique est avancé et plus la levée est rapide, les différences se marquant surtout entre les prélèvements jeunes (PAI < 0,4) et ceux plus âgés (PAI > 0,4). Le prélèvement le plus jeune présente une évolution différente de celle des autres prélèvements parce qu'il était encore dormant à la plantation (voir point 3.1.3).

3.2.2 Evolution du délai avant levée

Ce paramètre synthétise les données présentées au point 3.2.1. Pour la récolte 2006, les valeurs obtenues ne sont pas significativement différentes entre les deux cv. étudiés (Figure 30).

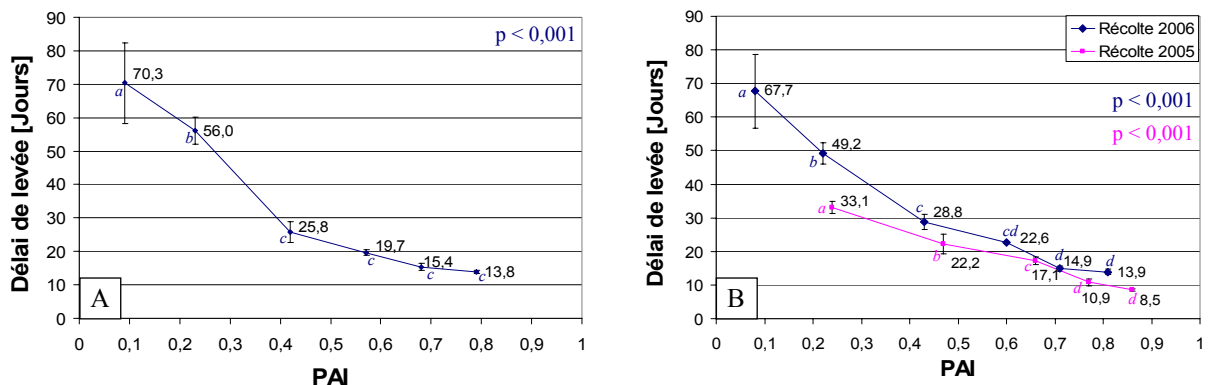


Figure 30. Evolution du délai de levée en fonction du PAI pour les cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2005 et 2006. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions indépendantes de 9 tubercules +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.2.3 de la section Matériel et Méthodes.

Une différence significative s'observe cependant entre les deux premiers prélèvements et les mesures subséquentes. La variabilité de la première mesure est

importante et traduit une sortie de dormance hétérogène entre les tubercules. Pour le cv. Bintje, les données de deux années de récolte ont pu être comparées sur un même graphique. Globalement, les tendances observées sont cohérentes avec les mesures de PAI, une valeur de PAI importante se traduisant par un délai de levée réduit. Un stade plateau est présent pour les valeurs de PAI supérieures à 0,4. Celui-ci est cependant plus marqué chez Désirée que chez Bintje.

3.2.3 Evolution du nombre de tiges produites

Une caractérisation complémentaire de la levée peut être obtenue en mesurant le nombre de tiges produites en fonction du PAI. Ce paramètre permettra d'identifier les valeurs de PAI correspondant aux stades « dormance », « dominance apicale » et « germes multiples ». L'optimum de plantation se caractérise par l'émergence de tiges multiples vigoureuses permettant une couverture rapide du sol (valeur de PI comprise entre 85 et 55 jours pour Désirée).

Une première mesure synthétique est présentée après 30 jours de levée à la Figure 31. Il s'agit d'une caractérisation relativement précoce de la levée qui tient compte de paramètres tels que la durée de dormance et la vigueur de croissance avant émergence. Les deux premiers prélèvements de 2006 (PAI < 0,25) correspondent à des stades physiologiques où la dormance prédomine. En 2005, le premier prélèvement Bintje (PAI = 0,24) présente un nombre de tiges après 30 jours de 0,5, ce qui correspond à un début de levée hétérogène. Les valeurs de PAI comprises entre 0,4 et 0,5 correspondent au stade de « dominance apicale ». La croissance de tiges multiples s'observe pour des valeurs de PAI supérieures à 0,55. On peut également remarquer un effet plateau correspondant au nombre de tiges maximal pouvant être produit pour le cv. Bintje, lorsque le PAI dépasse une valeur de 0,8. Les différences entre cv. s'observent principalement pour les valeurs de PAI supérieures à 0,7, Bintje produisant davantage de tiges que Désirée, ce qui est cohérent avec les valeurs de PAI mesurées. Pour la récolte 2006, l'âge physiologique des tubercules Désirée est en effet plus faible en fin de stockage que celui des tubercules Bintje. Ces résultats semblent donc indiquer que les deux cv. récoltés en 2006 atteignent des stades physiologiques similaires pour une même valeur de PAI.

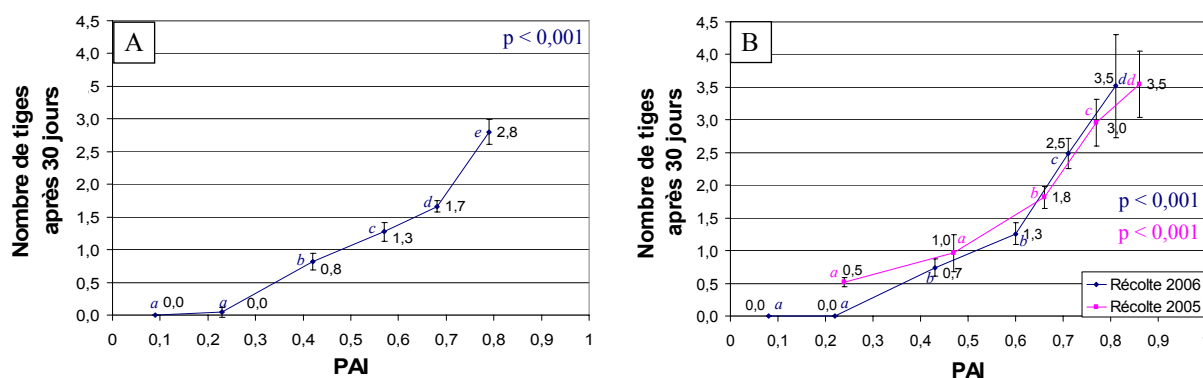


Figure 31. Evolution du nombre de tiges produites après 30 jours en fonction du PAI pour les cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2005 et 2006. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions indépendantes de 9 tubercules +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.2.3 de la section Matériel et Méthodes.

Une seconde mesure du nombre de tiges produites après 100 jours est présentée à la Figure 32. Ce paramètre ne permet pas de caractériser de façon dynamique la levée des tubercules, mais il est un bon indicateur du nombre de tiges maximal pouvant être produit pour chacun des PAI mesurés.

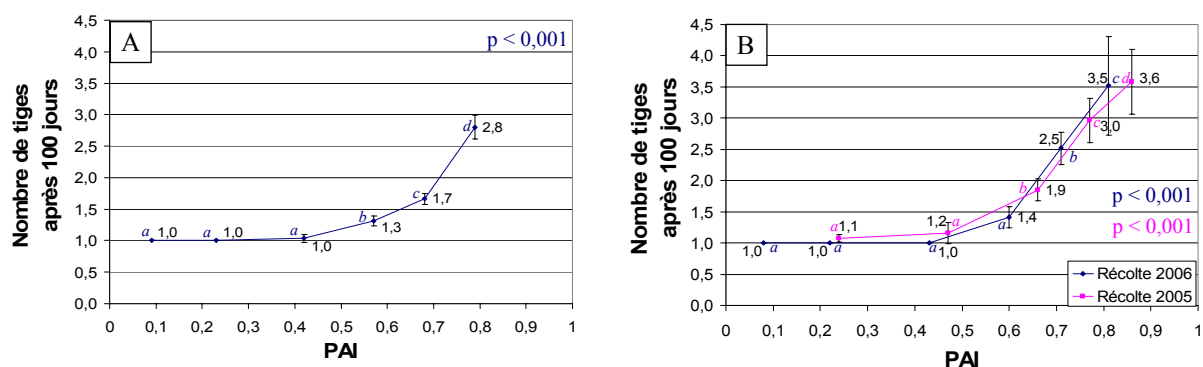


Figure 32. Evolution du nombre de tiges produites après 100 jours en fonction du PAI pour les cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2005 et 2006. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 répétitions indépendantes de 9 tubercules +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.2.3 de la section Matériel et Méthodes.

Les prélèvements correspondant à des valeurs de PAI inférieures à 0,45 présentent au maximum une tige. Ces stades se caractérisent donc par une dominance apicale marquée allant de pair avec une dormance de plus en plus faible (Figure 31). La levée de dominance apicale est observée pour des valeurs de PAI proches de 0,6 et se marque de façon plus intense chez Bintje que chez Désirée, lorsque le PAI dépasse une valeur de 0,7. De nouveau, un effet plateau est présent pour les valeurs de PAI supérieures à 0,8.

Une évaluation visuelle du phénotype produit par nos deux cv. d'intérêt en 2006 a finalement été réalisée après 30 jours de levée. Les résultats sont présentés aux Figures 33 et 34. Les plantes illustrées sont représentatives du comportement moyen observé au sein des trois répétitions. Les prélèvements réalisés à PAI = 0,8 présentent le nombre de tiges le plus élevé, mais également une vigueur de croissance plus faible se caractérisant par des tiges plus chétives. Ces données complètent ainsi les mesures présentées dans les figures précédentes et confirment l'existence d'un stade plateau pour les valeurs de PAI les plus importantes. Au terme de notre cinétique de vieillissement, les cv. étudiés ont donc atteint voire dépassé leur âge physiologique optimal.

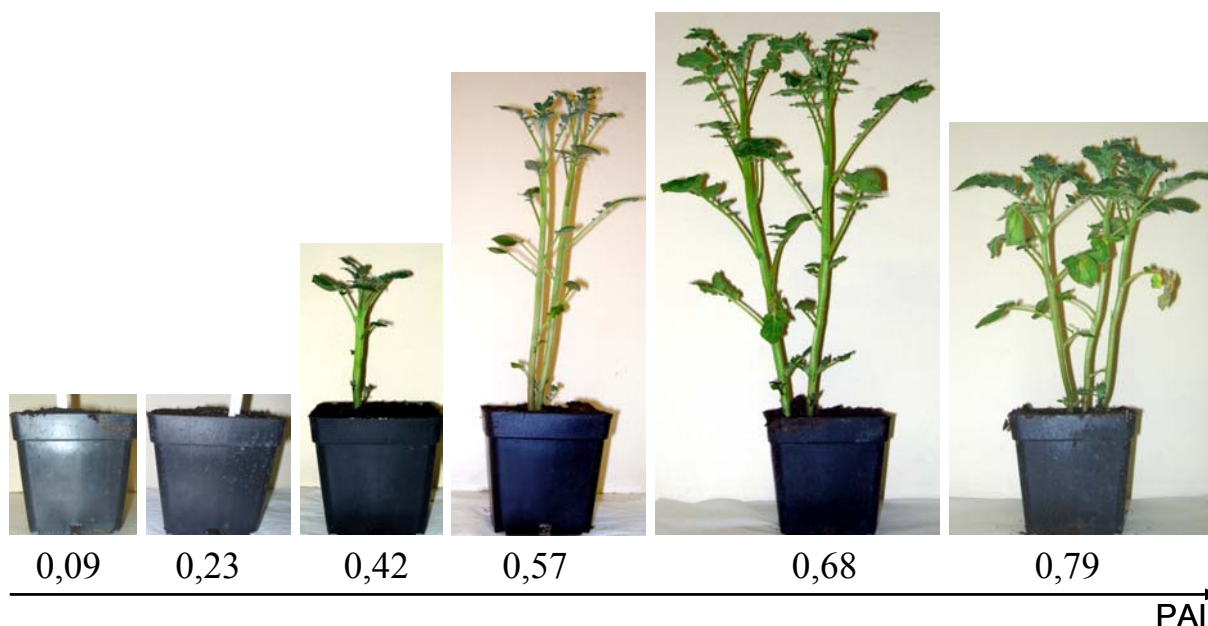


Figure 33. Evolution du phénotype de levée à 30 jours en fonction du PAI du cv. Désirée récolté en 2006.

L'ensemble des données obtenues permet donc d'identifier les valeurs de PAI critiques correspondant aux étapes-clefs du développement du tubercule. Une grande cohérence apparaît entre cv. et entre années de récolte. Ces données sont par ailleurs compatibles avec celles publiées par MARTIN & GRAVOUEILLE (2001).

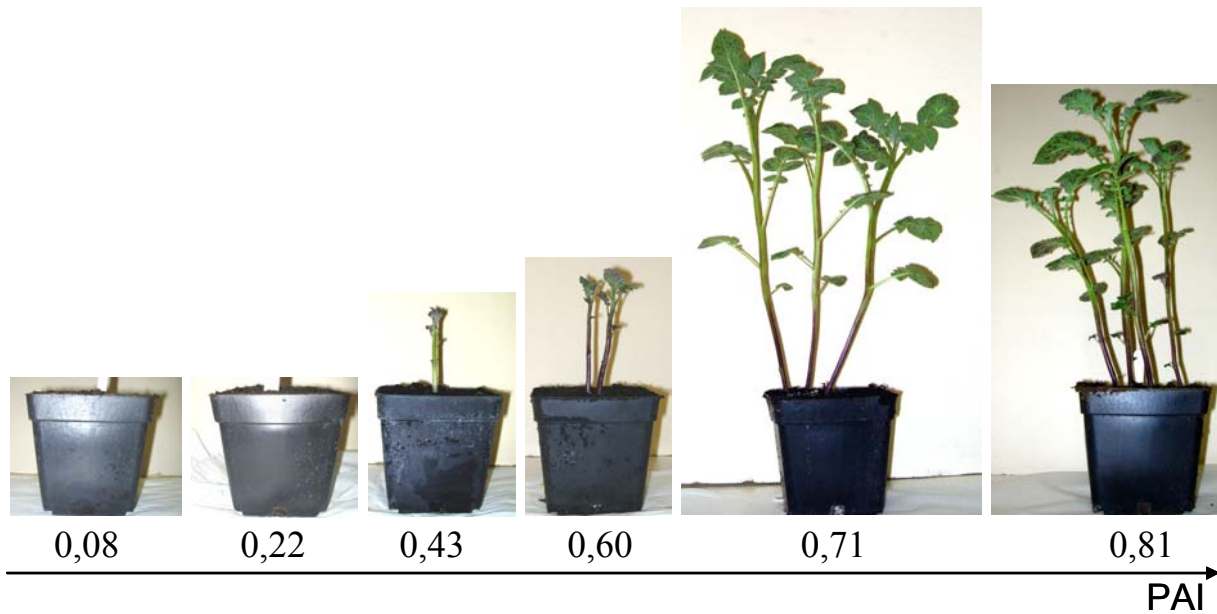


Figure 34. Evolution du phénotype de levée à 30 jours en fonction du PAI du cv. Bintje récolté en 2006.

4 CONCLUSION

Les objectifs principaux poursuivis au cours de ce chapitre étaient (1) d'établir un cadre de référence plus précis qu'une simple mesure de l'âge chronologique des tubercules, (2) de caractériser l'évolution de cet âge physiologique au cours du stockage à 4°C et (3) d'identifier les valeurs de PAI correspondant aux différents stades phénotypiques résultant de l'évolution de l'âge physiologique. Les paramètres importants de la levée et de la germination sont synthétisés dans le Tableau 6.

Cultivar	Valeurs de PAI		Stade physiologique	Durée de dormance
Désirée (2006)	0,09		Dominance apicale (1 tige produite)	63 jours
	0,23		Dominance apicale (1 tige produite)	26 jours
	0,42		Dominance apicale (1 tige produite)	10 jours
	0,57		Levée de dominance apicale (1,3 tiges produites)	7 jours
	0,68		Tiges multiples (1,7 tiges produites)	8 jours
	0,79		Tiges multiples (2,8 tiges produites)	7 jours
Bintje (2006 & 2005)	0,08-0,12		Dominance apicale (1 tige produite)	54 - 30 jours
	0,22-0,24		Dominance apicale (1-1,1 tige produite)	23 - 18 jours
	0,43-0,47		Dominance apicale (1-1,2 tige produite)	12 - 12 jours
	0,60-0,66		Levée de dominance apicale (1,4 -1,9 tiges produites)	7 - 5 jours
	0,71-0,77		Tiges multiples (2,5-3 tiges produites)	6 - 0 jours
	0,81-0,86		Tiges multiples (3,5-3,6 tiges produites)	1 - 0 jour

Tableau 6. Synthèse des principaux paramètres de levée et de germination en fonction du PAI des cv. Désirée et Bintje.

Après étude des mesures réalisées, il apparaît clairement que le PAI est un bon indicateur d'âge physiologique pouvant remplacer avantageusement la durée de stockage en abscisse des graphiques de l'étude biochimique du vieillissement. Son utilisation a été préférée à celle de la PI car ce dernier paramètre présente une variabilité plus grande et ne permet de mettre en évidence que des variations importantes d'âge physiologique. Son usage est par ailleurs moins intuitif, de grandes valeurs de PI correspondant à un âge physiologique jeune.

La durée de stockage utilisée permet l'observation de variations importantes de PAI, couvrant presque l'entièreté du processus de vieillissement défini dans un contexte agronomique. Les vitesses de vieillissement évoluent au fil du temps, les tubercules jeunes vieillissant plus vite que les tubercules plus âgés. Nos données nous indiquent également que les différences observées entre cv. sont variables d'une année à l'autre, mais que la vitesse moyenne de vieillissement des tubercules Désirée est systématiquement plus faible que celle des tubercules Bintje. Ce résultat est cohérent avec les données publiées par MARTIN & GRAVOUEILLE (2001). Ces auteurs ont en effet classé plusieurs dizaines de variétés sur base de leur sensibilité à l'égermage, paramètre indicateur de la vitesse de vieillissement. La variété Bintje produisant davantage de germes que Désirée pour un même âge physiologique en fin de vieillissement, il est donc logique qu'elle soit également plus sensible à l'égermage.

Finalement, en considérant que le PAI évolue de façon continue en fonction de la durée de stockage, il importait d'identifier les valeurs critiques correspondant aux différentes étapes de l'évolution des tubercules. Les données présentées dans le Tableau 6 permettront d'étudier les corrélations potentielles avec les mesures biochimiques présentées dans les chapitres 4 et 5.

CHAPITRE 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

1 INTRODUCTION

Dans le cadre de cette étude, deux méthodes d'extractions protéiques complémentaires ont été mises au point et comparées sur gels préparatifs (DELAPLACE *et al.*, 2006). Ce type de gel 2D se caractérise par un chargement protéique important (400 µg) et est plus sensible à la qualité de l'extraction qu'un gel analytique faiblement chargé (typiquement 150 µg en version multiplexée). La méthode d'extraction au SDS (sodium dodécylsulfate) chaud a ensuite été utilisée pour produire les échantillons destinés aux gels analytiques de type DIGE. Des gels préparatifs ont par ailleurs été obtenus en utilisant cette même méthode afin d'identifier les protéines majeures différentiellement exprimées au cours du vieillissement des tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel biologique

Les tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004 et stockés pendant 0, 30, 90, 150, 210 et 270 jours à 4°C ont été utilisés pour cette étude protéomique. Les paramètres agronomiques de cette récolte sont résumés dans le Tableau 2.

Chaque prélèvement se compose de 15 tubercules homogénéisés comme suit. Chaque tubercule est coupé transversalement en deux parties. Un cylindre de 17 mm de diamètre est prélevé dans chaque demi-tubercule à l'aide d'un emporte-pièce. Ces tronçons sont recoupés à partir de l'extrémité opposée à l'épiderme de façon à obtenir une masse de prélèvement de 10 grammes (poids frais, PF) par tubercule. Ils sont ensuite débités en rondelles qui sont immédiatement plongées dans de l'azote liquide puis finement broyées à l'aide d'un moulin (IKA type A10, Staufen, Allemagne). Les 30 échantillons de poudre sont groupés et stockés à -80°C après homogénéisation.

2.2 Préparation des extraits protéiques

2.2.1 Extraction au phénol (dérivée de HURKMAN & TANAKA, 1986)

Un gramme (PF) de poudre de tubercule est homogénéisé et incubé sur glace pendant 10 minutes (min) dans 4 ml de tampon d'extraction. Ce tampon contient du saccharose 0,7 M, du sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (Na₂EDTA : *ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt*) 50 mM, du KCl 0,1 M, de la thiourée 10 mM, du tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) 0,5 M à pH 7,5 ainsi que du phénylméthyl sulfonyl fluorure (PMSF) 2 mM et du dithiothréitol (DTT) 50 mM ajoutés séquentiellement. Après centrifugation pendant 15 min à 13000 g à 4 °C, le surnageant est extrait à température ambiante (RT : *room temperature*) sous agitation à 1800 révolutions par min (rpm) pendant 10 min avec 5 ml de phénol tamponné à pH 8,0. Après centrifugation pendant 10 min à 6000 g à RT, la phase phénolique supérieure est réextraite avec 5 ml de tampon d'extraction pendant 10 min à RT et centrifugée ensuite en utilisant les mêmes paramètres. Le tampon d'extraction est éliminé et les protéines contenues dans la phase phénolique sont précipitées

durant la nuit (O/N : *overnight*) à -20 °C grâce à 20 ml d'une solution méthanolique d'acétate d'ammonium 0,1 M. Après centrifugation pendant 20 min à 20000 g à 4 °C, la pelote protéique est lavée deux fois avec 4 ml d'une solution méthanolique froide d'acétate d'ammonium 0,1 M et une fois avec de l'acétone froide contenant du DTT 10 mM. La pelote lavée est séchée à l'air libre durant 30 min à RT et solubilisée ensuite à RT pendant 45 min dans 600 µl de tampon de réhydratation (composition modifiée de RABILLOUD *et al.*, 1999 et MECHIN *et al.*, 2003). Ce tampon contient de l'urée 5 M, de la thiourée 2 M, du 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthyl-ammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS) 2 % m/v, du 3-(4-heptyl)phenyl-3-hydroxy-propyl-diméthylammonio-propane sulfonate (C7BzO) 2 % m/v, du DTT 20 mM, et du tris(2-carboxyéthyl) phosphine hydrochlorure (TCEP-HCl) 5 mM. Les 600 µl de tampon de réhydratation sont ajoutés en une étape afin d'humecter correctement les parois internes du tube de 50 ml contenant la pelote protéique. Les extraits protéiques sont stockés à -80 °C.

2.2.2 *Extraction au SDS chaud (modifiée de Harrison & Black, 1982 et Colas des Francs et al., 1985)*

Un gramme (PF) de poudre de tubercules est homogénéisé 2 fois 45 secondes à 1800 rpm et incubé pendant 10 min dans 2 ml de tampon de lyse SDS (tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 7,0 contenant du SDS 4 % m/v, du saccharose 5 % m/v, de la poly(vinylpolypyrrolidone) [PVPP] 10 % m/v et du DTT 0,3 % m/v) préchauffé à 65 °C. L'homogénat est alors refroidi sur glace pendant 15 min avant centrifugation durant 15 min à 15000 g à 4 °C. Une extraction complémentaire (optionnelle) peut être réalisée sur le résidu avant les étapes suivantes. Le(s) surnageant(s) est/sont recentrifugé(s) en utilisant les mêmes paramètres avant précipitation O/N à l'aide de 8 ml d'acétone froid contenant du DTT 10 mM. Après centrifugation durant 20 min à 20000 g à 4 °C, la pelote protéique est lavée 2 fois dans de l'acétone froide contenant du DTT 10 mM. Elle est ensuite séchée à l'air libre pendant 30 min à RT et resolubilisée dans 300 µl de tampon de réhydratation pendant 45 min à RT. Les parois internes du tube sont alors rincées avec 200 µl de tampon de réhydratation frais durant 30 min. Ces deux fractions sont regroupées (volume total : 500 µl) avant stockage à -80 °C.

2.2.3 *Dosage des extraits*

Avant chaque utilisation, les échantillons protéiques stockés à -80 °C sont décongelés une heure à RT sous agitation (1000 rpm) avant centrifugation pendant 2 min à 11500 g à RT. La concentration en protéines totales des extraits est déterminée à l'aide du kit « RC/DC Protein Assay » de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Toutes les étapes s'effectuent à RT.

Quatre µl d'extrait protéique portés à 25 µl dans du tampon de réhydratation sont mélangés à 125 µl de réactif RC I avant incubation durant 1 min. Après ajout de 125 µl de réactif RC II, les tubes sont homogénéisés et centrifugés pendant 2 min à 18400 g. Le surnageant est alors éliminé et les tubes sont placés à l'envers sur du papier absorbant. Un second lavage est réalisé avec respectivement 125 et 40 µl de réactifs RC I et RC II. Les derniers résidus de liquide sont éliminés à l'aide d'une pointe de pipette capillaire avant ajout de 127 µl de solution stock (mélange 50:1 de réactifs DCA et DCS). Les tubes sont homogénéisés de façon répétée et incubés durant 10 min. Un ml de réactif DC B est finalement mélangé aux échantillons avant incubation pendant 15 min. L'absorbance est mesurée à 750 nm (cuvettes Kartel 1941 [VWR International, West Chester, Pennsylvanie, USA], 280-2500 nm) contre un blanco ne contenant pas de protéines et les concentrations sont calculées en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA : *Bovin Serum Albumin*) comme standard.

2.2.4 *Étape de lavage (Clean-up)*

Avant séparation sur gel 2D, les extraits protéiques sont lavés sur glace à l'aide du « 2-D Clean-Up Kit » de GE Healthcare (Little Chalfont, Royaume-Uni). Un volume correspondant à 250 µg de protéines est homogénéisé avec 300 µl de précipitant avant incubation sur glace pendant 15 min. Après ajout de 300 µl de co-précipitant, les échantillons sont homogénéisés et centrifugés pendant 5 min à 18400 g à 4 °C. Le surnageant est alors éliminé à l'aide d'une pointe de pipette capillaire et 40 µl de co-précipitant sont ajoutés avant incubation sur glace pendant 5 min. Les échantillons sont centrifugés pendant 5 min à 18400 g à 4°C et le surnageant est éliminé à l'aide de pointes de pipette capillaires. Les pelotes sont ensuite dispersées dans 25 µl d'H₂O milliQ. Un ml de « Wash Buffer » refroidi préalablement à -20°C et 5 µl de « Wash additive » sont alors ajoutés avant incubation O/N à -20 °C. Le lendemain, les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 18400 g à 4 °C et le surnageant est éliminé précautionneusement. Les pelotes sont séchées à l'air libre pendant 5 min avant solubilisation pendant une heure à RT dans 50 µl de tampon de marquage DIGE (tampon Tris 30 mM, pH 8,5 contenant de l'urée 7 M, de la thiourée 2 M et du CHAPS 4 % m/v). Les tubes sont finalement centrifugés pendant 5 min à 18400 g à RT et le surnageant est stocké à -80 °C.

2.2.5 *Marquage à l'aide de cyanines (application DIGE, Annexe 6)*

Le DIGE est une version multiplexée de la 2D-PAGE ne nécessitant pas de post-coloration. Une référence interne constituée d'un mélange équilibré des échantillons à analyser est présente sur chaque gel. Les cyanines (Cy) 3 et 5 sont utilisées pour marquer les résidus lysine des échantillons protéiques. La cyanine 2 est quant à elle utilisée pour le marquage de la référence interne. Après vérification de la valeur du pH de la référence (compris entre 8 et 9), 10 µl d'extrait protéique SDS lavé contenant 50 µg de protéines sont mélangés avec 1 µl de solution de travail contenant 0,4 nmol/µl de cyanine 2, 3 ou 5. Ce mélange est centrifugé brièvement et incubé sur glace pendant 30 min à l'obscurité. Un µl de solution de lysine 10 mM est alors ajouté pour arrêter le marquage. Après homogénéisation, les échantillons sont incubés 10 min sur glace à l'obscurité avant résolution sur gel 2D analytique.

2.3 **Résolution des protéines en SDS-PAGE**

La cuve XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) a été utilisée pour réaliser les séparations électrophorétiques en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Trente µg de protéines extraites au phénol ou au SDS chaud sont dilués dans du « LDS Sample Buffer » (Tris 141 mM, lithium dodécylsulfate [LDS] 2 % m/v, glycérol 10 % m/v, EDTA 0,51 mM, Serva Blue G250 0,22 mM, rouge de phénol 0,175 mM, pH 8,5) pour atteindre un volume final de chargement de 30 µl par puits. Les échantillons ainsi préparés sont chauffés à 70 °C pendant 10 min avant chargement sur gel précoulé à 12 puits (NuPAGE 80 x 80 x 1 mm [Invitrogen] Bis-Tris 4-12 % d'acrylamide). La migration s'effectue à 200 V pendant 50 min dans un tampon MOPS SDS (acide 3-(N-Morpholino)propanesulfonique [MOPS] 50 mM, Tris 50 mM, SDS 0,1 % m/v, EDTA 1 mM, pH 7,7). Après migration, les gels sont rincés 3 fois 5 min avec 100 ml d'H₂O, colorés pendant 60 min avec 30 ml de bleu de Coomassie (Simply Blue, Invitrogen) et lavés 2 fois (pendant 60 min et 12 heures) avec 100 ml d'H₂O.

2.4 Résolution des protéines en 2D-PAGE

2.4.1 Gels de mise au point 7cm

La focalisation isoélectrique (IEF : *Iso-Electric Focusing*) est réalisée en utilisant des bandelettes de 7 cm portant un gradient de pH immobilisé (IPG strips : *Immobilized pH Gradient strips*) linéaire compris entre 4 et 7 (IPG strips pH 4-7L, GE Healthcare). Les bandelettes sont réhydratées O/N avec 20 µg de protéines extraites au SDS ou au phénol. Les extraits protéiques sont dilués dans le tampon de réhydratation complétement avec 0,7 µl de tampon IPG pH 4-7 afin d'atteindre un volume final de réhydratation de 125 µl. L'IEF est ensuite effectuée sur l'IPGphor (GE Healthcare) en utilisant les paramètres suivants : 30 V durant 1h30, gradient jusqu'à 500 V en 1 h, gradient jusqu'à 4000 V en 1h30, gradient jusqu'à 5000 V en 30 min, 5000 V constants jusqu'à atteindre 12000 Vh. Avant la seconde dimension, les bandelettes sont équilibrées pendant 15 min dans 10 ml de solution d'équilibrage (tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,8 contenant de l'urée 6 M, du glycérol 30 % v/v et du SDS 2 % m/v) comprenant 1 % m/v de DTT (réduction des ponts disulfures). La seconde étape d'équilibrage permettant l'alkylation des ponts disulfures réduits est réalisée pendant 15 min dans 10 ml de la solution d'équilibrage contenant 2,5 % m/v d'iodoacétamide (IA). La séparation des protéines lors de la seconde dimension est réalisée dans la cuve XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen) en utilisant des gels « NuPAGE one-well » (1mm 12 % Bis-Tris). Après une étape de 30 min à 30 V total, la migration s'effectue pendant 50 min à 200 V total. Après la seconde dimension, chaque gel de 7 cm est lavé à l'eau milliQ avant fixation pendant 2 x 30 min sous légère agitation dans 100 ml de solution à 10 % v/v méthanol et 7 % v/v acide acétique. Une coloration au SYPRO-Ruby est alors réalisée en utilisant des volumes d'incubation de 100 ml par gel (voir point 2.6).

2.4.2 Gels analytiques DIGE

L'IEF est réalisée en utilisant des bandelettes IPG de 24 cm pH 4-7L, (GE Healthcare). Les bandelettes sont réhydratées O/N avec 3 x 50 µg de protéines totales (2 échantillons extraits au SDS marqués respectivement avec les Cy3 et Cy5 et une référence marquée avec la Cy2). Les extraits protéiques marqués sont dilués dans le tampon de réhydratation complétement avec 2,3 µl de tampon IPG pH 4-7 et 1,2 µl de tampon IPG pH 3-10 afin d'atteindre un volume final de réhydratation de 450 µl. L'IEF est ensuite effectuée sur l'IPGphor (GE Healthcare) en utilisant les paramètres suivants : 30 V durant 1 h, 300 V durant 3 h, gradient jusqu'à 1000 V en 6 h, gradient jusqu'à 8000 V en 3 h, 8000 V constants jusqu'à atteindre 100000 Vh. Avant la seconde dimension, les bandelettes sont équilibrées pendant 15 min dans 10 ml de solution d'équilibrage (voir point 2.5.1) comprenant 1 % m/v de DTT (réduction des ponts disulfures). La seconde étape d'équilibrage permettant l'alkylation des ponts disulfures réduits est réalisée pendant 15 min dans 10 ml de la solution d'équilibrage contenant 2,5 % m/v d'IA. La séparation des protéines lors de la seconde dimension est réalisée dans la cuve Hoefer DALT (GE Healthcare) en utilisant des gels SDS de 1 mm d'épaisseur contenant 11 % de polyacrylamide. Après une étape de 1h30 à 30 V total, la migration s'effectue O/N à 100 V total. L'acrylamide Protogel provient de chez Gentaur (Bruxelles, Belgique). Après migration, les gels sont sortis des cassettes en verre et fixés O/N dans une solution à 40 % v/v d'éthanol et 10 % d'acide acétique. Ils sont ensuite stockés dans des chemises plastiques hermétiques contenant une solution à 10 % d'éthanol et 7,5 % d'acide acétique.

2.4.3 Gels préparatifs

Les bandelettes IPG pH 4-7L sont réhydratées O/N avec 400 µg de protéines totales non marquées et diluées dans le tampon de réhydratation complétement avec 2,3 µl de tampon

IPG pH 4-7 et 1,2 μ l de tampon IPG pH 3-10 afin d'atteindre un volume final de 450 μ l. Après réhydratation, l'IEF et l'équilibrage sont réalisés selon le protocole décrit pour les gels analytiques. La séparation des protéines lors de la seconde dimension est réalisée sur l'Ettan DALTsix (GE Healthcare) en utilisant des gels SDS de 1 mm d'épaisseur contenant 11 ou 12,5 % de polyacrylamide. Après une étape de 1 h à 2 W/gel, la migration s'effectue pendant 3h30 à 100 W total. L'acrylamide provient de chez Bio-Rad. Après la seconde dimension, chaque gel préparatif est lavé à l'eau milliQ avant fixation pendant 2 x 30 min sous légère agitation dans 200 ml de solution à 10 % v/v méthanol et 7 % v/v acide acétique.

Pour chaque méthode d'extraction développée, 3 gels issus d'extractions indépendantes ont été réalisés sans étape de lavage (« clean-up ») préalable. Pour chaque extrême de la cinétique analytique de vieillissement (prélèvements à 0 et 270 jours), 4 gels préparatifs ont été obtenus au départ d'extraits SDS lavés. Ils ont été colorés au SYPRO Ruby avant découpe manuelle.

2.5 Post-coloration au SYPRO-Ruby

Les gels préparatifs sont colorés individuellement avec 200 ml de colorant fluorescent SYPRO Ruby (Bio-Rad) O/N, à l'obscurité sous légère agitation. Les gels sont ensuite lavés pendant 2 x 30 min dans 200 ml de solution à 10 % v/v méthanol et 7 % v/v acide acétique avant rinçage à l'eau milliQ. Le même protocole est utilisé pour colorer les gels de mise au point de 7 cm en utilisant des volumes d'incubation de 100 ml.

2.6 Numérisation des gels et analyse par logiciel

2.6.1 Gels SDS-PAGE

Après migration et coloration au bleu de Coomassie, les gels sont numérisés à l'aide de l'Image Scanner (GE Healthcare). Les paramètres utilisés sont les suivants : travail en transmission, source rouge, image 16 bits et résolution à 300 dpi.

2.6.2 Gels 2D analytiques (Annexe 6)

Les gels analytiques sont scannés sur le Typhoon Variable Mode Imager Trio (GE Healthcare) en mode Platen en utilisant des longueurs d'onde d'excitation et des filtres d'émission adaptés à chacune des trois cyanines. Le tube photomultiplicateur a été ajusté selon les recommandations du constructeur. Les images des gels ont été analysées dans le logiciel DeCyder v5.0 à l'aide des modules Batch Processor, Differential In-gel Analysis (DIA) et Biological Variation Analysis (BVA). Pour chaque point de la cinétique de vieillissement, au moins deux images de gels issus d'extractions indépendantes ont été utilisées pour une analyse de la variance à un critère de classification.

2.6.3 Gels 2D de mise au point 7cm et gels 2D préparatifs

Les gels sont scannés sur le Typhoon 9200 (GE Healthcare) en utilisant une longueur d'onde (λ) d'excitation de 532 nm et un filtre d'émission à 610 nm.

Pour chaque méthode d'extraction développée, 3 gels préparatifs issus d'extractions indépendantes ont été analysés à l'aide du logiciel Progenesis PG220 v2006 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Royaume-Uni). La détection des spots protéiques a été réalisée automatiquement. Une édition manuelle minimale des résultats a permis d'éliminer les erreurs liées à la détection automatique dues par exemple à de légères traînées (*streaking*), aux effets de bord ou aux microprécipitations (*speckles*) inhérentes à la coloration au SYPRO.

2.7 Découpe manuelle et digestion tryptique (BOHLER *et al.*, 2007)

Les gels ont été découpés manuellement en salle dédiée sur un transilluminateur UV à l'aide d'un poinçon de 2 mm de diamètre. Au préalable, 43 spots d'intérêt avaient été sélectionnés sur base de leur profil d'expression et de leur intensité. Deux prélèvements étaient également prévus pour la découpe manuelle afin d'évaluer le bruit de fond du gel. Les cylindres prélevés dans les gels sont stockés à -20 °C dans une plaque multipuits contenant 50 µl d'eau milliQ par puits.

Les spots excisés sont digérés à l'aide de l'Ettan Spot Handling Workstation (GE Healthcare). Les cylindres de gel sont lavés 20 min à RT dans 100 µl de NH₄HCO₃ 50 mM dissout dans du méthanol 50 % v/v avant élimination du surnageant. Les fragments de gel sont ensuite déshydratés 2 x 20 min à RT dans 80 µl d'acétonitrile (ACN) 75 % v/v. Après séchage à 40 °C pendant 20 min, ils sont incubés pendant 6 h en présence de 20 ng de trypsine Gold (Promega, Madison, WI, USA). Les peptides tryptiques sont alors extraits des fragments de gel pendant 2 x 20 min à RT à l'aide respectivement de 50 et 35 µl d'ACN 50 % v/v contenant 0,1 % v/v d'acide trifluoroacétique (TFA : *TrifluoroAcetic Acid*). La plaque multipuits contenant les peptides tryptiques est ensuite séchée par évaporation pendant 90 min avant resolubilisation des peptides dans 2 µl d'ACN 50 % v/v contenant 0,1 % de TFA. Pour les identifications protéiques, 0,7 ou 1 µl de cette solution sont déposés sur la cible du spectromètre de masse et homogénéisés avec 0,7 µl de matrice (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique 7 mg/ml dans de l'ACN 50 % v/v contenant 0,1 % de TFA).

2.8 Identifications protéiques (cf. Annexe 5)

Les mélanges de peptides tryptiques de chaque protéine sont analysés par spectrométrie de masse en tandem de type MALDI-TOF-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Time Of Flight*). Les cartes peptidiques (PMF : *Peptide Mass Fingerprints*) et les spectres de fragmentation des peptides de chaque échantillon obtenus à l'aide du 4800 Proteomic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sont soumis pour identification en base de donnée à l'aide de l'interface MASCOT (MASCOT 2.2, Matrix Science, Londres, Royaume-Uni) intégré à la suite logicielle GPS Explorer (Applied Biosystems). Une combinaison de recherches dans les bases de données NCBI et EST potato (générée avec les EST de pomme de terre disponibles au NCBI) a été réalisée en utilisant les paramètres suivants :

- variabilité sur pics en PMF: 100 ppm et en MS-MS: 0,3 Da (plus en manuel)
- modifications imposées: carbamidométhylation (C) et oxydation (M)
- modifications possibles: kynurénine (W) et double oxydation (W)

Les résultats de recherche sont évalués sur base des scores peptidiques.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Comparaison des deux méthodes d'extraction mises au point

Cette mise au point a fait l'objet de deux publications (DELAPLACE *et al.*, 2005 & 2006). Le choix d'un protocole de préparation des échantillons est un facteur critique qui influence l'IEF ainsi que la qualité des profils protéiques observés sur gel. Cet impact est encore accentué pour les tissus végétaux du fait des caractéristiques inhérentes à cette matrice : faible contenu protéique, nombreux composés interférant tels que les composés phénoliques, les pigments, les enzymes protéolytiques et oxydatives et les hydrates de carbone (amidon).

Les premières recherches utilisant des méthodes d'extraction protéiques compatibles avec la 2D-PAGE sur tubercule de pomme de terre étaient basées soit sur une extraction dénaturante dans un tampon de lyse sans précipitation (ESPEN *et al.*, 1999) ou soit sur des techniques de précipitation au TCA/acétone (DESIRE *et al.*, 1995). Cette étape de précipitation est considérée à l'heure actuelle comme une nécessité absolue lorsque l'on travaille avec des tissus récalcitrants, afin d'obtenir des profils d'expression protéique 2D de haute qualité (CARPENTIER *et al.*, 2005). Des études récentes (DAMERVAL *et al.*, 1986 ; KOISTINEN *et al.*, 2002 ; SARAVANAN & ROSE, 2004 ; CARPENTIER *et al.*, 2005 ; LEHESRANTA *et al.*, 2005) visant à évaluer plusieurs protocoles d'extraction basés sur une précipitation au TCA/acétone ou sur l'utilisation d'une phase phénolique ont montré que ces deux techniques étaient utiles comme méthodes standards. La méthode d'extraction au phénol se caractérise par des rendements protéiques plus élevés et des gels de meilleure qualité, particulièrement pour des tissus contenant de grandes quantités de polysaccharides (CARPENTIER *et al.*, 2005 ; DAMERVAL *ET AL.*, 1986 ; SARAVANAN & ROSE, 2004).

Une méthode d'extraction au phénol basée sur le protocole de HURKMAN & TANAKA (1986) a été comparée à un protocole utilisant un tampon de lyse SDS chaud (Figure 35) développé au Plant Research International (Wageningen, Pays-Bas).

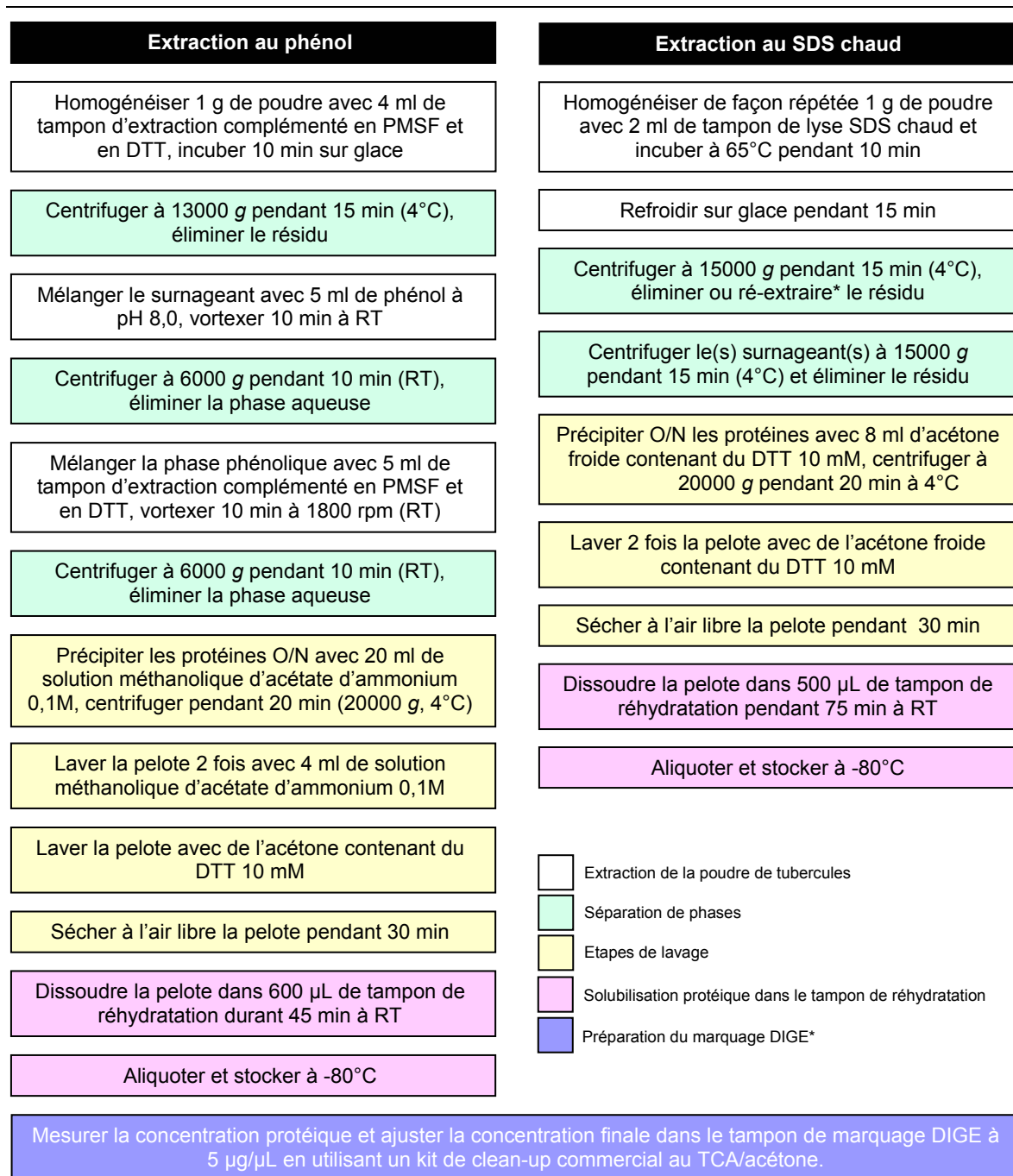


Figure 35. Comparaison des méthodes d'extraction au phénol et au SDS chaud. L'astérisque (*) indique une étape optionnelle. Le tampon de marquage DIGE contient de l'urée 7M, de la thiourée 2M, du CHAPS 4 % m/v et du Tris 30 mM pH 8,5 (DELAPLACE *et al.*, 2006).

La méthode d'extraction au phénol possède un rendement de 4,7 +/- 1,2 µg de protéines / gPF (moyenne de 3 répétitions +/- écart-type). L'extraction au SDS simple ne permet d'extraire que 2,5 +/- 0,4 µg de protéines / gPF, mais elle atteint des rendements comparables en utilisant l'étape d'extraction additionnelle marquée d'un astérisque dans la Figure 35 (4,3 +/- 0,7 µg de protéines / gPF). Cette étape d'extraction additionnelle peut être considérée comme facultative étant donné qu'aucune modification significative du profil protéique n'a été observée en SDS-PAGE ou en 2D-PAGE sur gels de 7 cm en utilisant une ou deux étapes d'extraction SDS (Figure 36).

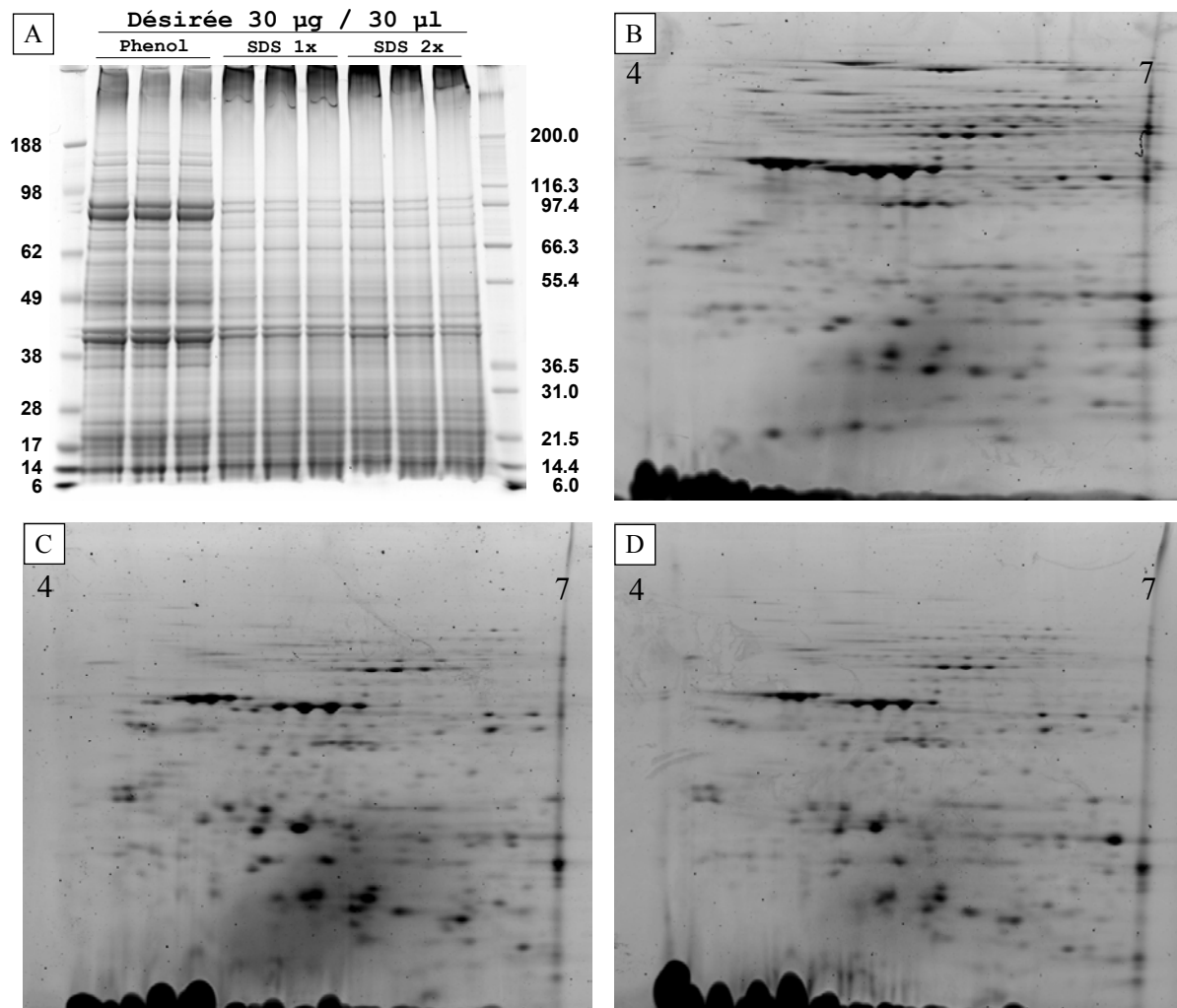


Figure 36. Comparaison des méthodes d'extraction au phénol et au SDS chaud en SDS-PAGE (A). Comparaison des profils protéiques obtenus sur gels 2D de mise au point de 7cm en utilisant les méthodes d'extraction au phénol (B) ou au SDS chaud avec une (C) ou deux étapes (D) d'extraction.

Les conditions expérimentales utilisées pour comparer les méthodes d'extraction sont caractéristiques de gels semi-préparatifs (chargement de 400 µg de protéines). L'intervalle de points isoélectriques (pI) utilisé permet une bonne résolution horizontale étant donné que la plupart des protéines extraites sont neutres à acides (CARPENTIER *et al.*, 2005 ; LEHESRANTA *et al.*, 2005). Le nombre de spots total résolu au départ des extraits au phénol ou au SDS est respectivement de 1572 +/- 124 et 1482 +/- 109 (moyenne de 3 répétitions indépendantes +/- écart-type, Figure 37). Cette différence n'est pas significative (test t de Student utilisant une valeur de $\alpha = 0,05$). Le nombre de spots communs aux deux méthodes d'extraction tels que la patatine est faible et représente seulement un faible pourcentage du nombre total (environ 2 %). En ce qui concerne les poids moléculaires (MW : *molecular weight*) des protéines résolues, les extraits au phénol présentent davantage de protéines de MW supérieur à 40 kDa (955 +/- 86, 60,8 % du nombre total de protéines résolues) que les extraits SDS (501 +/- 92, 33,8 % du nombre total de protéines résolues). Cette évaluation se base sur la position des isoformes de patatine (P15478, MW 42 KDa, LEHESRANTA *et al.*, 2005) sur les gels (Figure 37). *A contrario*, le nombre de protéines de bas poids moléculaire (inférieur à 40 KDa) est plus important dans les extraits SDS (981 +/- 74, 66,2 % du nombre de protéines totales) que dans les extraits au phénol (617 +/- 54, 39,2 % du nombre total). Il est peu probable que cette

différence soit causée par une protéolyse accrue dans les extraits SDS car les protéases extraites au SDS sont supposées être inactivées de façon irréversible (HARRISON & BLACK, 1982 ; COLAS DES FRANCS, 1985). Des polysaccharides résiduels présents dans les extraits SDS pourraient par contre réduire la taille des pores du gel et favoriser ainsi l'entrée des protéines de bas poids moléculaire dans le gel.

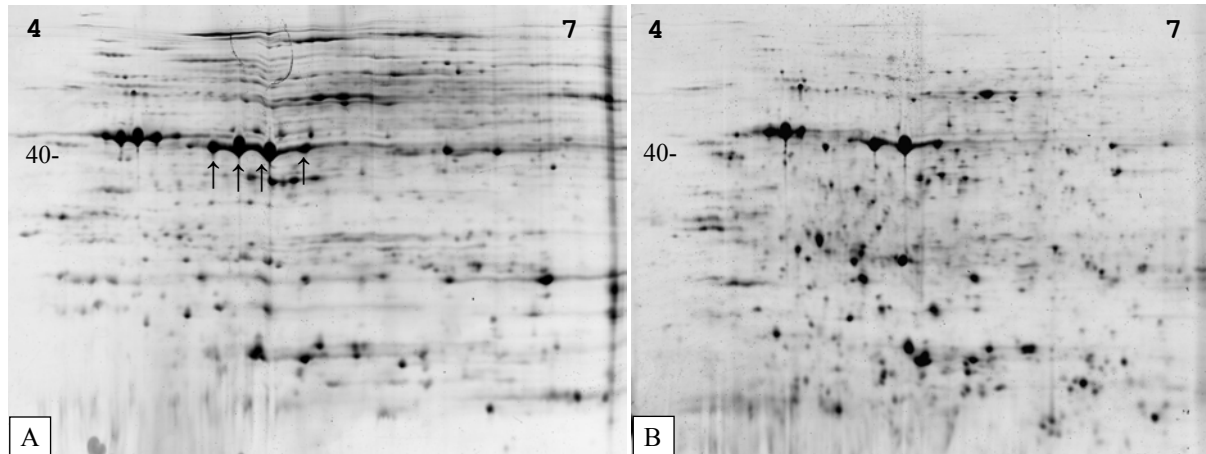


Figure 37. Evaluation des méthodes d'extraction au phénol (A) et au SDS chaud (B). Les nombres totaux de spots sont respectivement de 1572 \pm 124 et 1482 \pm 109 (moyennes de 3 répétitions indépendantes \pm écart-type). Les flèches indiquent les isoformes de la patatine identifiées par Lehesranta *et al.* (2005). La résolution protéique a été effectuée sur des strips de 24 cm (pI 4-7, DELAPLACE *et al.*, 2006).

En ce qui concerne la qualité générale des gels, les extraits phénoliques présentent des stries horizontales (*streaking*) plus marquées qu'avec les extraits SDS. Cette caractéristique n'a pas été mise en évidence dans les publications récentes portant sur la 2D-PAGE des protéines de feuilles ou de tubercules de pomme de terre extraites au phénol (CARPENTIER *et al.*, 2005 ; LEHESRANTA *et al.*, 2005). Cependant, dans ces études, la quantité de protéines chargée sur les gels est typiquement plus faible (entre 40 et 300 μ g de protéines totales par gel) que celle utilisée lors de notre mise au point (400 μ g). Ce *streaking* accentué peut être dû à une sous- ou une sur- focalisation des extraits (au-delà de 100000 Vh) lors de l'IEF, à une surcharge protéique des gels, à des problèmes liés à la préparation des extraits, à une mauvaise solubilisation protéique ou à un flux endosmotique (BERKELMAN & STENSTEDT, 1998). Ce problème se retrouve également sur les gels de mise au point de 7 cm où un total de 12000 Vh a été utilisé lors de l'IEF (Figure 36). Même si nous ne pouvons pas totalement exclure un problème de surfocalisation, il semble que la cause principale de ce « *streaking* » soit inhérente à la méthode d'extraction utilisée. Dans nos conditions préparatives, les extraits SDS peuvent donc être considérés comme davantage compatibles avec des charges protéiques élevées. Cette caractéristique peut améliorer la transition entre les gels analytiques et préparatifs, facilitant ainsi l'identification en spectrométrie de masse.

En conclusion, nous avons développé et comparé deux méthodes d'extraction complémentaires en ce qui concerne les MW des protéines extraites. La méthode d'extraction au SDS permet des chargements protéiques plus importants et est plus aisée à réaliser (elle nécessite moins d'étapes d'extraction et de lavage). Cette caractéristique pourrait donc améliorer la reproductibilité entre extractions indépendantes. L'utilisation du détergent anionique SDS pourrait également favoriser la solubilisation des protéines membranaires ainsi que de celles associées aux grains d'amidon (GÖRG *et al.*, 2004 ; SONG *et al.*, 2006). La caractérisation détaillée des protéines préférentiellement extraites par chacune des méthodes est cependant complexe (Carpentier *et al.*, 2005) et reste encore à évaluer.

3.2 Caractérisation par 2D-DIGE de l'évolution du protéome au cours du vieillissement

L'évolution du protéome du cv. Désirée a été étudiée au cours du vieillissement des tubercules récoltés en 2004. Les protéines ont été extraites à l'aide d'un tampon de lyse SDS chaud comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Une version multiplexée de la 2D-PAGE a été utilisée au centre *Plant Research International* (Wageningen, Pays-Bas) afin de réduire les variations expérimentales en utilisant une référence interne commune à chaque gel analytique. Pour chaque point de la cinétique de vieillissement au moins deux images valorisables de gels issus d'extractions indépendantes ont été obtenues (Figure 38).

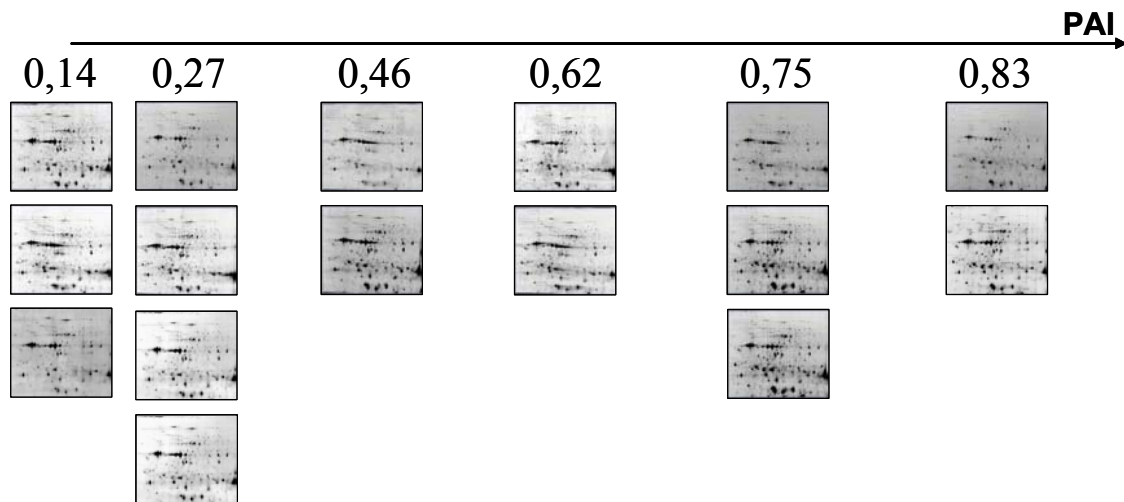


Figure 38. Diagramme des gels utilisés pour évaluer l'évolution du protéome de Désirée (récolte 2004) au cours du vieillissement.

Après numérisation, les 24 images obtenues (16 échantillons + 8 références) ont fait l'objet d'une analyse dans le logiciel DeCyder à l'aide des modules Batch Processor, DIA et BVA (pour une description détaillée, voir Annexe 6). Quarante repères (*landmarks*) manuels ont été positionnés sur chaque image de référence colorée à l'aide de la cyanine 2 afin d'améliorer les correspondances (*matching*) entre gels. L'ensemble des données obtenues a alors fait l'objet d'une analyse de la variance (AV) à un critère de classification. Un exemple de résultat obtenu est repris aux Figures 38 et 39. Ce spot numéro 1460 correspondant à la catalase voit son abondance augmenter 2,20 fois au cours du vieillissement. La valeur de p de l'AV est de 0,00042. En plus de ces données quantitatives, le logiciel nous permet de visualiser en trois dimensions chacun des points de la cinétique d'expression protéique. Comme pour chacune des protéines différemment exprimées, une vérification manuelle des correspondances inter-gels a été réalisée point par point.

Une protéine est considérée comme différemment exprimée au cours du vieillissement (variation de PAI allant de 0,14 à 0,83) lorsque les critères suivants sont simultanément vérifiés pour le spot qui lui correspond :

- p de l'AV $\leq 0,05$
- rapport des abondances des extrêmes de la cinétique $\geq |1,5|$
- p du test t de Student d'égalité des moyennes des extrêmes de la cinétique $\leq 0,05$ (protéines strictement sur- ou sous-régulées) ou $> 0,05$ (présence d'un maximum ou d'un minimum transitoire au cours de la cinétique)
- spot présent sur au moins 7 des 8 gels analysés

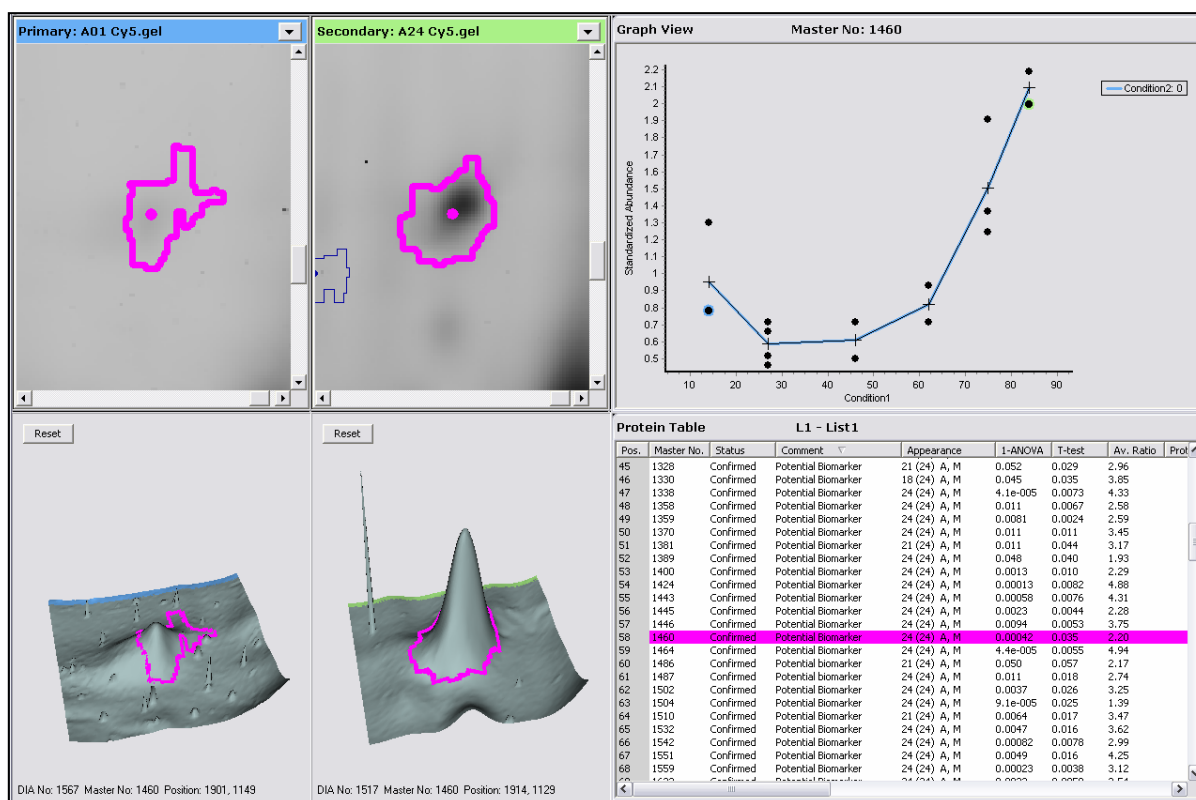


Figure 39. Exemple de présentation de résultats issus du logiciel DeCyder (module BVA). Les agrandissements des gels correspondent respectivement aux points du graphique entourés en bleu et en vert. La protéine analysée a été identifiée ultérieurement comme étant la catalase (voir Tableau 7).

En appliquant ces critères, 52 et 41 spots sont respectivement sur- ou sous- régulés au cours du vieillissement alors que quatre autres présentent un maximum transitoire au niveau de leur courbe d'abondance.

Après l'analyse des profils d'expression des abondances protéiques, l'identification des protéines d'intérêt a été réalisée à l'aide d'un MALDI-TOF-TOF au *Centre de Recherche Public Gabriel Lippmann* (Belvaux, Luxembourg). Au préalable, 43 spots (33 spots sur-régulés, 9 spots sous-régulés et 1 spot avec maximum transitoire) et avaient été excisés manuellement sur gels préparatifs chargés avec 400 µg de protéines totales extraites des extrêmes de la cinétique et colorées au SYPRO Ruby. Les critères du choix des spots utilisés pour l'identification en MS/MS sont principalement la qualité du profil d'expression (valeur de p) et l'intensité du spot afin de permettre une bonne visualisation sur le transilluminateur UV. Le nombre de spots excisés est également limité du fait de la décoloration progressive inhérente au SYPRO Ruby qui réduit le temps de découpe à environ 30 min.

En plus de ces 43 spots d'intérêt, 3 spots additionnels (spots 46, 47 et 48) ont été utilisés pour la mise au point MS et 2 spots (44 et 45) ont servi à évaluer le bruit de fond du gel. La position des différents spots utilisés est présentée à la Figure 40. Sur les 43 spots excisés, 31 ont été identifiés avec succès (72 %). Pour chaque protéine identifiée, entre 2 et 5 peptides ayant fait l'objet d'une fragmentation en mode TOF/TOF seront présentés (THIELLEMENT *et al.*, 2007). Ces résultats sont détaillés dans les sous-chapitres suivants.

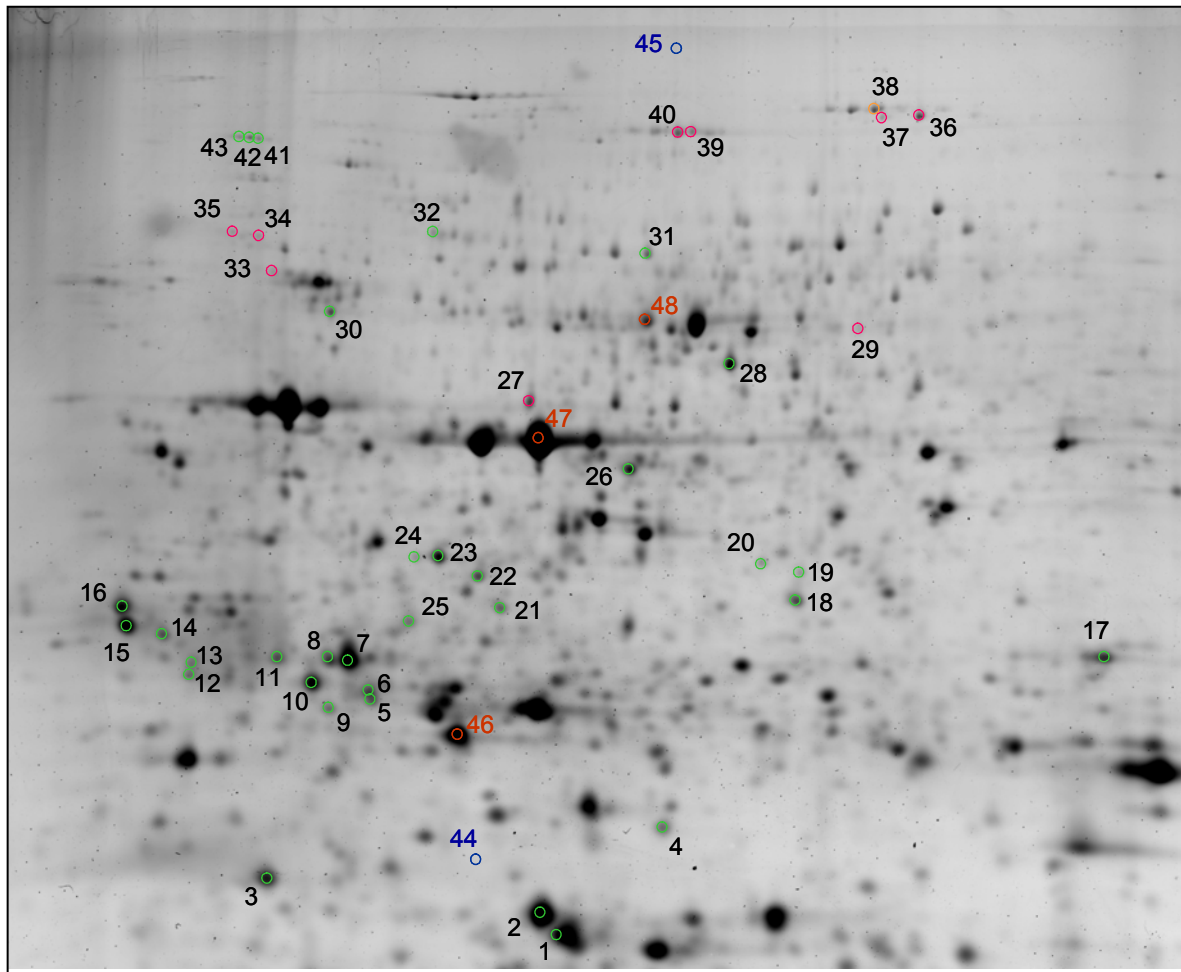


Figure 40. Carte des spots découpés manuellement sur les gels préparatifs afin d'être analysés en MS/MS. Le gel a été chargé avec 400 µg de protéines totales et a subi une post-coloration au Sypro Ruby. Un matching manuel a été réalisé avec les gels analytiques afin de localiser les spots différentiellement exprimés. Les spots numérotés de 1 à 43 et entourés en vert, rouge ou orange sont respectivement sur-, sous- régulés ou passent par un maximum d'abondance transitoire. Les spots 46, 47 et 48 ont servi à la mise au point des identifications en MS/MS. Les positions 44 et 45 ne correspondent pas à des protéines et permettent d'évaluer le bruit de fond du gel.

3.2.1 Protéines sur-exprimées au cours du vieillissement

3.2.1.1 Identifications en MS-MS (Tableaux 7 et 8)

D'une manière générale, les valeurs E associées aux identifications protéiques sont faibles et permettent donc de considérer les identifications comme fiables. Cette mesure est complétée à l'aide des scores peptidiques. Ces derniers sont élevés et généralement situés au-delà des seuils d'homologie, voire d'identité.

Parmi les 24 protéines surexprimées identifiées en spectrométrie de masse, 14 possèdent des séquences communes avec des accessions de patatine (spots 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 21, 22 et 23). Leur poids moléculaire est cependant nettement inférieur à celui des isoformes de la patatine intacte (environ 42 KDa). La patatine étant une glycoprotéine de stockage consommée au cours du vieillissement du tubercule de pomme terre (BRIERLEY *et al.*, 1997), nous avons donc été amenés à considérer ces identifications comme des produits de dégradation de celle-ci.

Les dix autres protéines identifiées sont majoritairement impliquées (1) dans le catabolisme du carbone lié à la glycolyse (α -glucane phosphorylase, phosphoglycérate

mutase et émolase), (2) dans des réponses à des stress (glyoxalase I, petite protéine de choc thermique 1A cytosolique, catalase) et (3) dans le recyclage protéique (sous-unité E du protéasome 20S). L'accession LOX identifiée ne correspond pas à son MW attendu compris entre 97 et 103 KDa (ROYO *et al.*, 1996). L'étude des protéines sous-exprimées au cours du vieillissement (point 3.2.2) nous a permis de préciser cette identification comme étant un produit de dégradation de l'enzyme.

Chapitre 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Protéines surexprimées au cours du vieillissement identifiées en MS/MS									
Spot	Protéine	Organisme Accession Gi	Pept.	Mr expérim.	Mr calculée	Δ de masse	Séquences	Valeur E	Score pept.
31	Phosphoglycérate mutase	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 4582924	2	1546,7427 1427,8027	1546,6939 1427,7521	0,0488 0,0506	K.ALEYEDFDKFD.R.V R.DAILSHKFDQVR.V	0,028 0,5	46 33
26	Enolase	<i>Solanum lycopersicum</i> L. Gi 19281	5	1803,9327 2003,0927 1859,8327 1910,9727 1895,9527	1803,9366 2003,0951 1859,8173 1910,9633 1895,9489	-0,0039 -0,0024 0,0154 0,0094 0,0038	R.AAVPSGASTGIYEALER.D K.LVLPVPAFNVINGGSHAGN.K.L K.SYDLNFKESNDGQSQK.I K.LAMQEFMILPVGAANFK.E R.GNPTVEVDVHVSNGVVFAR.A	0,0038 3,90E-07 0,0075 1,50E-05 1,10E-05	54 92 50 81 79
28	α-glucane phosphorylase (précurseur)	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 217999	3	1334,8127 2524,1427 1924,9917	1334,7710 2524,1141 1924,9682	0,0417 0,0286 0,0235	R.QLLNIFGIVYR.Y R.SGAFGSYNYDDLIGSLEGNEGFR.A K.FVPDERFEEVKEFVR.S	0,001 3,30E-10 0,0076	58 122 54
30	Tubuline (chaîne β-2)	<i>Lupinus albus</i> L. Gi 8928412	1	1138,6864	1138,6862	0,0002	K.LAVNLIPFPR.L	5	26
1	Petite protéine de choc thermique 1A cytosolique (classe I)	<i>Nicotiana tabacum</i> L. Gi 37704399	6	914,5510 993,5229 1042,5427 1001,6027 2974,5027 1575,8627	914,5185 993,4879 1042,5083 1001,5658 2974,5188 1575,8442	0,0325 0,0350 0,0344 0,0370 -0,0161 0,0185	R.I.LQISGER.S R.ETSVFANAR.I R.ETSVFAYAR.I R.FRLPENVK.M R.SNIVDPLSLHIGDPFEGFPIANPPSSVR.E K.FRLPENVKMGEIK.A	0,13 0,68 0,89 3,4 8,50E-05 0,42	42 37 34 25 66 36
25	Protéine DREPP4	<i>Nicotiana tabacum</i> L. Gi 7801133	4	1446,8127 2497,2727 1620,8727 3186,5827	1446,7969 2497,2739 1620,8762 3185,6091	0,0158 -0,0012 -0,0035 0,9736	K.VLEIYEA-AAVEIK.S K.AVSEASSNFGPSYVSGPILFVLEK.V K.FLDELVKIEFPGSK.A K.VSTFIVVTEDEKKGEEPA-ADDVHATATSVK.E	3,4 2,1 0,012 4,40E+02	27 25 49 19
17	Catalase	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 40950550	3	1083,5727 1608,9327 1556,8327	1083,5349 1608,8875 1556,8020	0,0378 0,0452 0,0307	R.IFAYADTQR.H K.TWPEDLLPLIPVGR.L R.IGPNYMQLPVNPAPK.C	77 0,027 0,077	14 45 41
5	Glyoxalase I	<i>Oryza sativa</i> L. Gi 4126809	5	1542,8227 2424,2527 1480,8327 1110,5927 913,4707	1542,8253 2424,2688 1480,8361 1110,6033 913,4909	-0,0025 -0,0161 -0,0034 -0,0106 -0,0202	K.SAEVVNLVTQELGGK.I K.GGSTVIAFVKDPDGYLFEILQR.E K.ITRQPGSIPGLNTK.I R.QPGSIPGLNTK.I R.SIKFYEK.A	0,055 0,016 16 3,30E+02 5,7	43 27 18 7 25
12	Sous-unité du protéasome 20S	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. Gi 7839485	3	2263,2827 1327,8127 1726,8127	2263,2827 1327,7823 1726,7910	0,0001 0,0305 0,0217	R.LFQVEYAIEAIKLGSTAIKIK.T K.TKEGVVLA VEK.R.I R.TEYDRGVNTFSPEGR.L	0,092 22 5,7	38 30 25
18	5-Lipoxygénase (produit de dégradation)	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 2789652	3	1658,9327 1911,0727 1510,9127	1658,9395 1911,0829 1510,9123	-0,0068 -0,0102 0,0005	R.LYEGGIKLPQGPLFK.A R.IPLILSLDIYVPRDER.F R.IPLILSLDIYVPR.D	0,13 8,4 3,3	52 19 21

Tableau 7. Identifications en MS/MS des protéines surexprimées au cours du vieillissement. Chaque identification comprend le nom de la protéine, son numéro d'accèsion au NCBI ainsi que l'organisme hôte, le nombre de peptides fragmentés correspondant à une entrée dans la base de données, les masses moléculaires relatives expérimentales et calculées des peptides, la différence de masse entre les valeurs expérimentales et calculées, la séquence, la valeur E et le score de chaque peptide.

Chapitre 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Protéines surexprimées au cours du vieillissement identifiées en MS/MS <i>partim</i> patatine									
Spot	Protéine	Organisme Accession Gi	Pept.	Mr expérim.	Mr calculée	Δ de masse	Séquences	Valeur E	Score pept.
2	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426671	3	1704,9025	1704,8967	0,0058	-.TLGEMVTVLSIDGGGK.G R.VHQALTEVAISSFDIK.T R.LADYFDVIGGTSTGLLTAMITTPNENRPF AAAK.D	3,50E-009	120
				1756,9445	1756,9359	0,0086		9,50E-009	115
				3641,7100	3641,8035	-0,0934		4,7	27
3	Patine (groupe A3)	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 84316375	2	1046,6096	1046,6124	-0,0028	K.TNKPVIFTK.S R.VHQALTEVAISSFDIK.T	3,8	29
				1756,9298	1756,9359	-0,0061		2,90E-008	111
4	Patatine 04	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 84316397	1	1756,9422	1756,9359	0,0063	R.VHQALTEVAISSFDIK.T	2,70E-008	111
7	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426671	3	1704,9135	1704,8967	0,0168	-.TLGEMVTVLSIDGGGK.G R.VHQALTEVAISSFDIK.T K.GIIPGIIIEFLFEGQLQK.M	1	35
				1756,9480	1756,9359	0,0121		0,02	52
				1867,1079	1867,0818	0,0261		0,0036	57
8	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426675	1	1756,9345	1756,9359	-0,0014	R.VHQALTEVAISSFDIK.T	0,00021	72
9	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 129640	2	1498,7930	1498,7820	0,0108	K.IFEPGFLHVEPK.Y R.VHQALTEVAISSFDIK.T	3,1	28
				1756,9430	1756,9359	0,0068		0,00034	67
10	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426683	1	1875,9011	1875,8962	0,0049	K.SVSEDNHETYEVALKR.F	0,00059	68
11	Patine 07	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 84316403	3	1463,6743	1463,6892	-0,0149	K.DNPETYEALKR.F K.SVSEDNHETYEVALKR.F R.LAQEDPAFASIK.S	92	15
				1875,8630	1875,8962	-0,0335		2,8	28
				1288,683	1288,6663	0,0164		0,0051	56
14	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426683	2	1498,7801	1498,7820	-0,0018	K.IFEPGFLHVEPK.Y R.VHQALTEVAISSFDIK.T	1,80E+002	12
				1756,9350	1756,9359	-0,0009		1,9	32
15	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426683	2	1704,9192	1704,8967	0,0225	-.TLGEMVTVLSIDGGGK.G R.VHQALTEVAISSFDIK.T	2,2	32
				1756,9458	1756,9359	0,0099		0,00069	67
16	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426683	2	1498,7857	1498,7820	0,0038	K.IFEPGFLHVEPK.Y R.VHQALTEVAISSFDIK.T	1,6	33
				1756,9358	1756,9359	-0,0001		0,00024	71
21	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426671	3	1756,9331	1756,9359	-0,0028	R.VHQALTEVAISSFDIK.T R.AEEDPAFASIR.S R.RAEEDPAFASIR.S	1,2E+002	14
				1204,6150	1204,5724	0,0426		1,1E+002	15
				1360,7130	1360,6735	0,0392		22	20
22	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426683	2	1046,5801	1046,6124	-0,0323	K.TNKPVIFTK.S R.LAQEDPAFASIK.S	1,50E+002	14
				1288,6227	1288,6663	-0,0436		3	30
23	Précurseur T5 de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 129644	4	1166,5800	1166,6005	-0,0208	K.YLMQVLQEK.L K.QMLLLSLGTGTNSEFDK.T R.RAEEDPAFASIR.S R.VHQALTEVAISSFDIK.T	0,083	45
				1834,9650	1834,9676	-0,0029		0,0085	53
				1360,6630	1360,6735	-0,0108		0,0023	58
				1756,9430	1756,9359	0,0068		0,00018	71

Tableau 8. Identifications MS/MS des protéines surexprimées au cours du vieillissement excisées manuellement, *partim* produits de dégradation de la patatine. Chaque identification comprend le nom de la protéine, son numéro d'accèsion au NCBI ainsi que l'organisme hôte, le nombre de peptides fragmentés correspondant à une entrée dans la base de données, les masses moléculaires relatives expérimentales et calculées des peptides, la différence de masse entre les valeurs expérimentales et calculées, la séquence, la valeur E et le score de chaque peptide.

3.2.1.2 Données d'abondance des protéines identifiées

Les cinétiques d'expression protéique sont présentées aux Tableaux 9 et 10. Complémentairement, les données concernant les produits de dégradation de la patatine sont synthétisées à la Figure 41 où chaque valeur est exprimée en pourcentage de l'abondance initiale (profil d'expression relative).

Produits de dégradation de la patatine

Le terme patatine désigne une famille de glycoprotéines dont le MW est d'environ 40 KDa. Selon le cv., la patatine représente 30 à 40 % de la fraction protéique soluble présente dans le tubercule (BOHAC, 1991 ; SHEWRY, 2003). Du fait de sa concentration, il est généralement admis qu'il s'agit d'une protéine de stockage, même si elle présente également une activité enzymatique acyl-hydrolase (BOHAC, 1991 ; SHEWRY, 2003) et une activité antioxydante faible (LIU *et al.*, 2003).

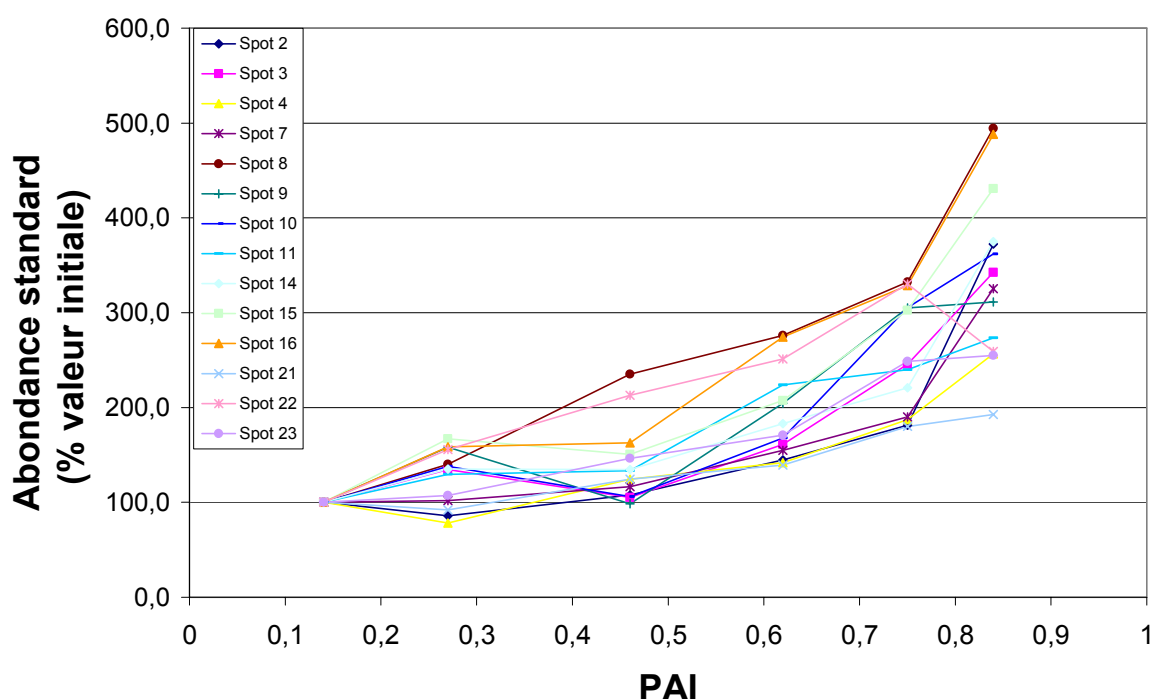


Figure 41. Comparaison des profils d'expression relatifs des produits de dégradation de la patatine au cours du vieillissement des tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004.

Globalement, l'augmentation des produits de dégradation de la patatine intervient généralement pour des valeurs de PAI supérieures à 0,6 (spots 2, 3, 7, 9, 10, 11, 14, 15, 16). Certains produits de dégradation voient cependant leur abondance croître plus rapidement dès que des valeurs de PAI supérieures à 0,4 sont atteintes (spots 4, 8, 21 et 22). Trois spots présentent pour leur part une phase plateau terminale marquée, si l'on tient compte de la variabilité des résultats (spots 9, 22 et 23). Les spots 8 et 16 présentent la plus grande amplitude de variation (4,94 et 4,88 respectivement) alors que la valeur moyenne des amplitudes des produits de dégradation est égale à 3,36. Ces résultats nous indiquent premièrement qu'il n'y a pas nécessairement, lors de la réalisation des extractions, un biais lié à une déplétion progressive de la patatine au cours du vieillissement. En effet, nos données laissent entrevoir un effet compensatoire global lié à l'augmentation d'abondance

des produits de dégradation. Cette information est importante pour l'interprétation des courbes d'abondance protéique ainsi que pour celle des cinétiques enzymatiques mesurées dans le cadre de ce travail. En considérant des quantités de protéines totales égales, les tendances observées pour chacun de ces dosages ne peuvent donc certainement pas être liées uniquement à une diminution progressive de la proportion de patatine intacte dans les extraits entraînant une sur-représentation artificielle d'autres protéines.

Une caractérisation plus poussée des produits de dégradation en *Peptide Mass Fingerprint* a été entreprise afin d'évaluer si ces produits résultent de protéolyses successives intervenant sur la protéine intacte. L'analyse et l'interprétation des PMF obtenues en MALDI-TOF sont complexes (résultats voir Annexe 3). Plusieurs paramètres sont en effet à prendre en compte pour localiser ces produits de dégradation sur la séquence intacte de la protéine :

- la présence de trois clades d'isoformes de patatine dans le tubercule de pomme de terre, ces isoformes découlant de l'expression d'une famille multigénique (gènes de classe I et II dans le tubercule) associée à des variantes de glycosylation (POTS *et al.*, 1999 ; SHEWRY, 2003, BAUW *et al.*, 2006),
- les contraintes techniques liées à l'analyse en PMF, une absence de peptide sur une carte pouvant être simplement due à un problème d'ionisation ou de digestion tryptique,
- la possibilité d'une agrégation des produits réactionnels polymérisés en cas d'oxydation de la patatine ou de ses produits de dégradation.

Le spot 47 (Gi|84316415) a servi de référence pour la caractérisation des produits de dégradation, les ARNm des différentes isoformes de patatine présentant environ 98 % d'identité de séquence (SHEWRY, 2003). Au terme de cette analyse, quelques tendances globales peuvent être dégagées. Les protéines des spots 2, 3, 4, 7, 8, 9, 14, 15 et 16 sont principalement constituées de peptides correspondant au début de la séquence de la patatine intacte. Le spot 10 quant à lui comprend des peptides situés dans la deuxième moitié de la séquence. Les spots 11 et 23 couvrent plus largement la séquence complète. Le spot 21 contient des peptides situés entre les acides aminés 130 et 269. Les séquences des spots 4 et 21 présentant une augmentation d'abondance précoce ne sont pas de taille supérieure à celle des autres produits de dégradation. Ils ne semblent donc pas être des précurseurs des autres produits de dégradation.

Les autres résultats obtenus ne peuvent cependant pas expliquer entièrement les différences de mobilité électrophorétique observées. Des modifications post-transcriptionnelles (épissages alternatifs) ou post-traductionnelles (variantes de glycosylation, modifications liées au vieillissement ; voir Figure 19) pourraient également être à l'origine de ces variations.

Catabolisme oxydatif du glucose

Au cours du stockage, trois enzymes impliquées dans le catabolisme du glucose sont surexprimées. L' α -glucane phosphorylase (spot 28) permet la production par phosphorylation de glucose-1-phosphate au départ d'amidon. Elle est surexprimée précocement au cours du stockage. Ce résultat est cohérent avec l'évolution des concentrations en glucose, fructose et saccharose observée dans les tubercules stockés à 2 ou 4°C (sucrage au froid, HERTOGE *et al.*, 1997 ; FAUCONNIER *et al.*, 2002 ; NOURIAN *et al.*, 2003 ; MATSUURA-ENDO *et al.*, 2006). Il est généralement admis que le sucrage de « sénescence », s'opérant d'autant plus rapidement que la température de stockage est élevée (ROUSSELLE *et al.*, 1996), est dû à des processus

hydrolytiques et phosphorolytiques dégradant l'amidon alors que la phosphorolyse intervient majoritairement dans le développement du sucage au froid précoce et réversible (BURTON, 1989, SOWOKINOS, 1990). Dans le tubercule de pomme de terre, l'augmentation rapide de l'activité α -glucane phosphorylase en réponse à un stress est un phénomène bien documenté. L'évolution de cette enzyme tranche de plus nettement avec celles des α - et β - amylases (SOWOKINOS, 1990). Notons finalement que l' α -glucane phosphorylase cytosolique est constituée de dimères ou de tétramères (BRISSEON *et al.*, 1989). Elle est présente à proximité immédiate des plastides dans les tubercules matures, ce qui confirme l'hypothèse formulée dans le chapitre de mise au point (BRISSEON *et al.*, 1989).

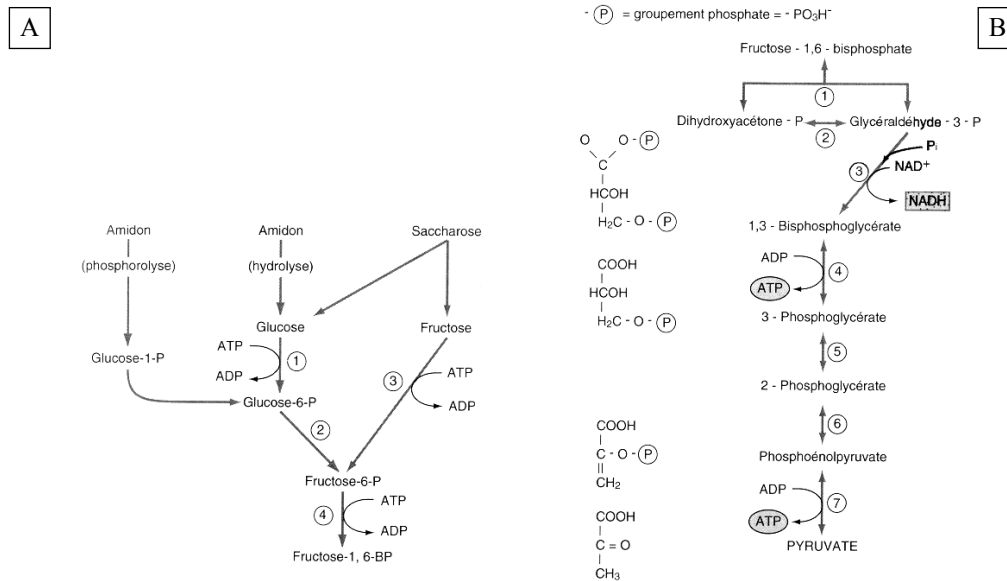


Figure 42. Conversion des réserves glucidiques végétales en fructose-1,6-biphosphate (A). Les enzymes impliquées sont (1) l'hexokinase, (2) l'hexophosphate isomérase, (3) la fructokinase et (4) la phosphofructokinase. Utilisation d'un hexose-phosphate par la voie de la glycolyse (B). Les enzymes sont (1) l'aldolase, (2) la triosephosphate isomérase, (3) la glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase, (4) la phosphoglycérate kinase, (5) la phosphoglycérate mutase, (6) l'énolase et (7) la pyruvate kinase (Hopkins, 2003).

La phosphoglycérate mutase (spot 31) et l'énolase (spot 26) sont quant à elles impliquées dans les dernières étapes de la glycolyse (Figure 42) précédant la formation du pyruvate (GIVAN, 1999). Notre travail a mis en évidence que la première est surexprimée en continu alors que la seconde voit sa concentration augmenter pour des valeurs de PAI supérieures à 0,7. Ces tendances ne coïncident pas avec l'évolution de la respiration des tubercules stockés à 2°C publiée par BURTON (1989). En effet, au cours du stockage à basse température étudié par cet auteur, la respiration passe par un maximum transitoire précoce correspondant au pic de sucage au froid avant de décroître constamment. Nos résultats sont cependant cohérents avec ceux de NOURIAN *et al.* (2003).

Défense face à un stress

La glyoxalase I (spot 5) catalyse la conversion de 2-oxoaldéhydes (principalement le méthylglyoxal) en 2-(R) hydroxyacides en utilisant le glutathion réduit comme cosubstrat (MARTINS *et al.*, 2001). Notre travail a montré que son abondance augmente significativement pour des valeurs de PAI supérieures à 0,6. Cette évolution va de pair avec celle observée pour le GSH au cours du vieillissement (voir Chapitre 5). Elle peut être

interprétée comme une réponse à un stress. En effet, la glyoxalase I est surexprimée en cas de stress salin chez la tomate afin d'éliminer le méthylglyoxal produit par la glycolyse (ESPARTERO *et al.*, 1995 ; YADAV *et al.*, 2005). Une accumulation de méthylglyoxal a également été mise en évidence dans des conditions de stress hydrique ou thermique (YADAV *et al.*, 2005). Les glyoxalases préviennent également la formation des produits finaux de glycation avancée (AGE : *Advanced Glycation End products*) résultant de la réaction des résidus lysine et arginine des protéines avec des composés 1,2-dicarbonyles tels que le méthylglyoxal. Ces AGE sont typiquement impliqués dans des maladies dégénératives liées au vieillissement dans un contexte de stress oxydatif telles que la maladie d'Alzheimer (MÜNCH *et al.*, 2003 ; KUHLA *et al.*, 2006 ; KUHLA *et al.*, 2007).

Une petite protéine de choc thermique (sHSP : *small Heat Shock Protein*, spot 1) cytosolique est surexprimée au cours du vieillissement pour des valeurs de PAI supérieures à 0,7. Ces sHSP (MW : 15-30 kDa) sont produites au cours de la maturation des fruits ainsi que dans diverses conditions de stress (notamment oxydatif, SUN *et al.*, 2002 ; SWINDELL *et al.*, 2007 ; voir aussi Figure 23). Elles sont également exprimées au cours de la maturation des graines, mais disparaissent pendant leur phase de germination (DEROCHER & VIERLING, 1994). La production de HSP est une réponse cellulaire à une augmentation de la concentration en protéines non-natives permettant de faciliter leur repliement correct ou la dégradation des protéines non fonctionnelles (SORENSEN *et al.*, 2003). La fonction physiologique des sHSP est de (1) protéger et stocker les ARNm ménagers et (2) de jouer le rôle de chaperon (LUBARETZ & NIEDEN, 2002 ; PARK & HONG, 2002). Elles sont présentes dans les cellules du parenchyme de stockage du tubercule (LUBARETZ & NIEDEN, 2002) prélevé lors des échantillonnages successifs (voir section 2.1 Matériel biologique).

Une isoforme de catalase (spot 17) est finalement surexprimée de façon très nette au cours du vieillissement pour des valeurs de PAI supérieures à 0,6. Sa courbe d'abondance (Figure 39) est en parfaite adéquation avec l'évolution de l'activité CAT mesurée en spectrophotométrie (Figure 51). L'abondance et l'activité de cette enzyme présentent une décroissance initiale cohérente avec l'évolution de la CAT au cours de la dormance. La levée de dormance est à ce titre associée à un stress oxydatif transitoire correspondant à une baisse d'activité CAT (BAJJI *et al.*, 2007b). Classiquement, l'activité CAT augmente lors de stress oxydatifs (SMIRNOFF, 1995 ; FEIERABEND, 2005). L'affinité des CAT pour l'H₂O₂ suggère par ailleurs que ces enzymes sont impliquées dans l'élimination des ROS dans un contexte de stress oxydatif (INZE & VAN MONTAGU, 1995 ; MITTLER, 2002 ; FEIERABEND, 2005). L'assemblage de la catalase tétramérique s'effectue dans le cytosol avant son transport dans les peroxysomes. L'importation peroxysomale de catalase pourrait en outre faire intervenir des protéines chaperons telles que les HSP (FEIERABEND, 2005).

Recyclage protéique

Une sous-unité du protéasome 20S (spot 12) est surexprimée au cours du vieillissement des tubercules de pomme de terre lorsque des valeurs de PAI supérieures à 0,7 sont atteintes. Le protéasome est un complexe protéolytique multi-catalytique majeur existant dans le cytoplasme et le noyau sous deux formes (20S de 670-700 kDa et 26S de 2000 kDa, REINHECKEL *et al.*, 1998) se distinguant par la présence ou l'absence de sous-unités régulatrices 19S de 700 kDa (Figure 43, TANAKA & CHIBA, 1998 ; VIERSTRA, 2003). Une deuxième unité régulatrice 11S a été découverte et serait impliquée dans la dégradation des petites protéines virales, mais son existence chez les plantes n'a pas été documentée (TANAKA & CHIBA, 1998).

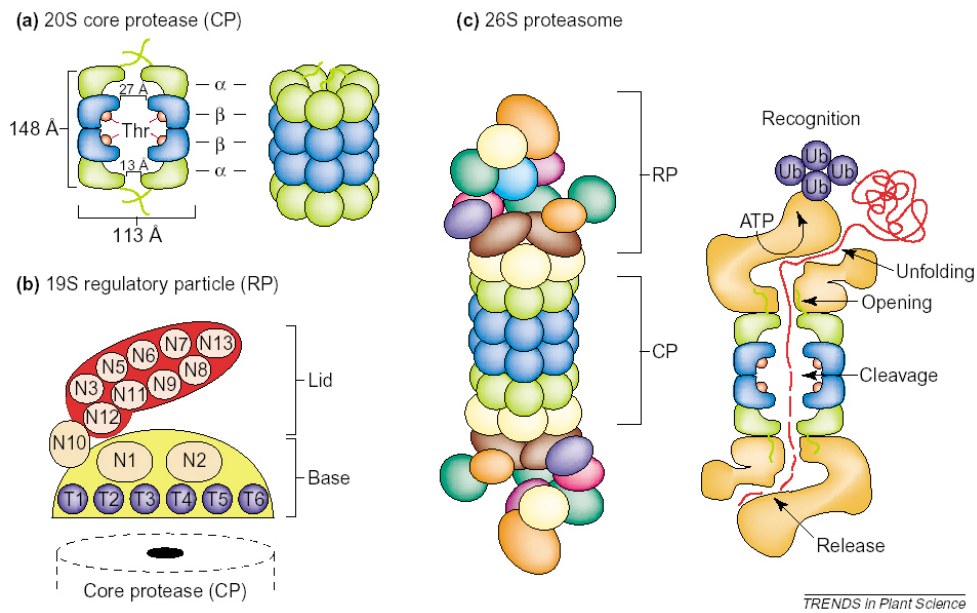


Figure 43. Organisation des protéasomes 20S et 26S (VIERSTRA, 2003). Le protéasome 26S est constitué du cylindre protéolytique 20S associé à deux particules 19S régulatrices rendant la protéolyse ubiquitine-dépendante. Le protéasome 20S catalyse par contre la dégradation de protéines oxydées sans reconnaissance préalable par la particule 19S.

Alors que le protéasome 26S dégrade des protéines polyubiquitinées mal reployées ou dénaturées, le protéasome 20S recycle certaines protéines telles que les protéines oxydées sans ubiquitination préalable (FU *et al.*, 1998, CARRARD *et al.*, 2002 ; SMALLE & VIERSTRA, 2004). Ces deux formes existent en équilibre (Figure 44, CARRARD *et al.*, 2002). La reconnaissance des protéines oxydées par le protéasome 20S est liée à la présence de régions hydrophobes à la surface de ces dernières (GRUNE *et al.*, 2003).

Une dégradation structurale et fonctionnelle du protéasome a été observée au cours du vieillissement humain (KELLER *et al.*, 2000). Ces modifications entraînent l'accumulation de protéines altérées (CARRARD *et al.*, 2002). Dans notre modèle, la surexpression d'une sous-unité du protéasome 20S en fin de vieillissement laisse plutôt entrevoir une activation des mécanismes de recyclage servant à éviter l'accumulation de protéines altérées. Cette observation est cohérente avec l'évolution du contenu en carbonyles mesurée au cours du vieillissement (voir Figure 67 du Chapitre 5). Les travaux de DAVIES (2001) ont également mis en évidence une activation du protéasome 20S en cas de stress oxydatif modéré. Ce complexe protéolytique est aussi impliqué dans le processus de germination des graines (BORGHETTI *et al.*, 2002).

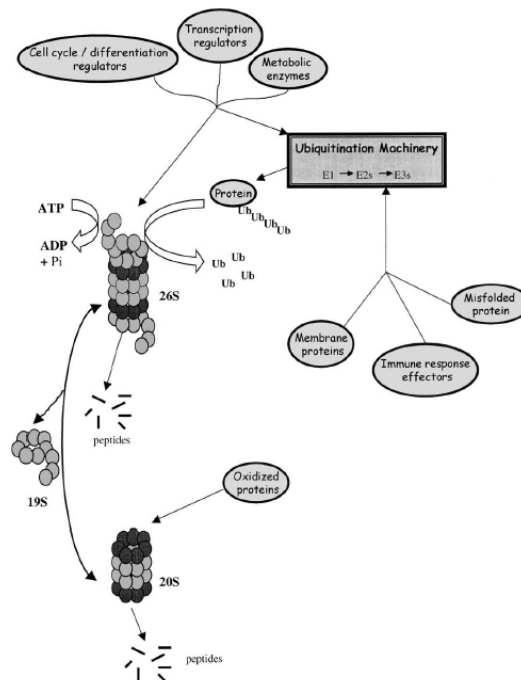


Figure 44. Représentation schématique du complexe protéolytique du protéasome. La plupart des substrats sont ubiquitinés avant dégradation par le protéasome 26S. Certains régulateurs cellulaires, les facteurs de transcription et certaines enzymes métaboliques sont cependant dégradés indépendamment d'une ubiquitination préalable. Le protéasome 20S catalyse quant à lui la dégradation des protéines oxydées ATP- et ubiquitine- indépendante (CARRARD *et al.*, 2002).

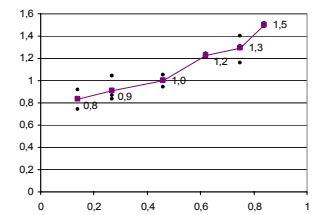
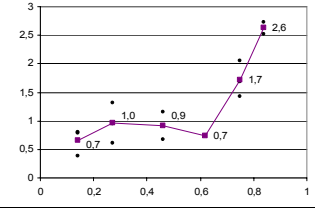
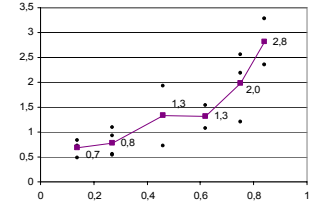
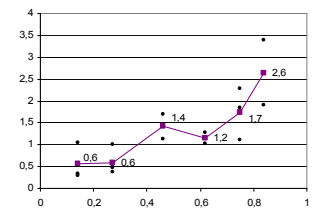
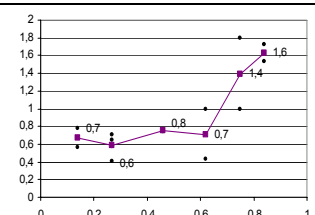
Autres fonctions physiologiques

Comme indiqué précédemment (point 3.2.1.1), on remarque une surexpression d'un produit de dégradation d'une LOX (spot 18) pour des valeurs de PAI supérieures à 0,6. Cette augmentation d'abondance accompagne clairement la diminution d'abondance de deux isoformes intactes de la LOX (Tableau 12).

Un polypeptide DREPP (*Developmentally regulated plasma membrane polypeptide*, spot 25) est également surexprimé pour des valeurs de PAI supérieures à 0,6. Ce polypeptide associé au plasmalemme a été extrait avec succès grâce au tampon de lyse SDS, mais sa fonction biologique reste peu claire. Il s'agit d'une protéine (Gi|7801133) différenciellement exprimée au cours du développement de plantes de *Nicotiana tabacum* (GANTET *et al.*, 1996 ; LOGAN *et al.*, 1997).

Pour finir, une augmentation d'une chaîne β de la tubuline (spot 30) a été observée précocement pour des valeurs de PAI supérieures à 0,4. Cette protéine constitutive des microtubules du cytosquelette est typiquement impliquée dans la croissance ainsi que dans la progression du cycle cellulaire. Elle est associée au processus de tubérisation chez la pomme de terre (TAYLOR *et al.*, 1991 ; TAYLOR *et al.*, 1994). Les travaux de SCHWARZEROVA *et al.* (2006) ont permis de mettre en évidence une accumulation transitoire de tubuline en réponse à un stress thermique (froid) dans des suspensions cellulaires de tabac. L'interprétation de notre résultat à l'échelle d'un tubercule entier reste cependant délicate.

Chapitre 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Spot	Protéine	Organisme Accession Gi	Fonction physiologique	p ANOVA	Rapport d'abondances	PAI critique	Profil d'expression
31	Phosphoglycérate mutase	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 4582924	Catabolisme oxydatif du glucose au cours de la glycolyse	9,2E-005	1,81	- (variation continue)	
26	Enolase	<i>Solanum lycopersicum</i> L. Gi 19281	Catabolisme oxydatif du glucose au cours de la glycolyse	0,0078	3,99	0,6	
28	α -glucane phosphorylase (précurseur)	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 217999	Catabolisme oxydatif de l'amidon (produit du Glucose-1-phosphate)	0,011	4,13	0,5	
30	Tubuline (chaîne β -2)	<i>Lupinus albus</i> L. Gi 8928412	Composante des microtubules, implication dans la tubérisation	0,0094	4,70	0,5	
1	Petite protéine de choc thermique 1A cytosolique (classe I)	<i>Nicotiana tabacum</i> L. Gi 37704399	Protéine de choc thermique, chaperon	0,029	2,76	0,6	

Chapitre 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Spot	Protéine	Organisme Accession Gi	Fonction physiologique	p AV1	Rapport d'abondances	PAI critique	Profil d'expression
25	Protéine DREPP4	<i>Nicotiana tabacum</i> L. Gi 7801133	Polypeptide membranaire régulé différentiellement au cours du vieillessement	0,0013	2,29	0,5	
17	Catalase	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 40950550	Enzyme antioxydante, élimine l'H ₂ O ₂ en cas de stress oxydatif poussé	0,00042	3,56	0,5	
5	Glyoxalase I	<i>Oryza sativa</i> L. Gi 4126809	Enzyme prévenant la formation des produits finaux de glycation avancée (AGE : <i>Advanced Glycation End-Products</i>)	0,00082	2,99	0,5	
12	Sous-unité du protéasome 20S	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. Gi 7839485	Recycle les protéines oxydées	9,1E-005	1,52	0,7	
18	5-Lipoxygénase (produit de dégradation)	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 2789652	Produit théoriquement des hydroperoxydes d'acide gras au départ de PUFA, MW très inférieur à la valeur attendue	0,011	3,45	0,6	

Tableau 9. Evolution des abondances des protéines surexprimées au cours du vieillissement. Les valeurs de p correspondant à l'AV sont mentionnées ainsi que les rapports des abondances protéiques présentant les amplitudes maximales de variation et les valeurs de PAI correspondant à des changements marqués dans les profils d'expression. L'abondance standard et le PAI sont respectivement présentés en ordonnée et en abscisse des graphiques.

Chapitre 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Spot	Protéine	Organisme Accession Gi	Fonction physiologique	p AV1	Rapport d'abondances	PAI critique	Profil d'expression
2	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426671	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,018	4,34	0,6	
3	Patatine (groupe A3)	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 84316375	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,014	3,43	0,6	
4	Patatine 04	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 84316397	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,026	3,28	0,5	
7	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426671	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,0037	3,25	0,6	
8	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426675	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	4,4E-005	4,94	- (variation continue)	

Chapitre 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Spot	Protéine	Organisme Accession Gi	Fonction physiologique	p AV1	Rapport d'abondances	PAI critique	Profil d'expression
9	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 129640	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,00023	3,17	0,5	
10	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426683	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,0047	3,62	0,6	
11	Patatine 07	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 84316403	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,011	2,74	0,5	
14	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426683	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,0094	3,75	0,6	
15	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426683	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,00058	4,31	0,6	

Chapitre 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Spot	Protéine	Organisme Accession Gi	Fonction physiologique	p AV1	Rapport d'abondances	PAI critique	Profil d'expression
16	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426683	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,00013	4,88	0,5	
21	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426671	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,048	2,09	0,3	
22	Précurseur de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 73426683	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,0081	3,30	0,7	
23	Précurseur T5 de patatine	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 129644	Produit de dégradation de la patatine, source d'acides aminés pour les synthèses protéiques	0,034	2,55	- (variation continue)	

Tableau 10. Evolution des abondances des protéines surexprimées au cours du vieillissement, *partim* produits de dégradation de la patatine.

3.2.2 *Protéines sous-exprimées au cours du vieillissement*

3.2.2.1 **Identifications en MS/MS**

Sept protéines sous-régulées au cours du vieillissement ont été identifiées en MS/MS (Tableau 11). Les valeurs E associées aux peptides fragmentés sont généralement faibles. Parmi ces protéines, aucun produit de dégradation de la patatine n'a été identifié, ce qui confirme indirectement notre interprétation des protéines surrégulées présentant des identités de séquences avec la patatine intacte, mais un MW plus faible. Deux isoformes de la LOX différant au niveau de leur *pI* ont été identifiées. Deux autres isoformes de protéines disulfide isomérases sont également sous-exprimées au cours du vieillissement. Une sous-unité régulatrice du protéasome 26S, un facteur d'élongation ainsi qu'une actine complètent ces identifications de protéines sous-régulées durant le stockage à basse température.

Chapitre 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Protéines sous-exprimées au cours du vieillissement identifiées en MS/MS									
Spot	Protéine	Organisme Accession Gi	Pept.	Mr expérim.	Mr calculée	Δ de masse	Séquences	Valeur E	Score pept.
27	Actine	<i>Gossypium hirsutum</i> L. Gi 32186906	3	1773,8974 1882,9412 2492,2305	1773,8897 1882,9312 2492,2394	0,0078 0,0100 -0,0089	K.NYELPDGQVITIGAER.F K.LAYVALDYEQELETAR.S R.SSSIEKNYELPDGQVITIGAER.F	0,42 0,0041 1E+002	39 59 15
36	Facteur d'élongation	<i>Oryza sativa</i> L. Gi 115456914	2	1345,7667 1741,9002	1345,7717 1741,9038	-0,0050 -0,0036	R.VIYASQLTAKPR.L K.AYLPVVESFGFSGTLR.A	2,5E+002 9,3	11 26
34	Protéine disulfide isomérase	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. Gi 47933777	3	1037,6247 1904,0727 1556,8227	1037,5981 1904,0367 1556,7946	0,0266 0,0361 0,0281	R.GGPVVKPTLR.L K.SQPIEVNDEPVKVVVR.D K.LRGEVDFAHTVDAK.H	46 0,0019 9,3	16 55 21
35	Protéine disulfide isomérase	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. Gi 47933777	3	1548,8527 1904,0727 1556,8227	1548,8147 1904,0367 1556,7946	0,0380 0,0361 0,0281	R.TKEAHEFIESNR.D K.SQPIEVNDEPVKVVVR.D K.LRGEVDFAHTVDAK.H	3,7 0,51 9,9	24 31 20
29	Sous-unité régulatrice 7 du protéasome 26S	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch Gi 3172331	3	1406,6127 1388,7327 1738,8427	1406,6062 1388,7299 1738,8348	0,0066 0,0028 0,0079	R.FDDGVGGDNEVQR.T R.KVEFGLPDLESR.T K.ACIVFFDEVDAIGGAR.F	5,9 1,00E+02 14	23 11 19
39	Lipoxygénase I	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 585417	3	1658,9352 1261,6427 2074,0527	1658,9395 1261,6455 2074,0694	-0,0043 -0,0028 -0,0167	R.LYEGGIKLPQGPLFK.A K.NTHINEFFLK.S K.VSFQLISSVQGDPTNGLQK.H	0,44 0,00011 0,017	33 72 46
40	Lipoxygénase	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 1495816	3	1658,9527 2134,1127 1911,1027	1658,9395 2134,1098 1911,0829	0,0132 0,0029 0,0198	R.LYEGGIKLPQGPLFK.A R.IFFANQPYLPSETPELLR.K R.IPLILSLDIYVPRDR.F	0,00033 0,0011 0,016	64 58 46

Tableau 11. Identifications MS/MS des protéines sous-exprimées au cours du vieillissement. Chaque identification comprend le nom de la protéine, son numéro d'accèsion au NCBI ainsi que l'organisme hôte, le nombre de peptides fragmentés correspondant à une entrée dans la base de données, les masses moléculaires relatives expérimentales et calculées des peptides, la différence de masse entre les valeurs expérimentales et calculées, la séquence, la valeur E et le score de chaque peptide.

3.2.2.2 Données d'abondance des protéines identifiées

Isoformes de LOX

Deux LOX (spots 39 et 40) situées à leur MW attendu (entre 97 et 103 KDa, ROYO *et al.*, 1996) voient leur abondance décroître significativement pour des valeurs de PAI supérieures à 0,5. Ces données sont cohérentes avec les valeurs d'activité mesurées en spectrophotométrie (Figure 62). Les LOX et leurs métabolites sont impliqués dans la résistance face aux pathogènes. Elles participent également à la régulation de la tubérisation au cours de la croissance des tubercules (FEUSSNER & WASTERNAK, 2002). La signification physiologique de cette diminution au cours du vieillissement reste cependant délicate à établir car elle ne semble pas vraiment être impliquée dans le phénomène de sucrage au froid (FAUCONNIER *et al.*, 2002). Nous pouvons néanmoins nous attendre à une diminution de la proportion d'oxylipines générées enzymatiquement au cours du vieillissement (Figure 63 et subséquentes). Les profils d'oxylipines obtenus au cours du vieillissement ont révélé la présence d'une accumulation transitoire des HPO majeurs pour des valeurs de PAI comprises entre 0,46 et 0,62 (Figure 63). Cette accumulation transitoire coïncide avec une diminution marquée de l'abondance des deux LOX identifiées et pourrait être responsable du suicide de cette enzyme. Les LOX sont en effet inactivées suite à l'accumulation de leurs produits réactionnels ou suite à une diminution de la concentration en oxygène (SPITELLER, 2001).

Protéines disulfide isomérases (PDI)

Deux isoformes distinctes de PDI (spots 34 et 35) sont sous-exprimées au cours du vieillissement (phase plateau atteinte pour des valeurs de PAI supérieures à 0,6). Les PDI appartiennent à une famille d'oxydoréductases contenant au minimum deux domaines thiorédoxines impliquées dans la formation de ponts disulfures S – S. Elles agissent principalement comme dithiol oxydases dans le repliement protéique au sein du réticulum endoplasmique (BUCHANAN & BALMER, 2005). Elles assument également le rôle d'isomérase et de chaperon (GRUBER *et al.*, 2006 ; WADAHAMA *et al.*, 2006). Elles participent au recyclage de l'AsA au départ de ses formes oxydées (SMIRNOFF, 1995 ; ARORA *et al.*, 2002 ; SMIRNOFF, 2005). Les protéines disulfide isomérases mitochondriales sont normalement surexprimées en cas de stress oxydatif. Elles sont impliquées dans les défenses antioxydantes (DESIKAN *et al.*, 2005). Dans notre modèle, la décroissance d'abondance observée va de pair avec les évolutions de l'AsA (Figure 52) et de l'acide chlorogénique (Figure 58).

Sous-unité régulatrice du protéasome 26S

L'abondance de cette protéine (spot 29) décroît en deux temps pour des valeurs de PAI de 0,3 et 0,7. La seconde décroissance coïncide avec l'augmentation de la concentration du protéasome 20S (Tableau 9). Il existe un équilibre entre les protéasomes 26S et 20S (CARRARD *et al.*, 2002). Nos données semblent indiquer que l'augmentation d'abondance observée au niveau du protéasome 20S va de pair avec une dégradation de la forme 26S ou tout du moins de ses sous-unités régulatrices (protéasome 19S). Ce réarrangement pourrait permettre un recyclage accru des protéines oxydées dégradées spécifiquement par le protéasome 20S. Le protéasome 26S est aussi plus sensible à l'oxydation que le protéasome 20S (REINHECKEL *et al.*, 1998 ; CARRARD *et al.*, 2002). Cette oxydation entraîne rapidement une diminution de la concentration des peptides constitutifs du protéasome 26S soumis à un stress oxydatif (REINHECKEL *et al.*, 1998).

Autres fonctions

Une actine (spot 27) est sous-exprimée pour des valeurs de PAI supérieures à 0,5. Cette protéine globulaire d'environ 42 KDa constitue l'unité de base des microfilaments du cytosquelette (STAIGER & BLANCHOIN, 2006). Elle coordonne les processus tels que l'expression de la polarité cellulaire et le positionnement des organites à l'intérieur des cellules (MCCURDY *et al.*, 2001). A titre d'exemple, le peroxyosome des cellules végétales dépend du cytosquelette d'actine pour sa distribution subcellulaire et ses mouvements (DEL RIO *et al.*, 2006). La dynamique du squelette d'actine est en fait influencée par la distribution spatiale et l'activité locale d'un mélange complexe de protéines se fixant à l'actine (MCCURDY *et al.*, 2001). Le cytosquelette d'actine est également impliqué dans la transduction de stimuli physiques comme le toucher ou l'exposition au gel (DROBAK *et al.*, 2004). Notons finalement que l'expression de l'actine est induite au cours de la germination de graines (DIAZ-CAMINO *et al.*, 2005). Dans notre modèle, l'évolution d'abondance observée se distingue de celle observée sur graine. Cette diminution d'abondance pourrait avoir des effets au niveau de la croissance cellulaire et de l'organisation des organites tels que les peroxyosomes au sein des cellules.

Un facteur d'élongation traductionnelle (spot 36) est finalement sous-exprimé pour des valeurs de PAI supérieures à 0,5. Cette protéine pourrait posséder une fonction GTPase (voir l'accèsion UniProtKB Q7XTK1). Au vu des similarités observées au niveau des courbes d'expression protéique, ce facteur d'élongation semble co-régulé avec l'actine.

Chapitre 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

Spot	Protéine	Organisme Accession Gi	Fonction physiologique	p AV1	Rapport d'abondances	PAI critique	Profil d'expression
27	Actine	<i>Gossypium hirsutum</i> L. Gi 32186906	Protéine structurale formant le cytosquelette	0,050	-3,75	0,5 (plateau initial)	
36	Facteur d'élongation	<i>Oryza sativa</i> L. Gi 115456914	Facteur d'élongation traductionnelle	0,00015	-3,49	0,5 (plateau initial)	
34	Protéine disulfide isomérase	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. Gi 47933777	Catalyse le repliement protéique, chaperon	9,8E-005	-3,08	0,6 (plateau final)	
35	Protéine disulfide isomérase	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. Gi 47933777	Catalyse le repliement protéique, chaperon	6,9E-005	-3,50	0,6 (plateau final)	
29	Sous-unité régulatrice 7 du protéasome 26S	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch Gi 3172331	Complexe protéolytique ubiquitine-dépendant	0,00025	-2,50	0,3 0,7 (décroissance en 2 étapes)	

Chapitre 4 : CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

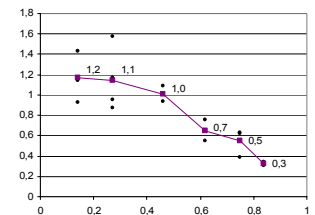
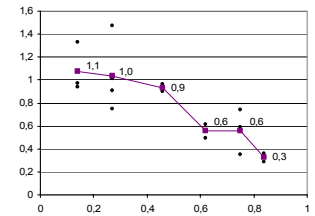
Spot	Protéine	Organisme Accession Gi	Fonction physiologique	p AV1	Rapport d'abondances	PAI critique	Profil d'expression
39	Lipoxygénase I	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 585417	Produit des HPO au départ des PUFA	0,00059	-3,59	0,5	
40	Lipoxygénase	<i>Solanum tuberosum</i> L. Gi 1495816	Produit des HPO au départ des PUFA	0,0026	-3,32	0,5	

Tableau 12. Evolution des abondances des protéines sous-exprimées au cours du vieillissement. Les valeurs de p correspondant à l'AV sont mentionnées ainsi que les rapports des abondances protéiques présentant les amplitudes maximales de variation et les valeurs de PAI correspondant à des changements marqués dans les profils d'expression. L'abondance standard et le PAI sont respectivement présentés en ordonnée et en abscisse des graphiques.

4 CONCLUSION

Dans le cadre de ce travail, des tubercules du cv. Désirée ont été soumis à un stress thermique lié à une température de stockage de 4°C. Au cours de ce stockage à basse température, ces tubercules subissent une évolution se traduisant par une modification de leur capacité germinative (voir chapitre 3). Nos résultats indiquent que cette évolution liée au vieillissement pourrait se traduire par une production accrue de ROS activant les systèmes de défense et d'élimination de ces dernières au sein du tubercule (Tableau 13).

Protéine	Tendance	PAI critiques	Remarque
Produits de dégradation de la patatine	++	Augmentation marquée pour des PAI > à 0,6 ou 0,4	14 produits de dégradation sur-régulés au cours du vieillissement ; proviennent d'une protéolyse accrue de la patatine
α -glucane phosphorylase	++	Augmentation marquée pour des PAI > à 0,4	Enzyme impliquée dans la phosphorylation de l'amidon au cours du sucrage au froid
Phosphoglycérate mutase	+	- (Croissance continue)	Enzyme glycolytique activée en réponse à un stress oxydatif
Enolase	++	Augmentation marquée pour des PAI > à 0,7	Enzyme glycolytique activée en réponse à un stress oxydatif et lors de la maturation des fruits
Glyoxalase I	++	Augmentation marquée pour des PAI > à 0,6	Enzyme prévenant l'accumulation de méthylglyoxal et d'AGE ; utilise le GSH comme cofacteur. L'élimination du méthylglyoxal est favorable à la prolifération cellulaire
sHSP classe I cytosolique	++	Augmentation marquée pour des PAI > à 0,7	Protéine produite au cours de la maturation des fruits et des graines ainsi que lors de stress oxydatifs ; rôle chaperon
Catalase	++	Augmentation marquée pour des PAI > à 0,6	Enzyme antioxydante sur-exprimée en cas de stress oxydatif. Evolution cohérente avec celle de l'activité CAT globale
Sous-unité du protéasome 20S	+	Augmentation marquée pour des PAI > à 0,7	Complexe protéolytique majeur activé en cas de stress oxydatif modéré ; dégrade spécifiquement les protéines oxydées
Sous-unité régulatrice 7 du protéasome 26S	--	Décroissance en 2 étapes pour des PAI > à 0,3 et 0,7	Complexe protéolytique en équilibre avec le protéasome 20S et sensible aux attaques oxydatives
LOX I	--	Décroissance marquée pour des PAI > à 0,5	Evolution cohérente avec celle de l'activité LOX globale ; produit des HPO au départ de PUFA. Suicide induit par une accumulation de ses produits
LOX	--	Décroissance marquée pour des PAI > à 0,5	Evolution cohérente avec celle de l'activité LOX globale ; produit des HPO au départ de PUFA. Suicide induit par une accumulation de ses produits
5-LOX (produit de dégradation)	++	Augmentation marquée pour des PAI > à 0,6	Augmentation de concentration correspondant à la baisse d'abondance des 2 isoformes de LOX intactes
PDI (1 ^{ère} isoforme)	--	Plateau final atteint pour des valeurs de PAI > à 0,6	Enzyme oxydoréductase impliquée dans l'oxydation des ponts S – S ; rôle chaperon. Evolution à corrélérer avec celle de l'AsA
PDI (2 ^{ème} isoforme)	--	Plateau final atteint pour des valeurs de PAI > à 0,6	Enzyme oxydoréductase impliquée dans l'oxydation des ponts S – S ; rôle chaperon. Evolution à corrélérer avec celle de l'AsA
DREPP4	++	Augmentation marquée pour des PAI > à 0,6	Protéine membranaire différenciellement exprimée au cours du développement de <i>Nicotiana tabacum</i>
Chaîne β -2 de tubuline	++	Augmentation marquée pour des PAI > à 0,4	Composante du cytosquelette associée au processus de tubérisation ; s'accumule en cas de stress thermique (froid)
Actine	--	Plateau initial, puis décroissance pour des PAI > à 0,5	Composante des microfilaments du cytosquelette ; intervient dans la croissance cellulaire et l'organisation des organites
Facteur d'élongation	--	Plateau initial, puis décroissance pour des PAI > à 0,5	Protéine possédant une fonction GTPase potentielle ; corégulée avec l'actine

Tableau 13. Synthèse des résultats obtenus en 2D-DIGE. ++ ou -- : variation d'abondance > à |2| ; + ou - : variation d'abondance < |2|. Les protéines sont présentées dans l'ordre utilisé pour la discussion des données d'abondance (regroupement selon leurs implications physiologiques)

Dans nos conditions expérimentales, une protéolyse marquée de la patatine intervient dans la seconde moitié du vieillissement. Parallèlement à cette mobilisation des réserves protéiques, la glycolyse est activée ainsi que plusieurs systèmes de défense impliqués dans la réponse au stress (Glyoxalase, CAT, sHSP). Une autre étude réalisée par LEHESRANTA *et al.* en 2006 n'avait cependant pas permis de mettre en évidence une activation de la glycolyse au cours d'un stockage à 5°C pendant 4 semaines, l'abondance de l'énolase restant par exemple constante dès la maturation des tubercules sur la plante sénescence. Nos données semblent indiquer que cette absence d'activation de la glycolyse est principalement liée à la trop faible durée de stockage utilisée par ces auteurs. La sHSP surexprimée assure un rôle chaperon et est normalement induite en cas de stress oxydatif. D'autres HSP voient leur concentration augmenter au cours de la phase de développement finale du tubercule, mais leur abondance reste constante durant les premières semaines de stockage à basse température (LEHESRANTA *et al.*, 2006).

Le complexe protéolytique du protéasome subit également des réarrangements au cours du vieillissement, l'équilibre étant déplacé en faveur de sa forme 20S dégradant spécifiquement les protéines oxydées. Cette évolution ne correspond pas à la décroissance continue mesurée au cours de la tubérisation (LEHESRANTA *et al.*, 2006), mais semble cohérente dans le contexte physiologique étudié. Au niveau du métabolisme des lipides, la concentration de deux isoformes de la LOX diminue au cours du vieillissement. Cette évolution va de pair avec l'accumulation d'un produit de dégradation de MW inférieure à celle attendue. D'autres protéines sont également différentiellement exprimées au cours du vieillissement, mais la signification physiologique de ces variations est un peu plus délicate à établir. Ainsi, les composantes du cytosquelette (actine et tubuline) subissent des réarrangements pouvant avoir des impacts sur la croissance et la progression du cycle cellulaire ainsi que sur l'organisation des organites. L'évolution de l'abondance de l'actine est cohérente avec celle observée dès les premiers stades de développement des tubercules sur la plante-mère (LEHESRANTA *et al.*, 2006). L'évolution des PDI peut, quant à elle, être corrélée avec celle de l'AsA, ces protéines étant impliquées dans le recyclage de l'ascorbate au départ de ses formes oxydées.

Même si certains résultats mériteraient d'être confirmés à l'aide, par exemple, de techniques sérologiques telles que le « western blot », l'ensemble des données obtenues sur gels 2D semble donc indiquer que notre système répond à une génération accrue de ROS accompagnant l'évolution de l'âge physiologique : certaines protéines identifiées telles que la sHSP de classe I, la catalase ou le protéasome 20S sont typiquement surexprimées en cas de stress oxydatif. L'évolution du système antioxydant ainsi que les impacts du stress oxydatif potentiel sur les biomolécules seront décrits en détails au chapitre 5.

CHAPITRE 5 : ETUDE DU SYSTEME ANTIOXYDANT ET DES DEGATS OXYDATIFS AU COURS DU PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT

1 INTRODUCTION

L'objectif poursuivi au cours de ce chapitre est de caractériser le plus complètement possible l'évolution des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques ainsi que celle des dégâts oxydatifs potentiels sur les lipides et les protéines au cours du vieillissement. Les différents résultats obtenus permettront (1) d'établir une cartographie des modifications subies par le système antioxydant, (2) d'évaluer l'hypothèse oxydative du vieillissement et (3) de mettre en évidence un éventuel rôle signal des ROS dans ce processus de développement. Ce chapitre s'inscrit donc en complémentarité de l'approche protéomique suggérant que l'évolution des tubercules liée au vieillissement pourrait se traduire par une surproduction de ROS activant les systèmes de défense et d'élimination.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel biologique

Les tubercules des cv. Bintje et Désirée récoltés en 2004 et 2005 et stockés pendant 0, 30, 90, 150, 210 et 270 jours à 4°C ont été utilisés pour ces études biochimiques. Les paramètres agronomiques de ces récoltes sont résumés dans le Tableau 2.

Chaque prélèvement se compose de 15 tubercules homogénéisés comme indiqué au point 2.1 du Chapitre 4.

2.2 Caractérisation des tubercules

Les profils de germination des tubercules ont été caractérisés au chapitre 4. Pour permettre la détermination de la teneur en protéines solubles, les extraits sont réalisés en homogénéisant pendant une heure 0,5 g de poudre de tubercules dans 10 ml de tampon phosphate glacé 0,1 M à pH 7,5. La suspension est alors centrifugée à 21000 g pendant 30 min à 4°C. La concentration protéique des extraits est calculée selon la méthode de WADDELL (1956).

2.3 Capacité globale d'élimination des radicaux libres

Une méthode dérivée de celle de MILLER *et al.* (2000) a été utilisée pour mesurer la capacité d'élimination des radicaux libres (RSA : *Radical Scavenging Activity*) des tubercules Bintje et Désirée récoltés en 2004. En résumé, le contenu global en antioxydants est mesuré à l'aide d'un radical libre stable, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Le DPPH forme une solution violet foncé et réagit avec les antioxydants contenus dans les tubercules de pomme de terre. La décoloration observée à 515 nm est corrélée au contenu en antioxydants exprimé en équivalents acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique (Trolox, Sigma-Aldrich) / g PF.

Une solution de DPPH 0,5 mM est préparée à RT en utilisant comme solvant un mélange eau/méthanol (50:50 ; v/v). Après filtration (Whatman 595 ½, Ø 150 mm), 50 ml de la solution de DPPH sont mélangés avec 50 mg (PF) de poudre de tubercules. Les échantillons sont directement décongelés dans cette solution afin de permettre une interaction

rapide entre le DPPH et les antioxydants. La suspension ainsi obtenue est incubée sous agitation à 38 °C à l'obscurité pendant 4 heures. Après filtration (Whatman 595 ½, Ø 150 mm), l'absorbance est mesurée à 515 nm contre un blanco constitué d'une solution de DPPH filtrée incubée à 38 °C sans échantillon. Des dilutions de Trolox comprises entre 0 et 2,5 µM ont été réalisées dans la solution de DPPH filtrée afin d'établir la droite d'étalonnage. Les données obtenues sont converties en µmoles d'équivalent Trolox / g (PF) d'échantillon. Trois répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque point des cinétiques de vieillissement.

2.4 Caractérisation des antioxydants enzymatiques

2.4.1 Résolution protéique et dosage des activités en native-PAGE

2.4.1.1 Extractions protéiques

Huit cents mg de poudre de tubercules sont homogénéisés avec 1 ml de tampon d'extraction (tampon phosphate 50 mM pH 7,6 contenant du métabisulfite de sodium 10 mM, de l'AsA 1 mM, de l'EDTA 1 mM, du sorbitol 20 % m/v et de la PVPP 2 % m/v). La suspension est centrifugée à 12000 g durant 20 min à 4°C. Le surnageant est stocké à -80 °C et est utilisé pour les analyses.

2.4.1.2 Dosage des extraits

La concentration protéique des extraits est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant le « Protein assay kit II » de Bio-Rad. Le mélange réactionnel est composé de 795 µl d'H₂O, 200 µl de bleu de Coomassie et 5 µl d'extrait protéique. Après 15 à 20 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 595 nm contre un blanco réalisé avec le surnageant du tampon d'extraction. La BSA est utilisée comme standard (0 à 20 mg/l). Pour chaque échantillon, le dosage des protéines solubles a été réalisé à trois reprises.

2.4.1.3 Résolution en native-PAGE

Pour les activités SOD, POX et CAT, les protéines non dénaturées sont résolues en native-PAGE (LAEMMLI, 1970) en utilisant des gels de 1,5 mm d'épaisseur contenant 10 % d'acrylamide (pH 8,7). Le tampon de migration contient 0,3 % m/v de Tris et 1,5 % m/v de glycine. Les quantités chargées dans chaque puits sont respectivement de 50, 100 et 100 µg de protéines solubles. La migration s'effectue à 4 °C en utilisant une intensité de courant constante (115 mA). Pour l'activité APX, un système très similaire est utilisé. Les seules différences concernent (1) la composition du gel de polyacrylamide contenant en plus du glycérol 10 % v/v et (2) la composition du tampon de migration (complémenté avec 2 mM d'AsA). Les quantités de protéines chargées dans chaque puits sont de 110 µg. La migration s'effectue également à 4°C, 115 mA constants après une prémigration sans échantillon de 30 min à 115 mA.

Chaque cinétique de vieillissement des cv. Bintje et Désirée récoltés en 2004 est évaluée sur base de trois séries d'extractions indépendantes résolues sur un même gel. Après migration et coloration spécifique, les gels sont numérisés à l'aide de l'Image Scanner (GE Healthcare). Les analyses en densitométrie des images des gels sont réalisées à l'aide du logiciel ImageQuant TL (GE Healthcare).

2.4.1.4 Coloration spécifique de l'activité SOD

L'activité SOD est révélée sur gel selon la méthode de BEAUCHAMP & FRIDOVICH (1971). Après migration, les gels sont rincés à l'eau distillée et incubés sous agitation à l'obscurité durant 20 min dans la solution de coloration (tampon phosphate 34 mM pH 7,8,

Na₂EDTA 0,7 mM, chlorure de Nitro Blue tétrazolium [NBT] 0,25 mM, *N,N,N',N'*-Tetraméthyléthylènediamine [TEMED] 0,35 % v/v, Riboflavine 42 µM). Les gels sont alors rincés 2 fois à l'eau distillée avant exposition à la lumière. L'activité SOD est révélée par la présence de bandes achromatiques sur un fond violet. Dès que l'intensité de coloration voulue est atteinte, les gels sont fixés dans de l'acide acétique 7 % v/v. Une variante du protocole utilisant des inhibiteurs spécifiques peut également être utilisée afin de localiser sur les gels les différentes classes de SOD. Cette localisation nécessite une incubation supplémentaire de 30 min après le premier rinçage dans une solution inhibant les Fe et Cu/ZnSOD (tampon phosphate 50 mM pH 8 contenant 1 mM d'EDTA et 10 mM d'H₂O₂) ou les Cu/ZnSOD uniquement (tampon phosphate 50 mM pH 7,8 contenant 1 mM d'EDTA et 5 mM de KCN). Les MnSOD ne sont pas affectées par ces traitements (SCANDALIOS, 1993).

2.4.1.5 Coloration spécifique de l'activité APX

Cette coloration utilise le protocole de MENEGUZZO *et al.* (1998). Après migration, les gels sont incubés pendant 30 min dans une solution d'équilibrage (tampon phosphate 50 mM pH 7,0 contenant de l'AsA 2 mM). Les gels sont ensuite sensibilisés pendant 30 min dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,0 contenant de l'AsA 4 mM et de l'H₂O₂ 2 mM. Après lavage pendant 4 min dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,8, les gels sont incubés sous légère agitation dans la solution de coloration (tampon phosphate 50 mM pH 7,8 contenant du NBT 2,45 mM et du TEMED 28 mM). L'activité APX produit des bandes achromatiques sur un fond violet.

2.4.1.6 Coloration spécifique de l'activité POX

L'activité POX est colorée à la diaminobenzidine selon la méthode de ROJAS-BELTRAN *et al.* (2000), l'APX étant labile en l'absence d'AsA. Après migration, les gels sont rincés à l'eau distillée et incubés pendant 10 min dans un tampon phosphate 50 mM à pH 7,0. Les gels sont ensuite colorés dans ce même tampon complété avec de l'H₂O₂ 5 mM et de la diaminobenzidine 0,05 % m/v. L'activité POX produit des bandes foncées sur un fond incolore.

2.4.1.7 Coloration spécifique de l'activité CAT

Les isozymes de la catalase sont détectées en utilisant un protocole fourni aimablement par le Dr J. Scandalios (NCSU, USA). Après migration, les gels sont incubés sous légère agitation pendant 30 min à RT dans une solution de NBT (KPO₄ 50 mM pH 7,0, EDTA 0,1 mM, NBT 0,5 mM). Les gels sont ensuite colorés à la lumière dans la solution d'AsA (KPO₄ 50 mM pH 7,0, EDTA 0,1 mM, AsA 10 mM et H₂O₂ 0,015 % m/m). Les POX colorées à la diaminobenzidine apparaissent sous forme de bandes achromatiques sur fond violet.

2.4.2 Dosages des activités spécifiques en spectrophotométrie

2.4.2.1 Extractions protéiques

Cinq cents mg de poudre de tubercules sont homogénéisés sur glace avec 1 ml de tampon d'extraction (tampon phosphate 50 mM pH 7,0 contenant de l'EDTA 1 mM et de la PVPP 1 % m/v). La suspension est centrifugée à 16000 g durant 30 min à 4°C. Le surnageant est stocké à -80 °C et est utilisé pour les analyses.

2.4.2.2 Dosage des extraits

La concentration protéique des extraits est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant le « Protein assay kit II » de Bio-Rad (voir point 2.4.1.2.).

2.4.2.3 Activité SOD

L'activité SOD est mesurée par inhibition de la photoréduction du NBT en présence de riboflavine (DHINDSA *et al.*, 1980). Le milieu réactionnel (volume final : 3 ml) est constitué d'un tampon phosphate 50 mM pH 7,8 contenant de l'EDTA 0,1 mM, du NBT 75 μ M, de la L-méthionine 13 mM, de la riboflavine 2 μ M et un volume d'extrait enzymatique de 0, 8 ou 16 μ l. Ces 3 dilutions sont incubées à 20 cm d'un tube néon (Sylvania Luxline Plus F36W/827, Raunheim, Allemagne) pendant 20 min à RT avant lecture des absorbances à 560 nm contre un blanco stocké à l'obscurité. L'absorbance finale décroît avec l'augmentation du volume d'extrait enzymatique. Une unité SOD est définie comme étant la quantité d'enzyme qui cause 50 % d'inhibition du taux initial de la réaction de photoréduction en l'absence d'enzyme. La courbe exprimant l'absorbance en fonction du volume enzymatique utilisé est linéarisée par transformation logarithmique (Figure 45).

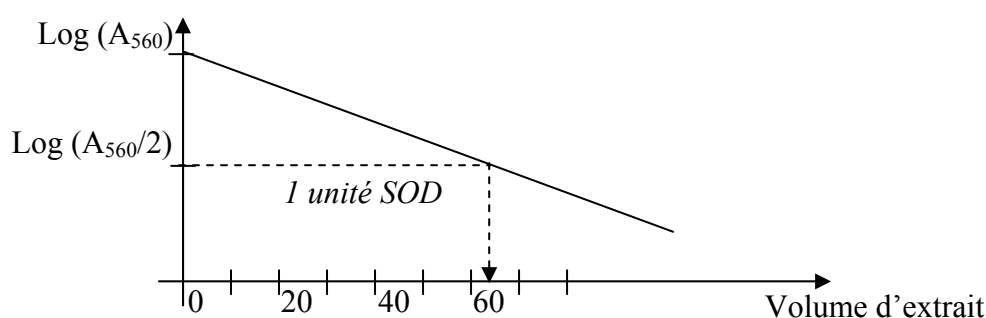


Figure 45. Linéarisation des courbes d'absorbance en fonction du volume enzymatique afin de déterminer l'activité SOD spécifique par spectrophotométrie.

L'équation de la droite ainsi obtenue permet de calculer le volume d'extrait enzymatique correspondant à une unité SOD, ce volume étant utilisé pour le calcul de l'activité SOD spécifique. Trois extractions indépendantes ont été utilisées pour chaque point des cinétiques de vieillissement.

2.4.2.4 Activité APX

L'activité APX est calculée en mesurant la décroissance de l'absorbance d'une solution d'AsA en présence d' H_2O_2 et d'APX selon la méthode de NAKANO & ASADA (1981). Le milieu réactionnel se compose d'un tampon phosphate 50 mM à pH 7,0 contenant de l'AsA 0,25 mM, de l'EDTA 0,1 mM, de l' H_2O_2 0,1 mM ainsi que 10 μ l d'extrait enzymatique (volume final : 1 ml). L'absorbance à 290 nm est mesurée toutes les cinq secondes pendant deux min. La pente de la droite obtenue permet de calculer l'activité APX en utilisant un coefficient d'extinction molaire (ϵ) = 2,8 $mM^{-1}.cm^{-1}$. Deux mesures complémentaires sont réalisées en l'absence respectivement d' H_2O_2 ou d'extrait enzymatique afin de tenir compte de l'oxydation enzymatique de l'AsA par l'ascorbate oxydase et de l'oxydation non enzymatique de l'AsA par l' H_2O_2 . Si les valeurs de ces pentes sont significativement différentes de 0, elles sont soustraites de la pente de l'APX. Une unité enzymatique APX correspond à une μ mole d'AsA consommée par min. Trois extractions indépendantes ont été utilisées pour chaque point des cinétiques de vieillissement.

2.4.2.5 Activité CAT

L'activité CAT est dosée selon le protocole de CLAIBORNE (1985) en mesurant la décroissance de l'absorbance de l' H_2O_2 mis en présence de CAT. Le milieu réactionnel est constitué d'un tampon phosphate 50 mM à pH 7,0 contenant de l' H_2O_2 10 mM et 75 μ l

d'extrait enzymatique (volume final = 3 ml). L'absorbance à 240 nm est mesurée toutes les 10 secondes pendant 5 min. La pente de la droite obtenue permet de calculer l'activité CAT en utilisant un $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Une unité CAT correspond à une μmole d' H_2O_2 consommée par min. Trois extractions indépendantes ont été utilisées pour chaque point des cinétiques de vieillissement.

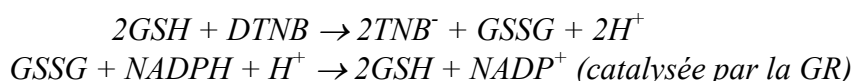
2.5 Caractérisation des antioxydants non enzymatiques

2.5.1 Dosage de l'AsA et du DHA

L'AsA et le DHA ont été dosés selon la méthode de DE PINTO *et al.* (1999). Les échantillons (0,5 g PF) de poudre de tubercules sont homogénéisés sur glace avec 2 volumes d'acide métaphosphorique froid 5 % m/v. L'homogénat est ensuite centrifugé pendant 15 min à 18000 g à 4 °C et le surnageant est utilisé pour l'analyse de l'ascorbate et du glutathion (point 2.5.2.). L'ascorbate total est déterminé après réduction du DHA en AsA à l'aide de DTT. La concentration en DHA est obtenue par différence entre les concentrations de l'ascorbate « total » (AsA + DHA) et l'AsA. Le milieu réactionnel utilisé pour la détermination de l'ascorbate total est composé de 100 μl de surnageant, 250 μl de tampon phosphate 150 mM pH 7,4 contenant 5 mM d'EDTA et 50 μl de DTT 10 mM. Après incubation pendant 10 min à RT, 50 μl de N-éthylmaléimide 0,5 % m/v sont ajoutés afin de masquer le DTT en excès. L'AsA est déterminé d'une façon similaire en ajoutant 100 μl d' H_2O à la place du DTT et du N-éthylmaléimide. Les réactifs suivants sont alors ajoutés : 200 μl d'acide trichloroacétique (TCA : *TriChloroacetic Acid*) 10 % m/v, 200 μl d'acide ortho-phosphorique 44 % m/v, 200 μl de 2,2'dipyridyl 4 % m/v dissout dans de l'éthanol 70 % v/v et 100 μl de FeCl_3 1 % m/v. Après homogénéisation, les échantillons sont incubés à 40°C pendant 40 min et l'absorbance est mesurée à 525 nm. Une droite d'étalonnage est établie en utilisant des dilutions d'AsA dans de l'acide métaphosphorique 5 % m/v comprises entre 0 et 1000 μM . Quatre répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque point des cinétiques.

2.5.2 Dosage du GSH et du GSSG

Cette méthode de dosage se base sur le recyclage du GSH par la GR en présence d'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) [DTNB : *5,5'-DiThiobis(2-NitroBenzoic acid)*] :



Le taux de formation de l'ion TNB^- est mesuré et est proportionnel à la teneur en GSH et GSSG de l'échantillon (PUNCHARD, 1996).

Le contenu en glutathion a été mesuré selon la méthode de ZHANG & KIRKHAM (1996) en utilisant 400 μl du surnageant d'extraction préparé au point 2.5.1. et neutralisé avec 600 μl de tampon phosphate 0,5 M à pH 7,5. Pour le dosage du GSSG, le GSH est masqué en ajoutant 20 μl de 2-vinylpyridine au surnageant neutralisé et en homogénéisant le mélange jusqu'à formation d'une émulsion. Cette émulsion est stockée 1 heure à RT. Pour le dosage du glutathion « total » (GSH + GSSG), 20 μl d' H_2O sont ajoutés à la place de la 2-vinylpyridine.

Le contenu en glutathion total ou en GSSG est mesuré dans 1 ml de milieu réactionnel (NADPH 0,2 mM, tampon phosphate 100 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, DTNB 0,6 mM) contenant 25 μl de la solution préparée ci-dessus. La réaction est initiée en ajoutant 3 unités de GR. L'absorbance à 412 nm est mesurée toutes les 10 secondes pendant 30 secondes et la pente de la droite ainsi obtenue est calculée. La concentration en GSH des extraits est estimée

par différence des concentrations en glutathion total et en GSSG exprimées en équivalents GSH. Une droite d'étalonnage est établie à l'aide des pentes de réactions de recyclage utilisant des dilutions de GSH comprises entre 0 et 200 nM. Quatre répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque point des cinétiques.

2.5.3 Dosage des caroténoïdes totaux

Le contenu en caroténoïdes a été déterminé spectrophotométriquement selon MORRIS *et al.* (2004). Afin d'extraire les composés lipophiles, 300 mg de poudre de tubercules sont homogénéisés pendant 30 min à 4 °C dans 1,5 ml d'acétone contenant 1 % w/v d'hydroxytoluène butylé (BHT : *Butylated HydroxyToluene*). Après centrifugation à 9500 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est collecté et le culot est réextrait avec le même solvant. Les deux surnageants sont groupés et la concentration totale en caroténoïdes est évaluée sur base de l'absorbance à 450 nm, en utilisant un coefficient d'extinction moyen $A^{1\%} = 2500 \text{ cm}^{-1} \cdot 100 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ ($=A_{450\text{nm}}$ d'une solution à 1g/100ml de caroténoïdes idéaux dans une cuvette possédant un trajet optique de 1cm). Trois extractions indépendantes ont été réalisées pour chaque point des cinétiques.

2.5.4 Dosage des composés phénoliques (ANDRE *et al.*, 2007)

Trois cents (± 30) mg de poudre de tubercules sont mélangés à 1,5 ml d'une solution méthanol/eau/acide acétique (70:29,5:0,5 ; v/v/v). L'extraction s'effectue sous agitation pendant 30 min à 4°C. Après centrifugation à 9000 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est collecté et le résidu est ré-extrait une seconde fois en utilisant 500 μl de la solution d'extraction. Les surnageants sont alors regroupés et évaporés à sec dans un SpeedVac (Heto, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). Les polyphénols sont finalement resuspendus dans 500 μl d' H_2O et filtrés à 0,45 μm avant injection en HPLC.

L'identification et la quantification des composés phénoliques ont été réalisées en HPLC à l'aide d'un système Dionex Summit (Sunnyvale, CA, USA) muni d'une pompe à gradient P580, d'un échantillonneur GINA 50, d'un détecteur à barette de diodes DAD UVD 340S et d'un four bio-Rad thermostaté à 40°C. Un échantillon de 20 μl est injecté sur une colonne HPLC Nucleodur C18 Pyramid (250 x 4,6 mm de diamètre interne, taille de particule : 5 μm , Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). La phase mobile est composée des solvants (A) solution aqueuse à 0,1 % v/v d'acide formique (FA : *Formic Acid*) et (B) acétonitrile contenant 0,1 % de FA. Le débit est de 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Le gradient de 95 min comporte les paliers suivants : 0-10 min, 0-9 % B ; 10-40 min, 9-13 % B ; 40-80 min, 13-35 % B ; 80-82 min, 35-100 % B ; 82-87 min, 100 % B isocratique, 87-90 min, 100-0 % B ; 90-95 min, 0 % B isocratique (rééquilibrage). L'évolution des absorbances a été enregistrée simultanément à 280 nm (tyrosine, tryptophane), 254 nm (phénylalanine), 308 nm (acide caftarique et acide ortho-anisique [standard interne]) et 320 nm (acides chlorogénique, néochlorogénique, cryptochlorogénique, dichlorogénique et caféique). Six répétitions indépendantes ont été utilisées pour chaque point des cinétiques.

2.6 Evaluation des dégâts oxydatifs sur lipides

2.6.1 Dosage de l'activité LOX

Ce dosage est réalisé en mesurant l'absorbance à 234 nm des diènes conjugués (hydroperoxydes produits par la LOX). Cette méthode se base sur un protocole modifié de SURREY (1964). Les extraits protéiques sont réalisés en homogénéisant pendant une heure 0,5 g de poudre de tubercules dans 10 ml de tampon phosphate de sodium glacé 0,1 M pH 7,5. La suspension est alors centrifugée à 21000 g pendant 30 min à 4 °C. La concentration protéique des extraits est calculée selon WADDELL (1956). Un mélange de 50 μl d'une

émulsion d'acide linoléique 10 mM et d'un volume d'extrait enzymatique compris entre 50 et 80 μ l (selon l'activité enzymatique) est porté à 3 ml à l'aide d'un tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 préalablement oxygéné. L'évolution de l'absorbance est alors mesurée à 234 nm. Pour chaque point des cinétiques, trois extractions indépendantes ont été réalisées et cinq mesures de l'activité enzymatique ont été obtenues pour chaque extraction. Une unité LOX correspond à une μ mole d'hydroperoxydes de l'acide linoléique formée par min en utilisant un ϵ de 25000 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

2.6.2 Profils en oxylipines

Les oxylipines existant sous forme libre ou estérifiée dans des phospholipides ou des galactolipides, leur analyse nécessite deux protocoles distincts. Les profils en oxylipines libres et estérifiées des échantillons des cv. Désirée et Bintje récoltés en 2004 ont été déterminés en duplicats selon la méthode de GÖBEL *et al.* (2002).

2.6.2.1 Extraction des oxylipines libres et estérifiées

Pour l'extraction des oxylipines libres, l'acide (6Z, 9Z, 11E, 13S)-13-hydroxy-6,9,11-octadécatriénoïque (13 γ HOT, Cayman Chemical, East Ellsworth, MI, USA) est utilisé comme standard interne et 5 g (PF) de poudre de tubercules sont homogénéisés dans 20 ml de solution d'extraction (isohexane/2-propanol, 3:2 v/v contenant 0,0025 % m/v de BHT). L'extrait est alors centrifugé à 1300 g à 4 °C pendant 10 min. La phase supérieure limpide est collectée et son volume est porté à 32,5 ml à l'aide d'une solution de sulfate de potassium à 6,7 % m/v. Après homogénéisation pendant 10 min à 4 °C, l'extrait est centrifugé à 1300 g à 4 °C pendant 10 min. La phase supérieure riche en hexane contenant les oxylipines est collectée et séchée sous azote avant transfert en tubes de 1,5 ml à l'aide de 3 x 400 μ l d'hexane/isopropanol (100:5, v/v). Les extraits sont finalement séchés sous azote et solubilisés dans le solvant utilisé lors de la résolution en phase inverse (RP : *Reverse Phase*).

Pour l'extraction des oxylipines estérifiées, le triricinoléate de glycérol (Sigma-Aldrich) est utilisé comme standard interne et 5 g (PF) de poudre de tubercules sont homogénéisés dans 20 ml de solution d'extraction (isohexane/2-propanol, 3:2 v/v contenant 0,0025 % m/v de BHT). L'extrait est alors centrifugé à 1300 g à 4 °C pendant 10 min. La phase supérieure limpide est collectée et son volume est porté à 32,5 ml à l'aide d'une solution de sulfate de potassium à 6,7 % m/v. Après homogénéisation, l'extrait est centrifugé à 1300 g à 4 °C pendant 10 min. La phase supérieure riche en hexane contenant les oxylipines est collectée et séchée sous azote avant transfert en tubes de 1,5 ml à l'aide de 3 x 400 μ l d'hexane/isopropanol (100:5, v/v). Les oxylipines estérifiées sont alors transméthylées à l'aide de méthoxyde de sodium selon la méthode de GÖBEL *et al.* (2003). En résumé, les échantillons sont séchés sous flux d'azote avant ajout de 333 μ l d'une solution de méthanol/toluène (2:1, v/v) et de 167 μ l de CH_3NaO 0,5 M. Les échantillons sont transméthylés sous agitation pendant 20 min à RT. Après ajout de 500 μ l d'une solution de NaCl saturée et 20 μ l d'HCl 32 % v/v, les échantillons sont extraits 2 fois avec 1 ml de n-hexane. Les phases organiques sont alors groupées et séchées sous flux d'azote avant re-suspension dans 100 μ l du solvant utilisé lors de la résolution en RP.

2.6.2.2 Analyse en HPLC

Les oxylipines libres et estérifiées sont analysées par HPLC (Series 1100, Agilent, Palo Alto, CA, USA) afin d'être séparées, identifiées et quantifiées au moyen de standards internes. Le protocole est divisé en trois étapes, la première permettant une séparation de groupe sur colonne en RP. Chaque fraction collectée automatiquement est ensuite injectée sur une colonne en phase directe (SP : *Straight Phase*) qui permet une séparation individuelle des oxylipines. Si nécessaire, chaque oxylipine peut être collectée manuellement après résolution

en SP et injectée sur une colonne chirale (CP : *Chiral Phase*) pour que sa composition énantiomérique puisse être déterminée.

Les analyses en RP-HPLC sont réalisées sur une colonne C₁₈ EC250/2 Nucleosil 120-5 (250 x 2,1 mm, taille de particule de 5 µm, Macherey-Nagel) en utilisant le gradient binaire suivant. La phase mobile est composée des solvants (A) méthanol:eau:acide acétique (75:25:0,1, v/v/v) et (B) méthanol:eau:acide acétique (100:0:0,1, v/v/v). Le volume d'injection est de 100 µl. Le gradient de 56 min utilisé pour la séparation de groupe des oxylipines libres comporte les paliers suivants : 0-10 min, 20 % B isocratique ; 10-28 min, 20-40 % B ; 28-30 min, 40-100 % B ; 30-45 min, 100 % B isocratique ; 45-50 min, 100-20 % B ; 50-56 min, 20 % B isocratique (rééquilibrage). Après 30 min à 0,18 ml.min⁻¹, le débit augmente linéairement jusqu'à 0,36 ml.min⁻¹ en 5 min. Ce débit est maintenu durant 10 min avant diminution linéaire jusqu'à 0,18 ml.min⁻¹ en 5 min. Ce dernier débit est également utilisé pour le rééquilibrage. Le gradient de 66 min utilisé pour la séparation de groupe des oxylipines estérifiées comporte les paliers suivants : 0-10 min, 20 % B isocratique ; 10-35 min, 20-100 % B ; 35-50 min, 100 % B isocratique ; 50-55 min, 100-20 % B ; 55-60 min, 20 % B isocratique ; 60-66 min, 20 % B (rééquilibrage). Après 10 min à 0,18 ml.min⁻¹, le débit augmente linéairement jusqu'à 0,36 ml.min⁻¹ en 25 min. Ce débit est maintenu durant 20 min avant diminution linéaire jusqu'à 0,18 ml.min⁻¹ en 5 min. Ce dernier débit est également utilisé pour le rééquilibrage.

Les analyses en SP-HPLC des oxylipines libres et estérifiées ont été réalisées sur une colonne Zorbax Rx-SIL (150 x 2,1 mm, taille de particule de 5 µm, Agilent) en utilisant un volume d'injection de 30 µl. La phase mobile isocratique est composée de 95 % de solvant (A) *n*-hexane/TFA (1000:0,2, v/v) et 5 % de solvant (B) *n*-hexane/isopropanol/TFA (900:100:0,1, v/v/v). Le flux de solvant est constant et est respectivement fixé à 0,2 ml.min⁻¹ et 0,1 ml.min⁻¹ pour les analyses des oxylipines libres et estérifiées. L'évolution des absorbances a été enregistrée simultanément à 234 nm (hydroperoxydes et hydroxydes d'acides gras) et 250 nm (éthers divinyles).

La composition énantiomérique des points extrêmes des cinétiques a finalement été analysée en CP-HPLC sur une colonne Chiral OD-H (150 x 2,1 mm, taille de particule de 5 µm, Baker, Phillipsburg, NJ, USA) en utilisant une phase mobile *n*-hexane/isopropanol/TFA 100:5:0,02 (v/v/v). Le volume d'injection est de 10 µl et le débit est constant (0,1 ml.min⁻¹). Le contenu en oxylipines est exprimé en nmoles.g⁻¹ de PF.

2.7 Dosage spectrophotométrique des résidus carbonyles sur protéines

Les protéines sont extraites selon la méthode décrite au point 2.2.2 du chapitre 4 en omettant les étapes de lavage à l'acétone et de solubilisation dans le tampon de réhydratation. La dérivation à la DNPH est réalisée en mélangeant durant 1 heure à RT à l'obscurité 250 µl d'extrait protéique SDS avec 1 ml de DNPH 10 mM dans de l'HCl 2,5 M. Un blanco de dérivation est réalisé en utilisant de l'HCl 2,5 M à la place de la solution de DNPH. Les protéines sont ensuite précipitées par ajout de 250 µl de TCA 100 % m/v et incubations successives durant 5 min à -20 °C et durant 15 min sur glace. Après centrifugation à 16000 g durant 5 min à 4°C, le surnageant est éliminé et les pelotes protéiques sont lavées 3 fois avec 1 ml d'éthanol/acétate d'éthyle (1:1 v/v). Chaque lavage comporte une incubation sur glace de 10 min et une centrifugation à 16000 g durant 5 min à 4°C avant élimination du surnageant. Les pelotes sont ensuite séchées sous flux d'azote et solubilisées sous agitation à RT pendant 30 min dans 1 ml de tampon de réhydratation (voir point 2.2.1 du chapitre 4). La concentration en carbonyles est calculée sur base de l'absorbance à 370 nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 22000 M⁻¹.cm⁻¹. Ces mesures sont rapportées aux quantités protéiques (nanomoles de carbonyles / mg de protéines) après dosage des extraits

dissous dans le tampon de réhydratation selon la méthode explicitée au point 2.2.3 du chapitre 4, en utilisant un volume d'extrait de 10 μ l. Trois répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque point des cinétiques des cv. Désirée et Bintje récoltés en 2004.

2.8 Traitement statistique des données

Après vérification des conditions d'application, chaque groupe de données lié à un dosage a fait l'objet d'une analyse de la variance à un critère de classification (le PAI). Les valeurs du paramètre p permettant de tester l'hypothèse nulle d'égalité des moyennes sont présentées graphiquement. En cas d'influence significative du vieillissement sur la variable étudiée ($p \leq 0,05$), les moyennes sont classées qualitativement selon le test de Newman et Keuls. Des valeurs non significativement différentes ($\alpha = 5\%$) partagent une même lettre.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Evolution de la concentration en protéines solubles

L'évolution des concentrations en protéines solubles est présentée à la Figure 46. Aucune influence significative du vieillissement n'a pu être mise en évidence pour les récoltes Désirée et Bintje effectuées en 2004. La concentration protéique des tubercules Bintje récoltés en 2005 passe par contre par un minimum transitoire avant d'atteindre à nouveau des valeurs proches de la concentration initiale ($p = 0,002$).

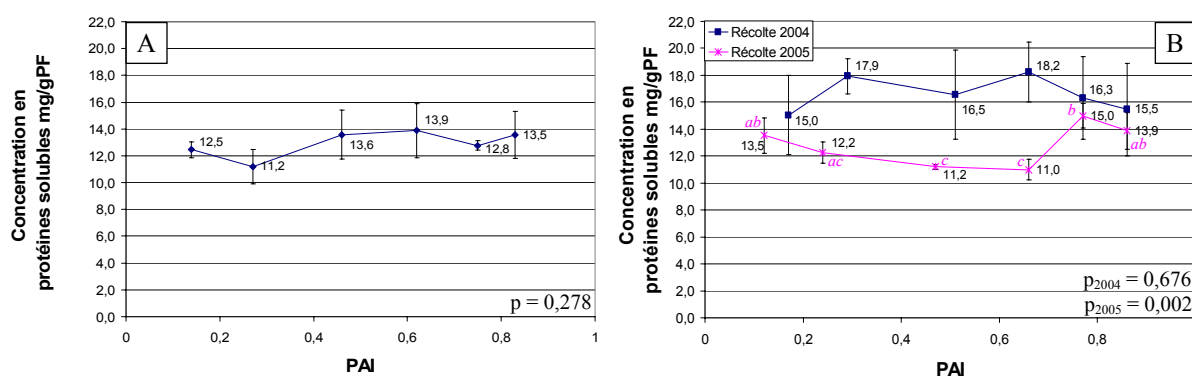


Figure 46. Evolution des concentrations en protéines solubles au cours du vieillissement des cv. Désirée (A) et Bintje (B). Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 extractions indépendantes +/- écart-type. Les valeurs du paramètre p permettant de tester l'hypothèse nulle d'égalité des moyennes sont également présentées graphiquement. En cas d'influence significative du vieillissement sur la concentration protéique ($p \leq 0,05$), les moyennes sont classées selon le test de Newman et Keuls. Des valeurs non significativement différentes ($\alpha = 5\%$) partagent une même lettre.

Ces tendances diffèrent de celles observées par KUMAR & KNOWLES (1993a). Ces auteurs ont cependant réalisé un stockage de tubercules du cv. Russet Burbank à 4 °C durant 30 mois en évaluant la concentration protéique sur base de la matière sèche. Ces options méthodologiques permettent d'expliquer les différences observées. Par ailleurs, la décroissance de la concentration protéique (par g de poids sec) relevée par ces auteurs est faible en début de stockage. Pratiquement parlant, les différentes activités enzymatiques mesurées ci-dessous sont exprimées de façon spécifique par mg de protéines solubles. Seule la récolte de Bintje réalisée en 2005 nécessitera de nuancer les conclusions tirées.

3.2 Capacité globale d'élimination des radicaux libres

Etant donné que la capacité d'élimination des ROS est contrôlée par des enzymes antioxydantes et des antioxydants non enzymatiques de faible poids moléculaire, une mesure globale de l'évolution de ce pouvoir antioxydant présente un intérêt. Pour ce faire, de nombreuses méthodologies ont été mises au point (HUANG *et al.*, 2005). Malgré certaines critiques émises (KOHEN & BERRY, 1997), ce paramètre est fréquemment considéré comme un indicateur utile de la capacité d'un système biologique à réguler les dégâts dus aux ROS. Certains auteurs considèrent même que cette mesure est plus valable que l'évaluation individuelle de chaque antioxydant (GHISELLI *et al.*, 2000 ; LLESUY *et al.*, 2001). Dans notre étude, une mesure de la capacité d'élimination globale de radicaux libres a été effectuée en utilisant la DPPH comme radical libre stable sur les tubercules Désirée et Bintje des récoltes 2004 (Figure 47). Les échantillons ont été incubés dans la solution de DPPH pendant 4 h afin que chaque antioxydant puisse effectivement réagir avec ce radical libre.

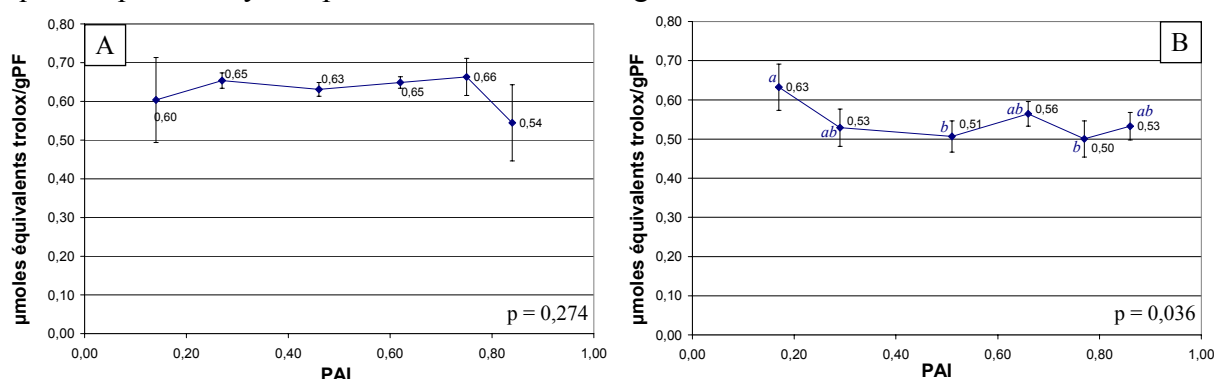


Figure 47. Evolution de la capacité d'élimination de radicaux libres au cours du vieillissement pour les cv. Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Aucune modification globale significative du pouvoir antioxydant n'a été mise en évidence pour les tubercules Désirée récoltés en 2004 ($p = 0,274$). Les tubercules Bintje montrent par contre une décroissance faiblement significative ($p = 0,036$) de leur capacité d'élimination des radicaux libres au cours du vieillissement (de 0,63 à 0,53 µmoles d'équivalents trolox / g de PF). L'évolution du pouvoir antioxydant global est donc peu marquée chez les 2 cv. étudiés. Cette méthode d'évaluation du pouvoir antioxydant est en outre peu sensible pour l'évaluation des antioxydants hydrophiles (GIL *et al.*, 2000), ce qui peut biaiser les résultats obtenus ou masquer des tendances individuelles. Afin de mettre en évidence d'éventuels effets compensatoires ou synergiques entre antioxydants, une étude détaillée des différents composants du système antioxydant a donc été entreprise.

3.3 Antioxydants enzymatiques

3.3.1 Evolution de l'activité SOD

L'activité SOD constitue une première ligne de défense contre les anions superoxydes. Elle n'élimine pas ces radicaux libres, mais les dismute en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. Ces enzymes sont surtout présentes dans le cytosol, les mitochondries et les peroxysomes des cellules du tubercule.

L'évolution de l'activité SOD en fonction de l'âge physiologique a été mesurée spectrophotométriquement sur les tubercules des récoltes 2004 et 2005 des cv. Désirée et Bintje (Figure 48). Cette méthode de dosage possède une reproductibilité moyenne, ce qui peut nuire à la qualité de l'analyse statistique des résultats. Néanmoins, des augmentations nettes en fin de vieillissement ont pu être mises en évidence pour les récoltes 2004 et 2005

des cv. Désirée et Bintje, respectivement. Une phase plateau transitoire pour les valeurs de PAI comprises entre 0,46 et 0,66 est également discernable graphiquement, mais elle n'est pas statistiquement significative. La cinétique de vieillissement des tubercules Bintje récoltés en 2004 ne présente pas de variation significative en fonction de l'âge physiologique. Graphiquement, après une décroissance initiale, l'activité SOD croît jusqu'à atteindre des valeurs supérieures aux valeurs mesurées en début de vieillissement (86,1 vs 80,9 unités/mg de protéines).

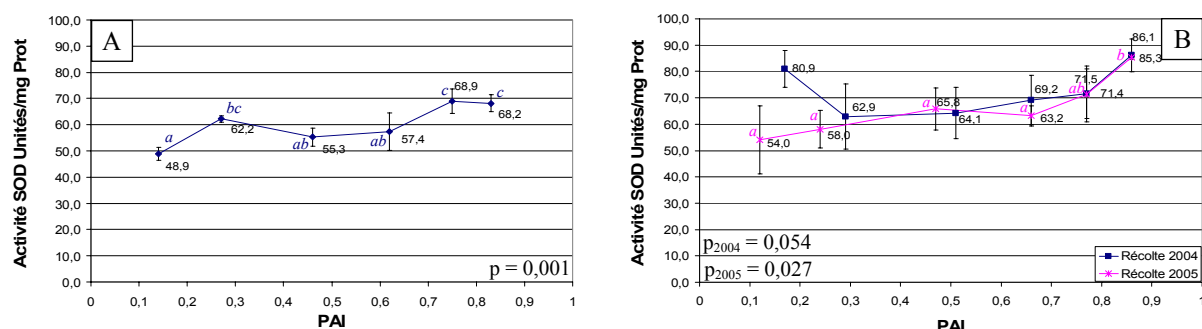


Figure 48. Evolution de l'activité SOD en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004 et 2005. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus par SPYCHALLA & DESBOROUGH (1990a) et REVERBERI *et al.* (2001). Ces différentes tendances constituent une réponse typique à un stress oxydatif (SMIRNOFF, 1995) se développant surtout pour des valeurs de PAI supérieures à 0,7. L'activité SOD doit cependant être couplée aux activités APX et CAT afin d'éliminer le peroxyde d'hydrogène qu'elle génère.

3.3.2 Evolution de l'activité APX

Dans les tubercules de pomme de terre, les APX sont des enzymes principalement cytosoliques qui éliminent l'H₂O₂ en utilisant l'AsA comme co-substrat réducteur. Elles sont surtout impliquées dans la régulation des ROS dans un contexte signal.

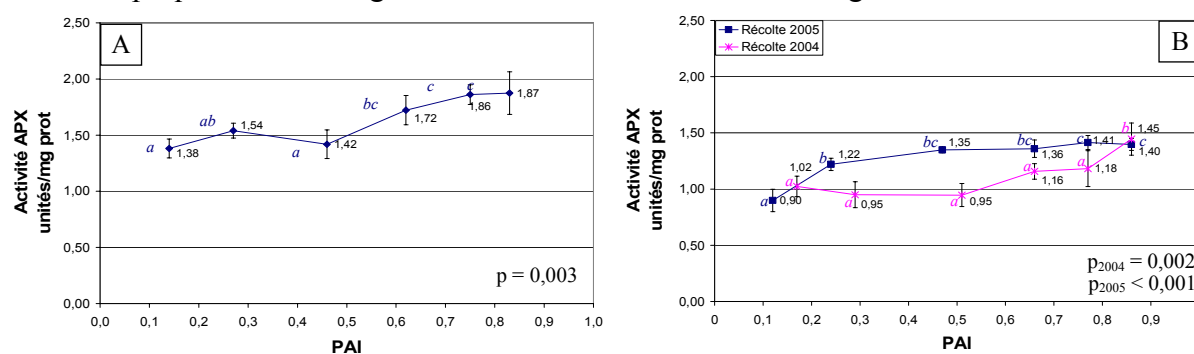


Figure 49. Evolution de l'activité APX en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004 et 2005. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Les mesures complémentaires d'oxydation non enzymatique et enzymatique (via l'ascorbate oxydase) de l'ascorbate n'ont pas permis de mettre en évidence de tendance significative au cours du vieillissement, les pentes des droites calculées restant très proches de 0. Ces valeurs ont donc été négligées dans les calculs de l'activité APX. Les trois cinétiques d'expression étudiées se caractérisent toutes par une augmentation significative de l'activité APX au cours du vieillissement, les tendances observées devant être nuancées en fonction de l'année de production et de la variété (Figure 49). Les récoltes réalisées en 2004

manifestent une tendance nette à l'augmentation, surtout pour les valeurs de PAI supérieures à 0,6. Les tubercules Bintje récoltés en 2005 possèdent cependant un profil d'expression de l'activité APX différent. Ce profil se caractérise par une augmentation initiale rapide suivie d'une tendance à la hausse plus faible, mais constante.

Les résultats publiés sur l'évolution de l'APX au cours du stockage de tubercules de pomme de terre sont contradictoires (DIPIERRO & DE LEONARDIS, 1997 ; MIZUNO *et al.*, 1998 ; KAWAKAMI *et al.*, 2000 ; ZABROUSKOV *et al.*, 2002). La tendance à l'augmentation que nous avons observée est cependant cohérente avec les résultats obtenus par KAWAKAMI *et al.*, (2000) et ZABROUSKOV *et al.* (2002). Cette augmentation généralisée de l'activité APX semble constituer une réponse à un stress oxydatif. Cette activité est en fait régulée par la disponibilité en ascorbate et les concentrations en ROS, un environnement cellulaire plus oxydant se traduisant par une surexpression de cette activité (SMIRNOFF, 1995 ; MITTLER & POULOS, 2005). Ces résultats devront être mis en parallèle avec l'évolution de la concentration en AsA, afin d'évaluer l'efficacité physiologique de cette activité.

3.3.3 Evolution de l'activité POX colorée à la diaminobenzidine

Le dosage de l'activité POX a été réalisé sur gel natif en l'absence d'AsA, à l'aide d'une coloration spécifique à la diaminobenzidine. Les résultats détaillés de l'expression des isoenzymes sont présentés au point 3.3.5. Les résultats de la Figure 50 ont été produits en analysant en densitométrie les profils de migration obtenus en triplicat sur chaque gel.

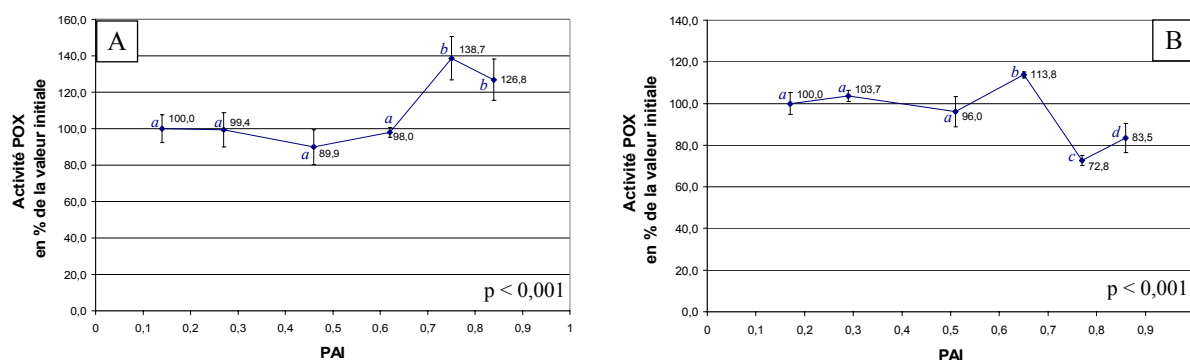


Figure 50. Evolution de l'activité POX colorée à la diaminobenzidine en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004. Pour chaque point de la cinétique, les intensités des bandes colorées ont été additionnées. Les résultats sont exprimés en % de l'intensité totale initiale. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Une distinction nette s'opère ici entre cultivars récoltés en 2004. Alors que l'activité POX de Désirée augmente nettement pour les valeurs de PAI supérieures à 0,62, celle de Bintje décroît sensiblement dès qu'une valeur de PAI de 0,77 est atteinte. Ces résultats contrastés sont statistiquement significatifs et ne rejoignent que partiellement les données publiées par DIPIERRO & DE LEONARDIS (1997) et ZABROUSKOV *et al.* (2002). Les résultats publiés sur une durée de stockage de 9 mois semblent en effet indiquer que cette activité est relativement stable au cours du temps. Afin d'interpréter au mieux ces résultats, il importe de prendre en considération la grande diversité des POX végétales. L'utilisation d'un substrat unique de révélation colorimétrique ne permet pas de tenir compte des spécificités de chacune des isozymes exprimées dans le tubercule. Leurs contextes d'expression ainsi que les rôles physiologiques qu'elles assument sont multiples et ne se limitent pas à un rôle de défense face aux ROS (J.-F. HAUSMAN, com. pers.). Une caractérisation plus poussée de ces enzymes devrait donc être entreprise afin de mieux comprendre leur implication dans le processus de vieillissement.

3.3.4 Evolution de l'activité CAT

Les catalases sont des enzymes tétramériques impliquées dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène. L'affinité des CAT pour l' H_2O_2 suggère que ces enzymes sont principalement actives dans un contexte de stress oxydatif. Elles se situent majoritairement dans les peroxysomes et les glyoxysomes.

Pour chacune des trois cinétiques de vieillissement étudiées, une augmentation très significative de l'activité CAT est mise en évidence pour des valeurs de PAI supérieures à 0,7 (Figure 51). Une décroissance initiale modérée est également mesurée pour les tubercules des cv. Désirée et Bintje récoltés en 2004.

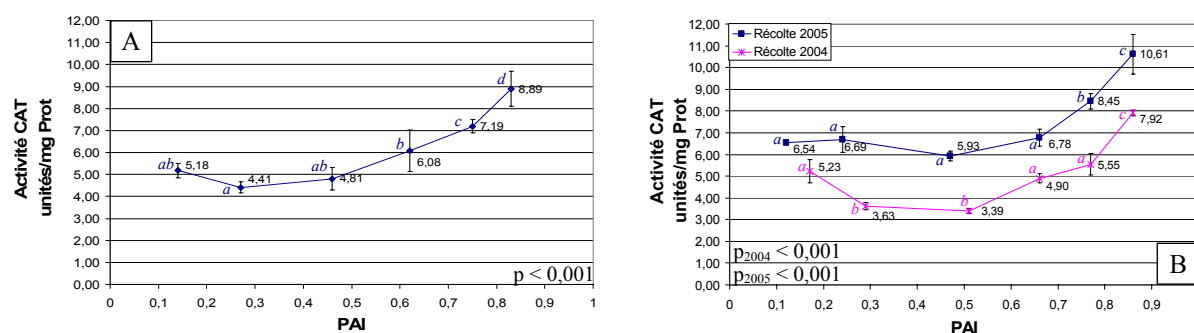


Figure 51. Evolution de l'activité CAT en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004 et 2005. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Ces tendances à l'augmentation de l'activité CAT au cours du vieillissement sont cohérentes avec les données publiées sur pomme de terre (SPYCHALLA & DESBOROUGH, 1990a ; DIPIERRO & DE LEONARDIS, 1997 ; MIZUNO *et al.*, 1998 ; REVERBERI *et al.*, 2001) et traduiraient une réponse marquée à un stress oxydatif générant des concentrations modérées en H_2O_2 (SMIRNOFF, 1995 ; FEIERABEND, 2005 ; DEL RIO *et al.*, 2006). L'activité CAT suit une évolution similaire à celle de l'APX. En cas de déficience en AsA, ces deux types d'enzymes pourraient d'ailleurs agir – au moins dans une certaine mesure – selon un mécanisme compensatoire (DESIKAN *et al.*, 2005). Des plantes knockout-APX1 d'*Arabidopsis* ont ainsi manifesté une activité CAT accrue en cas de stress oxydatif (MITTLER & POULOS, 2005).

3.3.5 Approche semi-quantitative complémentaire utilisant la native-PAGE couplée à des colorations spécifiques (Annexe 4)

Complémentairement aux dosages spectrophotométriques des activités enzymatiques antioxydantes, une approche basée sur la native-PAGE a été développée afin d'évaluer si les variations globales observées résultaient de variations qualitatives (présence/absence) ou quantitatives spécifiques à certaines isozymes. Ces résolutions électrophorétiques des extraits protéiques ont été réalisées en triplicat pour les cinétiques de vieillissement des cv. Désirée et Bintje récoltés en 2004.

Les résultats obtenus pour le cv. Désirée sont présentés dans le Tableau 14. Pour l'activité SOD, au moins 9 isozymes distinctes peuvent être détectées sur gel. Deux variations qualitatives sont présentes pour des bandes de faible intensité. Une variation quantitative a également été mise en évidence sur une bande CuZnSOD d'intensité importante. Pour l'activité APX, une seule bande principale a été observée, ce qui suggère qu'un seul gène *apx* est exprimé dans le tubercule. L'intensité de cette isozyme augmente significativement au cours du vieillissement et son Rf tend à diminuer. En ce qui concerne

l'activité POX, au moins 11 isozymes différentes sont détectées sur gel natif. La complexité de ce zymogramme peut être expliquée par le fait que la diaminobenzidine utilisée pour colorer le gel est un substrat faiblement spécifique pour les POX. Une variation qualitative ainsi que deux variations quantitatives d'isozymes sont illustrées dans le Tableau 14 (tendance à l'augmentation). Finalement, pour l'activité CAT, pas moins de 21 isozymes ont pu être détectées sur gel. La complexité de ce zymogramme résulte (1) de la présence de 3 gènes distincts encodant des catalases végétales (WILLEKENS *et al.*, 1995), (2) de la structure hétérotétramérique des catalases, (3) de la nature tétraploïde des cv. utilisés dans cette étude et (4) de modifications post-traductionnelles potentielles. Une variation qualitative remarquable a pu être mise en évidence spécifiquement pour les valeurs de PAI supérieures à 0,62. Une variation quantitative mineure a également été mise en évidence.




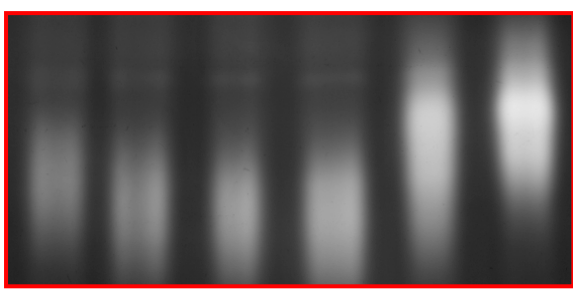

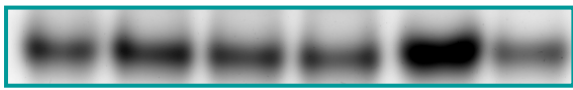
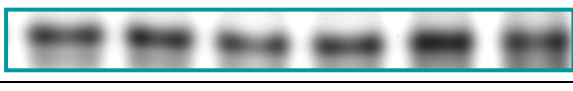

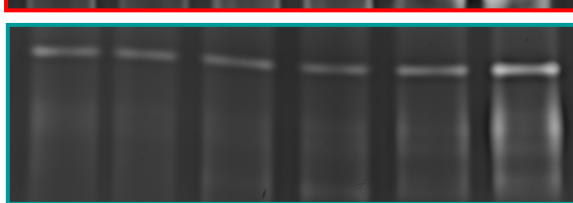
Cultivar	Activité	Nombre d'isozymes	PAI					
			0,14	0,27	0,46	0,62	0,75	0,83
Désirée	SOD	Au moins 9 MnSOD CuZnSOD						
								
								
	APX	Au moins 5 dont une isozyme majeure						
POX	Au moins 11 dont plusieurs présentant des variations mineures							
								
								
CAT	Au moins 21							
								

Tableau 14. Variations qualitatives (cadre rouge) et quantitatives (cadres bleus) spécifiques à certaines isozymes du cv. Désirée récolté en 2004. Pour chaque activité enzymatique, le nombre total d'isozymes est présenté ainsi que les variations principales observées au cours du vieillissement. Les classes des isozymes de SOD ont été déterminées par inhibition spécifique à l'aide de KCN ou d'H₂O₂. Les gels natifs complets sont présentés en annexe 4.

Les résultats obtenus pour le cv. Bintje sont présentés dans le Tableau 15. Aucun changement qualitatif ou quantitatif significatif n'a pu être mis en évidence pour les activités SOD et CAT, malgré un nombre d'isozymes résolues respectif de 7 et 14. Ce résultat peut être lié à certaines caractéristiques inhérentes à la technique utilisée (reproductibilité moyenne, sensibilité et intervalle de linéarité). Une dégradation des extraits protéiques en cours de migration est cependant peu probable, toutes les étapes étant effectuées à 4 °C ou sur glace. Deux variations quantitatives significatives ont néanmoins été mises en évidence pour les activités APX et POX colorée à la diaminobenzidine.

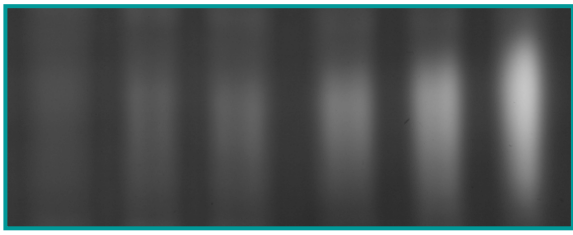
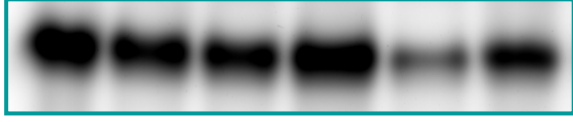
Cultivar	Activité	Nombre d'isozymes	PAI					
			0,17	0,29	0,51	0,66	0,77	0,86
Bintje	SOD	Au moins 7	Pas de changement quantitatif ou qualitatif détecté dans l'activité des isozymes résolues					
	APX	Au moins 11 dont une isozyyme majeure						
	POX	Au moins 11 dont plusieurs présentant des variations mineures						
	CAT	Au moins 14	Pas de changement quantitatif ou qualitatif détecté dans l'activité des isozymes résolues					

Tableau 15. Variations qualitatives (cadre rouge) et quantitatives (cadres bleus) spécifiques à certaines isozymes du cv. Bintje récolté en 2004. Pour chaque activité enzymatique, le nombre total d'isozymes est présenté ainsi que les variations principales observées au cours du vieillissement. Les gels natifs complets sont présentés en annexe 4.

L'ensemble de ces résultats nous permet de compléter les données obtenues au niveau global par spectrophotométrie. Les modifications d'activité observées sont complexes et impliquent de nombreuses isozymes subissant des variations qualitatives ou quantitatives individuelles. Des variations opposées ont été observées pour certaines isozymes de la SOD (Tableau 14). Un effet compensatoire existe donc entre isozymes distinctes *in vitro*, mais n'est peut-être pas présent *in vivo* du fait de la compartimentation cellulaire (WILLEKENS *et al.*, 1995). La localisation subcellulaire des différentes isozymes résolues reste cependant à évaluer.

3.4 Antioxydants non enzymatiques

3.4.1 Evolution des contenus en ascorbate réduit et oxydé

L'AsA est quantitativement l'antioxydant non enzymatique le plus important. Il peut inactiver enzymatiquement ou non enzymatiquement la plupart des ROS. Cette oxydation génère du DHA pouvant être saponifié et sortir ainsi du cycle de Halliwell-Asada.

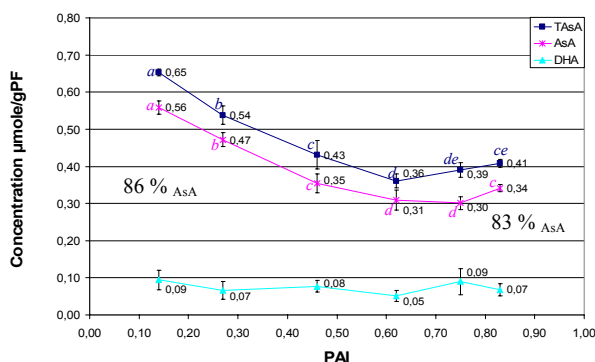


Figure 52. Evolution des concentrations en TAsA, AsA et DHA au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004. Les valeurs présentées sont les moyennes de 4 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes. $p_{TAsA} < 0,001$; $p_{AsA} < 0,001$; $p_{DHA} = 0,153$.

L'évolution du contenu en TAsA, AsA et DHA a été étudiée au cours du vieillissement des tubercules Désirée et Bintje récoltés en 2004 et 2005 (Figures 52 et 53). Ces trois cinétiques présentent les mêmes tendances significatives. Le contenu en TAsA décroît très significativement en fonction de l'âge physiologique avant d'atteindre un plancher pour des valeurs de PAI supérieures à 0,6 (récolte 2004) ou 0,5 (récolte 2005). Ce contenu en TAsA est majoritairement constitué d'AsA, quel que soit l'âge physiologique des tubercules. L'AsA représente respectivement 83, 73 et 81 % du contenu en TAsA pour les tubercules Désirée et Bintje récoltés en 2004 et 2005 et stockés pendant 270 jours (PAI > 0,8). Aucune accumulation de DHA n'a été mesurée au cours du vieillissement, les valeurs mesurées étant d'ailleurs proches de la limite de sensibilité de la méthode employée (0,044 µmoles / g de PF, KAMPFENKEL *et al.*, 1994).

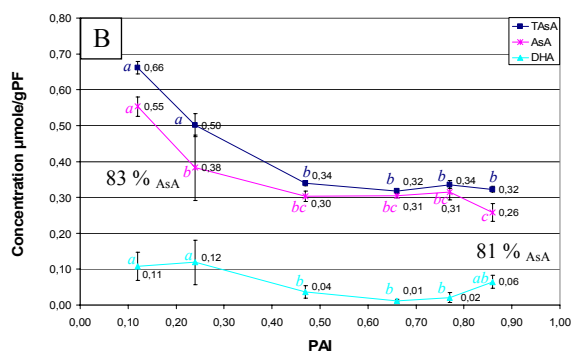
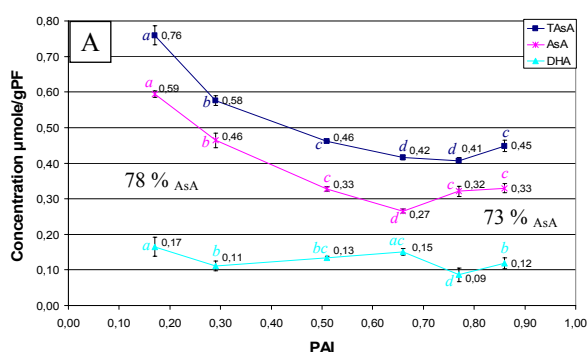


Figure 53. Evolution des concentrations en TAsA, AsA et DHA au cours du vieillissement de tubercules du cv. Bintje récoltés en 2004 (A) et 2005 (B). Les valeurs présentées sont les moyennes de 4 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes. Pour la récolte 2004, $p_{TAsA} < 0,001$; $p_{AsA} < 0,001$; $p_{DHA} < 0,001$. Pour la récolte 2005, $p_{TAsA} < 0,001$; $p_{AsA} < 0,001$; $p_{DHA} < 0,001$.

Les résultats obtenus sont cohérents avec les données publiées (DIPIERRO & DE LEONARDIS, 1997 ; MIZUNO *et al.*, 1998). Les modifications observées au cours du vieillissement sont similaires à celles observées lors d'un stress oxydatif poussé (SMIRNOFF, 1995), l'AsA pouvant être consommé enzymatiquement (par l'APX) ou non enzymatiquement. Aucune modification significative n'a été mesurée pour l'activité ascorbate oxydase (voir point 3.3.2 du présent chapitre). Cette déplétion du contenu en AsA peut avoir plusieurs conséquences importantes. L'activité APX utilise en effet l'AsA comme donneur d'électrons. En outre, ces enzymes sont labiles en l'absence d'ascorbate. Dans le cas de figure étudié, la diminution du contenu en AsA est importante (perte de plus de 40 %). On peut donc s'attendre à une diminution de la disponibilité de l'AsA pour l'activité APX, sans que cela entraîne des dégradations enzymatiques.

3.4.2 Evolution du contenu en glutathion réduit et oxydé

Le glutathion est le composé thiol soluble majeur des cellules végétales. Au même titre que l'AsA, il peut réduire enzymatiquement ou non enzymatiquement la plupart des ROS, son oxydation produisant du GSSG. Le glutathion réduit (GSH) intervient également dans le recyclage de l'AsA au départ de DHA.

L'évolution du contenu en glutathion total, en GSH et en GSSG a été mesurée au cours du vieillissement des tubercules des cv. Désirée et Bintje récoltés en 2004 et 2005 (Figures 54 et 55). La concentration en glutathion total augmente systématiquement en fonction de l'âge physiologique avant d'atteindre un plateau et de décroître pour des valeurs de PAI supérieures à 0,7. Le GSH suit également une évolution similaire. Le statut redox du rapport GSH/GSSG augmente pour le cv. Désirée en 2004, aucune accumulation de GSSG n'accompagnant la diminution finale de concentration en GSH.

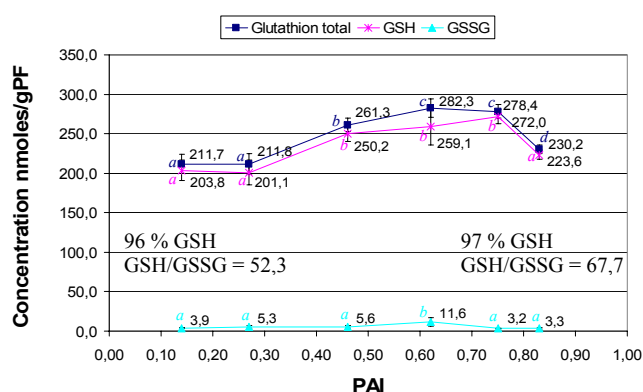


Figure 54. Evolution des concentrations en glutathion total, en GSH et en GSSG au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004. Les valeurs présentées sont les moyennes de 4 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes. $p_{\text{Glutathion total}} < 0,001$; $p_{\text{GSH}} < 0,001$; $p_{\text{GSSG}} = 0,002$. Les pourcentages de GSH indiqués sur les graphiques correspondent aux valeurs extrêmes des cinétiques.

Le rapport GSH/GSSG diminue par contre fortement pour les tubercules Bintje récoltés en 2004 et 2005. Pour ce cultivar, la diminution finale de la concentration en GSH s'accompagne d'une accumulation significative de GSSG. Le contenu en glutathion total des 2 cv. étudiés passe donc par un maximum transitoire au cours du vieillissement. Cette évolution s'accompagne par ailleurs d'une diminution marquée du statut redox du couple GSH/GSSG pour le cv. Bintje.

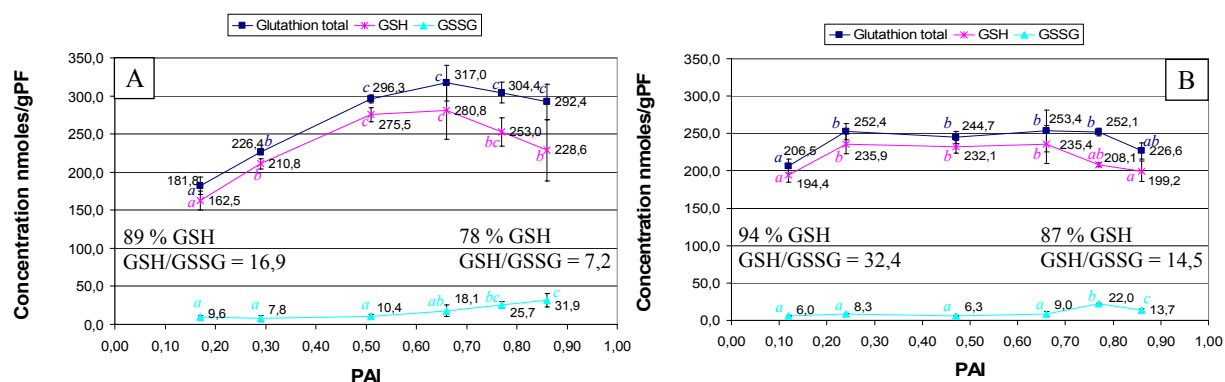


Figure 55. Evolution des concentrations en glutathion total, en GSH et en GSSG au cours du vieillissement de tubercules du cv. Bintje récoltés en 2004 (A) et 2005 (B). Les valeurs présentées sont les moyennes de 4 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes. Pour la récolte de 2004, $p_{\text{Glutathion total}} < 0,001$; $p_{\text{GSH}} < 0,001$; $p_{\text{GSSG}} < 0,001$. Pour la récolte de 2005, $p_{\text{Glutathion total}} = 0,001$; $p_{\text{GSH}} = 0,001$; $p_{\text{GSSG}} < 0,001$. Les pourcentages de GSH indiqués sur les graphiques correspondent aux valeurs extrêmes des cinétiques.

Les tendances mesurées pour Bintje sont cohérentes avec celles publiées par KUMAR & KNOWLES (cv. Russet Burbank, 1996b). L'absence d'accumulation de GSSG chez Désirée observée au cours de ce travail peut s'expliquer aisément par la différence de durée de stockage utilisée (30 mois chez ces auteurs vs 9 mois pour notre étude).

Des conditions physiologiques oxydantes diminuent initialement le rapport GSH/GSSG tout en activant la biosynthèse de GSH (TAUSZ *et al.*, 2004 ; FOYER *et al.*, 2005). Aussi, le système biologique étudié ici semble bien répondre à une génération accrue de ROS d'autant plus marqué que l'accumulation de GSSG est importante. A l'opposé de nombreux couples redox comme l'AsA/DHA et le NADPH/NADP, le potentiel redox du glutathion dépend à la fois du rapport GSH/GSSG et de la concentration absolue en glutathion. Le terme dépendant de la concentration dans l'équation de Nernst est de second ordre pour le GSH et de premier ordre pour le GSSG. L'accumulation de GSH peut donc compenser le changement de potentiel redox causé par une diminution du rapport GSH/GSSG (FOYER *et al.*, 2005).

En tant qu'antioxydant, le glutathion possède une affinité moyenne pour l'H₂O₂. La réduction dépendant du GSH n'est donc pas la voie principale d'élimination du peroxyde d'hydrogène. C'est en fait l'ascorbate qui joue ce rôle antioxydant. Le glutathion intervient donc indirectement dans ce processus métabolique en permettant le recyclage de l'AsA par la DHA réductase (NOCTOR *et al.*, 1998).

3.4.3 Evolution du contenu en caroténoïdes

Les caroténoïdes constituent une classe d'antioxydants lipophiles importants. Ils sont impliqués dans la protection des membranes contre les attaques oxydatives des ROS. Leur rôle protecteur s'opère en interaction avec l'AsA et les tocophérols (SMIRNOFF, 2005).

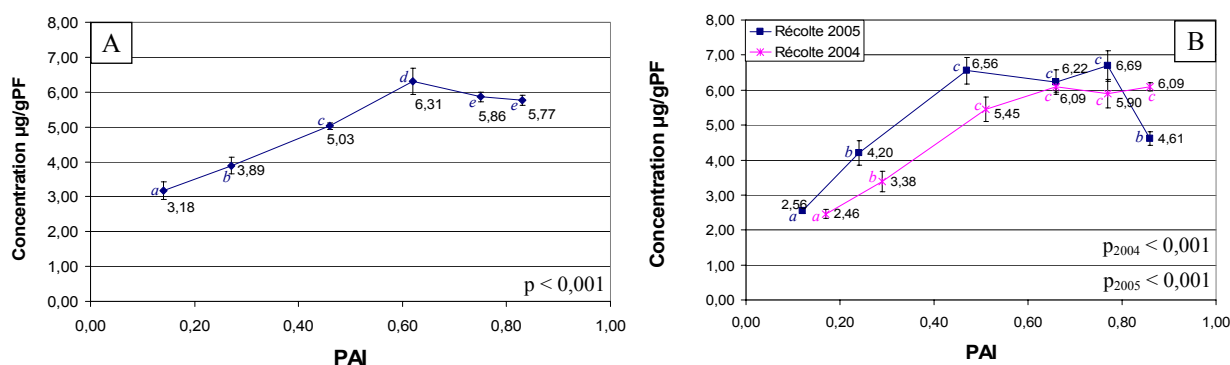


Figure 56. Evolution de la concentration en caroténoïdes totaux en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004 et 2005. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Les trois cinétiques de vieillissement étudiées se caractérisent par une augmentation initiale rapide du contenu en caroténoïdes suivie d'une phase stationnaire pour les valeurs de PAI supérieures à 0,5 (Figure 56). La récolte Bintje de 2005 présente par ailleurs une décroissance finale lorsque le PAI dépasse 0,77.

Nos résultats diffèrent des valeurs mesurées par MORRIS *et al.* (2004). Ces auteurs ont cependant exprimé les concentrations en caroténoïdes totaux par gramme de poids sec et non par gramme de PF. Les tendances mesurées variaient également en fonction des cultivars étudiés. En raison de leur rôle physiologique, l'augmentation de concentration en caroténoïdes totaux (par gramme de PF) que nous avons mesurée peut permettre aux tubercules de limiter les dégâts membranaires subis au cours du vieillissement. Ils peuvent à

ce titre réduire la vitesse de vieillissement de graines en limitant la peroxydation lipidique (HOWITT & POGSON, 2006).

3.4.4 Evolution du contenu en composés phénoliques et métabolites apparentés

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires présents sous forme libre ou liée aux parois des cellules végétales. Plus de 50 % de ces composés se retrouvent dans l'épiderme du tubercule de pomme de terre. Leur structure chimique est idéale pour inactiver les ROS ; ils sont d'ailleurs impliqués dans les cascades d'élimination du peroxyde d'hydrogène par couplage redox avec l'ascorbate et la MDHAR (TAKAHAMA & ONIKI, 1997).

Les composés phénoliques sont de véritables outils de la vie cellulaire, indispensables à son fonctionnement harmonieux et contrôlé (HARTMANN, 1992). Au même titre que les autres métabolites secondaires, ils présentent une répartition très inégale chez les différentes espèces et variétés végétales (MACHEIX *et al.*, 2005). Les deux acides aminés aromatiques phénylalanine et tyrosine sont à l'origine de la formation de la plupart des composés phénoliques. Ils sont eux-mêmes issus de la voie de l'acide shikimique. La désamination de la phénylalanine par la phénylalanine ammonialyase (PAL) conduit à la formation d'acide *trans*-cinnamique, précurseur de la voie des phénylpropanoïdes, permettant la formation des acides hydroxycinnamiques (MACHEIX *et al.*, 2005). L'acide caféique fait partie de ces acides en C₆-C₃. Il est rarement présent à l'état libre et est souvent combiné à d'autres molécules organiques pour former par exemple des esters avec les acides quinique (acide chlorogénique [acide 5-*O*-caféoylquinique] et ses isomères néochlorogénique [3-*O*-] et cryptochlorogénique [4-*O*-], SHAKYA & NAVARRE, 2006) et tartrique (acide caftarique = acide caféoyl tartrique). Les acides hydroxycinnamiques existent aussi fréquemment sous forme d'esters multiples comme l'acide dichlorogénique (MACHEIX *et al.*, 2005).

En utilisant une méthode d'échantillonnage tissulaire nous permettant d'assurer une représentation pondérée des différents tissus du tubercule (épiderme y compris), l'évolution des acides aminés précurseurs et des composés phénoliques majeurs présents dans les tubercules des cv. Désirée et Bintje récoltés en 2004 et 2005 a été mesurée au cours du processus de vieillissement physiologique. Globalement, les tendances observées sont cohérentes d'un cv. à l'autre et entre années de production.

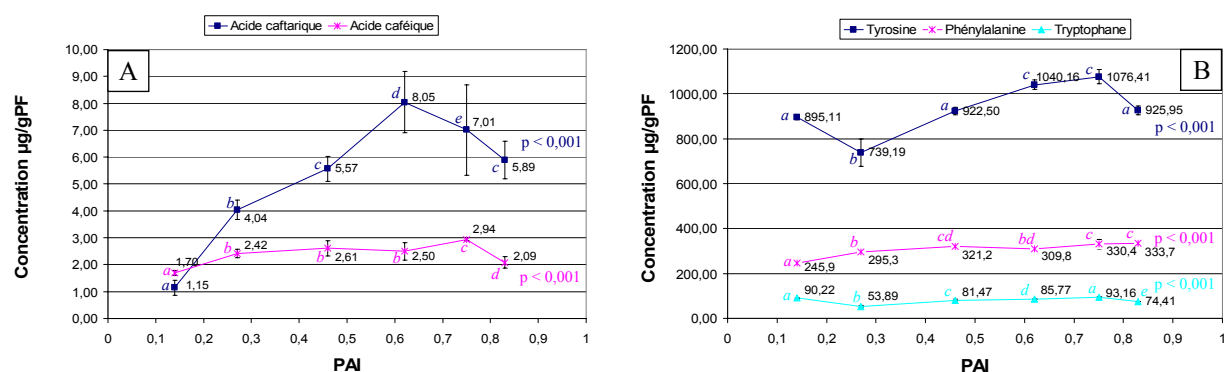


Figure 57. Evolution des concentrations en acides caftarique et caféique (A) et en tyrosine, phénylalanine et tryptophane (B) au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004. Les valeurs présentées sont les moyennes de 6 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Pour le cv. Désirée, la concentration en tyrosine augmente constamment après une décroissance initiale. En fin de vieillissement, pour des valeurs de PAI supérieures à 0,8, cette concentration a tendance à diminuer pour atteindre des valeurs proches des valeurs initiales. La concentration en phénylalanine augmente constamment au cours du

vieillessement pour atteindre une valeur finale de 333,7 µg/gPF. La concentration en tryptophane diminue initialement avant de subir une croissance continue jusqu'à des valeurs de PAI égales à 0,75. Sa concentration finale (PAI = 0,83) est cependant inférieure aux valeurs initiales mesurées (Figure 57B).

La concentration en acide caféique subit une augmentation initiale rapide suivie d'une phase plateau se terminant par une décroissance lorsque des valeurs de PAI supérieures à 0,8 sont atteintes (Figure 57A). L'acide caftarique passe quant à lui par un maximum transitoire (8,05 µg/gPF) lorsqu'une valeur de PAI de 0,62 est atteinte.

Une décroissance constante de la concentration en acide chlorogénique a finalement été mesurée au cours du vieillissement. Ce polyphénol est de loin le plus abondant dans nos échantillons (concentration finale = 38,9 µg/gPF). L'évolution des isomères mineurs de cet acide chlorogénique est moins nette, seul l'acide dichlorogénique manifestant une augmentation en fin de vieillissement pour des valeurs de PAI supérieures à 0,7. Les deux autres isomères de l'acide chlorogénique (les acides crypto- et néo- chlorogéniques) voient leur concentration osciller autour d'une valeur moyenne respective de 8,62 et 3,78 µg/gPF (Figure 58).

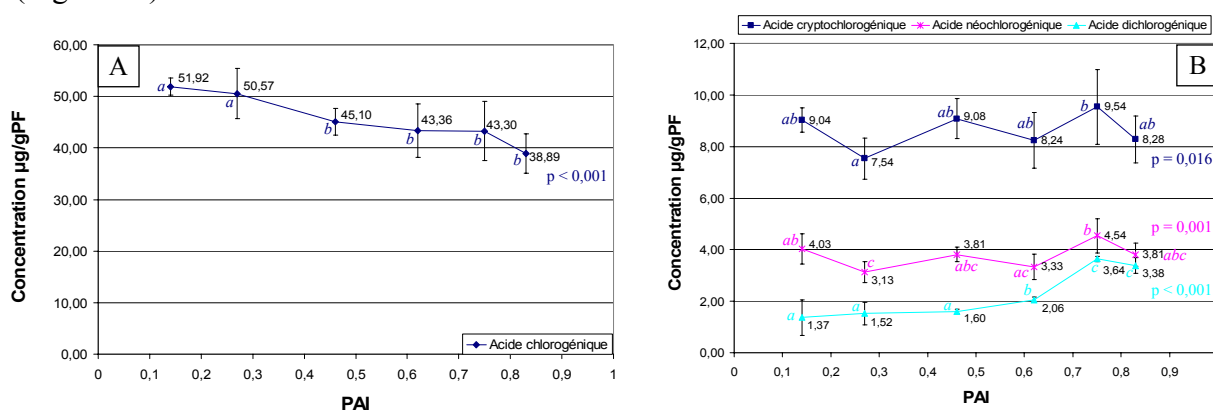


Figure 58. Evolution de la concentration en acides chlorogénique (A), cryptochlorogénique, néochlorogénique et dichlorogénique (B) au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004. Les valeurs présentées sont les moyennes de 6 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Pour le cv. Bintje récolté en 2004 et 2005, les tendances observées pour les acides aminés sont proches de celles mesurées sur les tubercules du cv. Désirée (Figure 59).

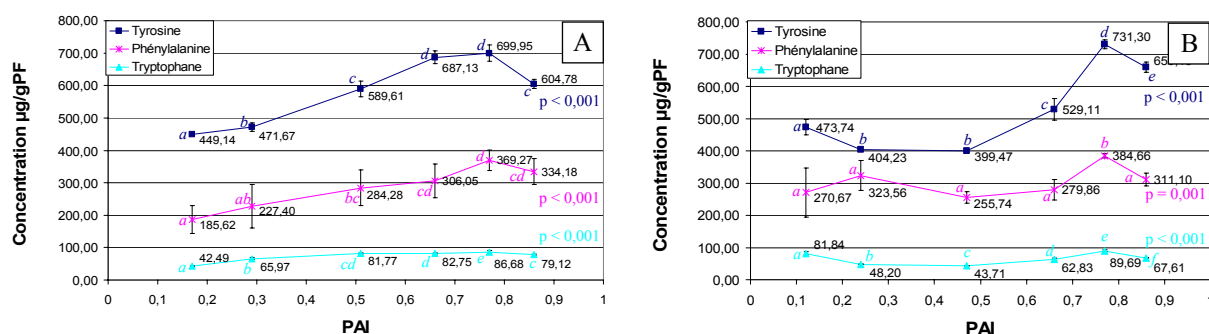


Figure 59. Evolution des concentrations en tyrosine, phénylalanine et tryptophane au cours du vieillissement de tubercules du cv. Bintje récoltés en 2004 (A) et en 2005 (B). Les valeurs présentées sont les moyennes de 6 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Pour la récolte 2005, la concentration en tyrosine augmente ainsi constamment après une décroissance initiale. En fin de vieillissement, pour des valeurs de PAI supérieures à 0,8,

cette concentration a tendance à diminuer. En 2004, la concentration en phénylalanine augmente au cours du vieillissement pour atteindre une valeur finale de 334,18 µg/gPF. L'évolution mesurée sur la récolte 2005 est moins nette et passe aussi par un maximum transitoire lorsqu'une valeur de PAI de 0,77 est atteinte. En 2004, la concentration en tryptophane augmente constamment avant de connaître une légère décroissance finale lorsqu'une valeur de PAI de 0,86 est atteinte. En 2005, la concentration en tryptophane diminue initialement avant de subir une croissance continue jusqu'à des valeurs de PAI égales à 0,77. Sa concentration finale (67,61 µg/gPF, PAI = 0.86) est cependant inférieure aux valeurs initiales mesurées (Figure 59).

La concentration en acide caféique évolue selon une sigmoïde présentant un minimum transitoire pour des valeurs de PAI égales à 0,77. Le contenu en acide caféique double cependant au cours du vieillissement pour atteindre des valeurs proches de 5 µg/gPF en fin de vieillissement (Figure 60B). L'acide caftarique n'a pas été retrouvé chez Bintje.

La concentration en acide chlorogénique diminue au cours du vieillissement pour atteindre une phase plateau lorsque des valeurs de PAI de 0,5 sont atteintes (Figure 60A).

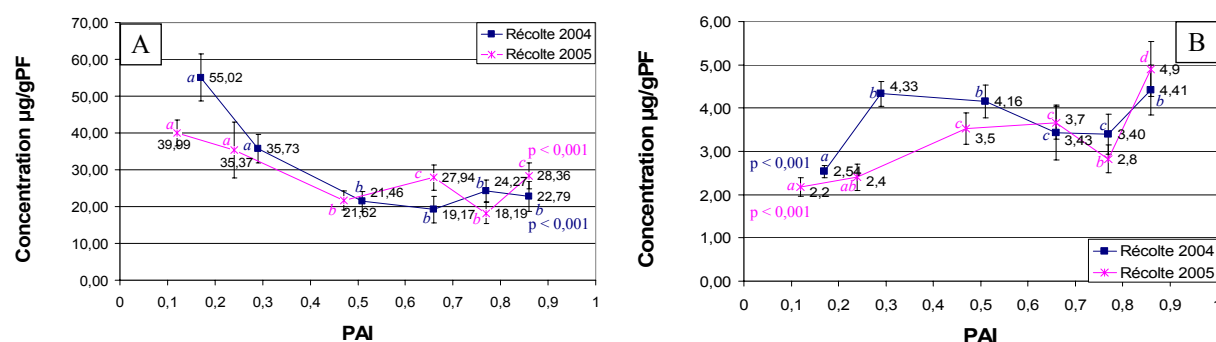


Figure 60. Evolution des concentrations en acides chlorogénique (A) et caféique (B) au cours du vieillissement de tubercules du cv. Bintje récoltés en 2004 et en 2005. Les valeurs présentées sont les moyennes de 6 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

L'évolution des isomères mineurs de l'acide chlorogénique est cohérente entre années de production. La concentration en acide dichlorogénique augmente constamment au cours du vieillissement pour atteindre des valeurs finales supérieures au double des valeurs initiales. L'acide cryptochlorogénique voit sa concentration diminuer rapidement avant d'atteindre une phase plateau pour des valeurs de PAI supérieures à 0,5. L'évolution de l'acide néochlorogénique est moins nette, seule une légère tendance à l'augmentation pouvant être mise en évidence (Figure 61).

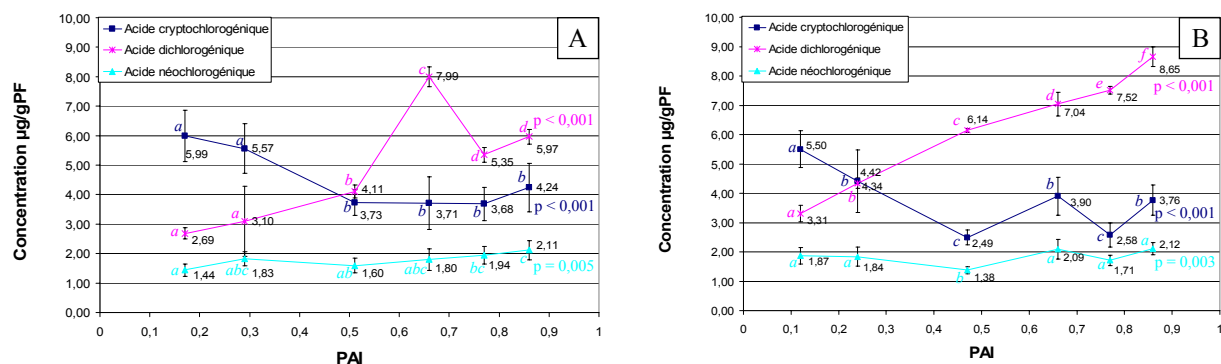


Figure 61. Evolution des concentrations en acides cryptochlorogénique, dichlorogénique et néochlorogénique au cours du vieillissement de tubercules du cv. Bintje récoltés en 2004 (A) et en 2005 (B). Les valeurs présentées sont les moyennes de 6 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Les composés phénoliques interviennent dans le végétal afin de neutraliser les radicaux libres formés à la suite d'un stress ou ceux issus du métabolisme normal. Ils participent donc au maintien *in vivo* de l'équilibre redox et protègent les structures cellulaires sensibles en évitant par exemple la peroxydation lipidique (MACHEIX *et al.*, 2005). Leurs voies de biosynthèse sont activées en cas de stress environnemental (GRACE, 2005).

Les évolutions observées pour les dosages des acides aminés sont cohérentes avec celles publiées par BURTON (1989). Les concentrations en tyrosine et en phénylalanine augmentent globalement au cours du stockage. Cette augmentation de concentration peut résulter d'une activation de la voie de l'acide shikimique ou d'une protéolyse accrue de certaines protéines de stockage, notamment la patatine. Quelle que soit l'origine de cette augmentation, elle permet d'approvisionner en précurseurs les voies de biosynthèse de composés phénoliques. Pour des valeurs de PAI supérieures à 0,8, on note cependant une diminution sensible de ces concentrations chez Bintje, laissant entrevoir des déficiences d'approvisionnement de la voie de biosynthèse à un âge physiologique avancé.

La concentration en acide caféique augmente globalement au cours du vieillissement, les modalités d'évolution variant sensiblement selon le cv. L'acide caféique suit donc assez logiquement l'évolution de ses acides aminés précurseurs. Il est lui-même à l'origine des acides caftarique et chlorogénique par estérification. Tout semble donc indiquer une activation modérée – mais significative – des premières étapes de la voie de biosynthèse au cours du vieillissement physiologique des tubercules. L'accumulation de ces précurseurs pourrait cependant aussi être due à une diminution de la capacité de synthèse des esters correspondants (en aval). L'acide caftarique n'a été détecté que dans les tubercules du cv. Désirée. Son évolution passe par un maximum transitoire pour des valeurs de PAI de 0,62.

L'acide chlorogénique voit par contre sa concentration diminuer au cours du vieillissement pour chacun des 2 cv. étudiés. Cette décroissance se caractérise en outre par une phase plateau pour le cv. Bintje lorsque des valeurs de PAI de 0,5 sont atteintes. Cette phase plateau se retrouve également dans l'évolution du contenu en AsA, ce dernier étant impliqué dans le recyclage des composés phénoliques au départ de leur forme radicalaire phénoxy (SAKIHAMA *et al.*, 2002). On observe donc un catabolisme marqué de ce composé phénolique susceptible d'être lié à une utilisation en tant qu'antioxydant. L'acide chlorogénique possède en effet une très haute capacité antioxydante, supérieure à celle des acides caféique, cinnamique et *p*-coumarique (GRACE, 2005). Les acides chlorogénique et caféique représentent plus de la moitié du pouvoir antioxydant lié aux composés phénoliques du tubercule de pomme de terre, cette mesure étant réalisée en comparant les capacités d'élimination du DPPH (NARA *et al.*, 2006). On peut dès lors s'attendre à une baisse sensible du pouvoir antioxydant lié aux composés phénoliques au cours du vieillissement. Ce type d'évolution de l'acide chlorogénique se retrouve également lors de la maturation des pommes, les concentrations étant maximales dans les jeunes fruits (MACHEIX *et al.*, 2005).

3.5 Evaluation des dégâts oxydatifs sur lipides

Les PUFA font partie des molécules les plus sensibles aux attaques oxydatives des ROS (SPITELLER, 2003). Afin d'estimer le degré de stress oxydatif subi par notre système, l'évolution des profils en oxylipines a été mesurée au cours du vieillissement. Un dosage complémentaire de l'activité LOX a également été réalisé afin d'évaluer son impact sur l'évolution des compositions énantiomériques des oxylipines analysées.

3.5.1 Evolution de l'activité LOX

Les hydroperoxydes d'acide gras peuvent être formés enzymatiquement ou par autooxydation suite à une peroxydation due aux ROS (MONTILLET *et al.*, 2005). La LOX catalyse à ce titre une étape-clef dans les voies d'oxydation lipidique (Figure 18). L'activité spécifique de cette enzyme décroît au cours du vieillissement des deux cv. étudiés (Figure 62).

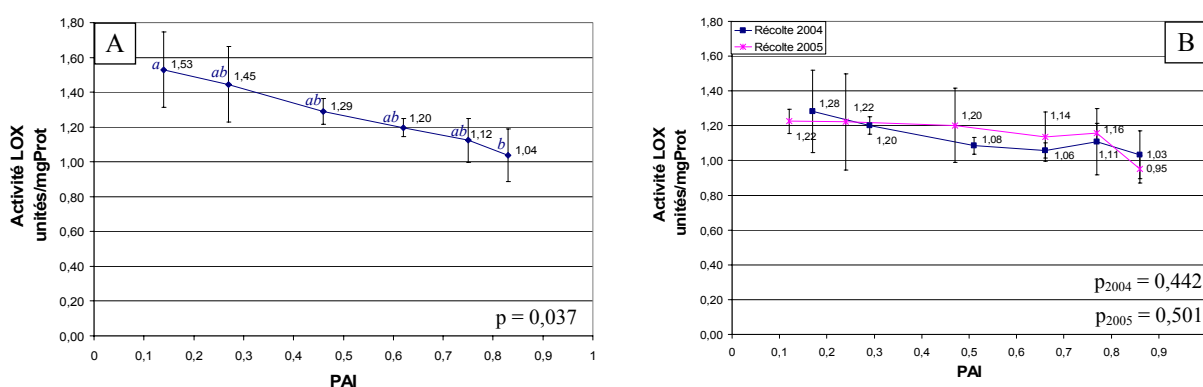


Figure 62. Evolution de l'activité LOX en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004 et 2005. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Cette décroissance est significative pour le cv. Désirée et confirme ainsi les données d'abondance obtenues sur gels 2D (voir Chapitre 4). Pour le cv. Bintje, les valeurs d'activité mesurées en fin de vieillissement sont systématiquement plus faibles que celles obtenues sur tubercules jeunes, quelle que soit l'année de production. En raison de la reproductibilité moyenne de la méthode, ces tendances ne sont cependant pas significatives, si l'on considère une valeur de α de 5 %.

Ces tendances devront être prises en compte afin d'évaluer si les oxylipines analysées sont d'origine enzymatique (plus de 80% d'énantiomère *S*) ou non (moins de 80 % de *S*, GÖBEL *et al.*, 2003). Des situations intermédiaires peuvent également être rencontrées.

3.5.2 Evolution des profils d'oxylipines

Les oxylipines peuvent se retrouver sous forme libre ou estérifiée (par exemple, dans les phospholipides ou les galactolipides). La LOX peut former des 9 et/ou des 13 hydroperoxydes dérivés de l'acide linoléique ou linoléique. Chaque hydroperoxyde (HPO) d'acide gras peut être réduit en dérivé hydroxyde (HO) correspondant (LIAVONCHANKA & FEUSSNER, 2006).

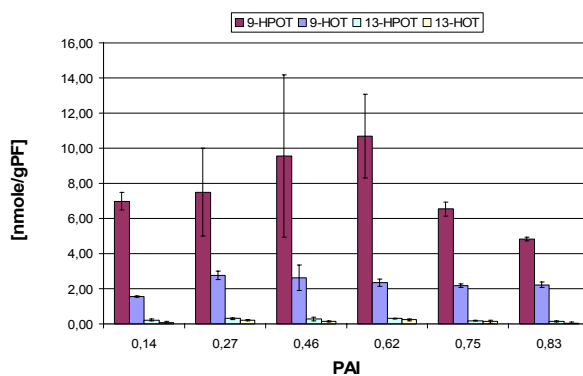
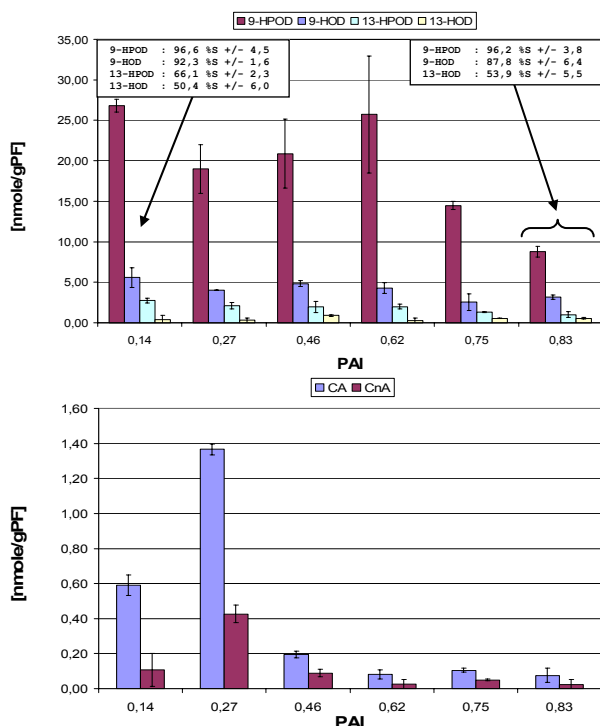


Figure 63. Evolution des profils en oxylipines libres du cv. Désirée récolté en 2004. Les résultats présentés sont les moyennes de deux répétitions indépendantes +/- écart-type. HPOD et HOD : hydroperoxyde et hydroxyde de l'acide linoléique ; HPOT et HOT : hydroperoxyde et hydroxyde de l'acide linoléique ; CA : acide colneléique ; CnA : acide colnelénique. Les nombres 9 et 13 désignent le numéro du carbone portant les modifications précitées. Les encadrés indiquent les pourcentages d'énantiomère $S \pm$ écart-type des oxylipines analysées avec succès en phase chirale.

Les oxylipines libres dérivées des acides linoléique et linoléique des cv. Désirée et Bintje sont présentées respectivement aux Figures 63 et 64. Les oxylipines estérifiées sont quant à elles présentées aux Figures 65 et 66. Le contenu en oxylipines dérivées de l'acide linoléique (dérivés D) est généralement supérieur à celui des dérivés de l'acide linoléique (dérivés T), que ce soit pour les oxylipines libres ou estérifiées. Ce résultat concorde avec ceux obtenus par SPYCHALLA & DESBOROUGH (1990b) sur tubercules de pomme de terre.

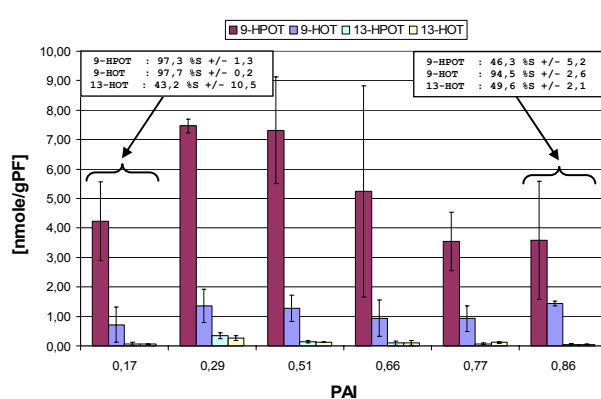
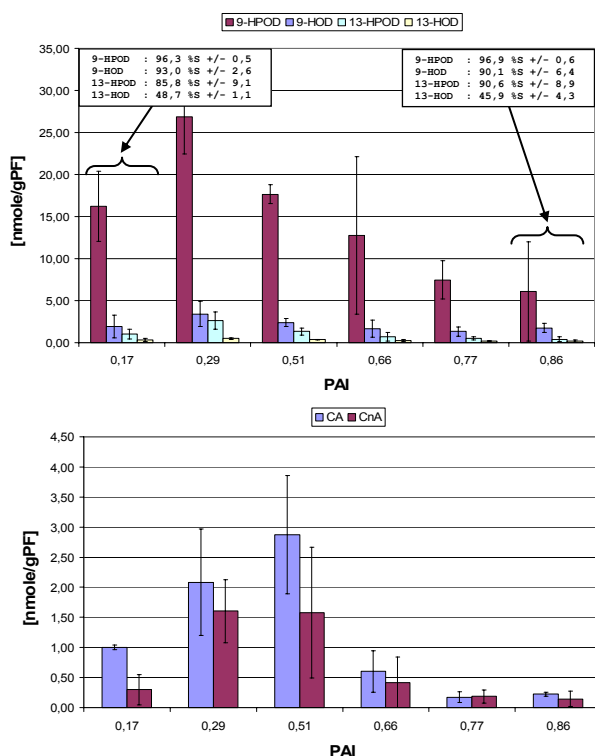


Figure 64. Evolution des profils en oxylipines libres du cv. Bintje récolté en 2004. Les résultats présentés sont les moyennes de deux répétitions indépendantes +/- écart-type. HPOD et HOD : hydroperoxyde et hydroxyde de l'acide linoléique ; HPOT et HOT : hydroperoxyde et hydroxyde de l'acide linoléique ; CA : acide colneléique ; CnA : acide colnelénique. Les nombres 9 et 13 désignent le numéro du carbone portant les modifications précitées. Les encadrés indiquent les pourcentages d'énantiomère $S \pm$ écart-type des oxylipines analysées avec succès en phase chirale.

Les oxylipines libres sont présentes en plus grande concentration que leurs formes estérifiées. Elles sont surtout représentées par les dérivés 9-hydroperoxydes (9-HPOD et 9-HPOT) suivis des 9-hydroxydes (9-HOD et 9-HOT). Les dérivés 13 sont présents en plus faible quantité. Ces résultats sont cohérents avec ceux publiés par FAUCONNIER *et al.* (2003) obtenus sur tubercules du cv. Bintje stockés pendant 210 jours à 20 °C.

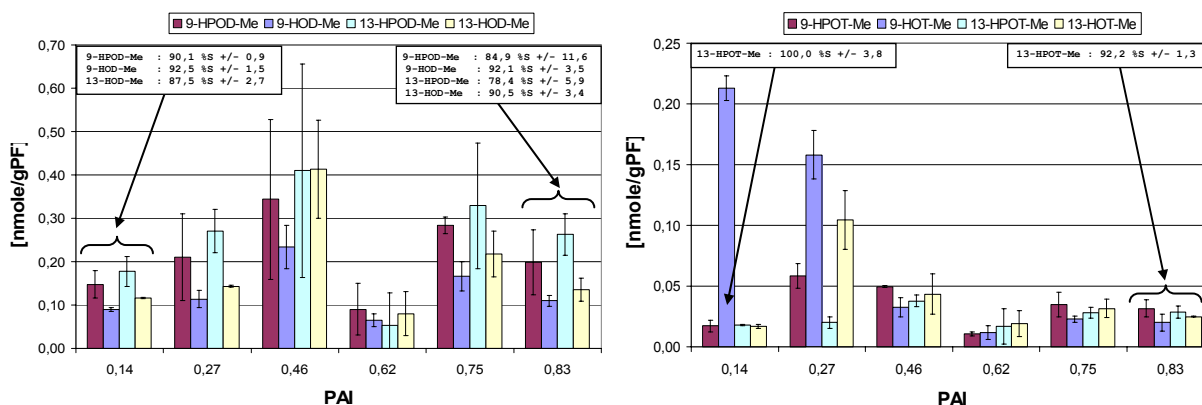


Figure 65. Evolution des profils en oxylipines estérifiées du cv. Désirée récolté en 2004. Les résultats présentés sont les moyennes de deux répétitions indépendantes +/- écart-type. HPOD-Me et HOD-Me : hydroperoxyde et hydroxyde estérifiés de l'acide linoléique ; HPOT-Me et HOT-Me : hydroperoxyde et hydroxyde estérifiés de l'acide linoléique. Les acides colneléique et colnelénique estérifiés ont été omis car leur concentration était très faible et proche du seuil de détection de la méthode employée. Les nombres 9 et 13 désignent le numéro du carbone portant les modifications précitées. Les encadrés précisent les pourcentages d'énantiomère S ± écart-type des oxylipines analysées avec succès en phase chirale.

Comparées aux dosages des oxylipines libres, les mesures des oxylipines estérifiées sont plus délicates à réaliser. Certaines oxylipines estérifiées sont en effet proches du seuil de quantification de la méthode utilisée. Parmi les oxylipines estérifiées dérivées de l'acide linoléique, les 9HPOD-Me et 13 HPOD-Me dominent chez les deux cv. étudiés (récoltes de 2004). La situation est moins nette pour les dérivés T où des variations entre cv. et entre prélèvements se marquent davantage. Le 9 HPOT-Me est cependant le dérivé T le plus abondant dans le cv. Bintje.

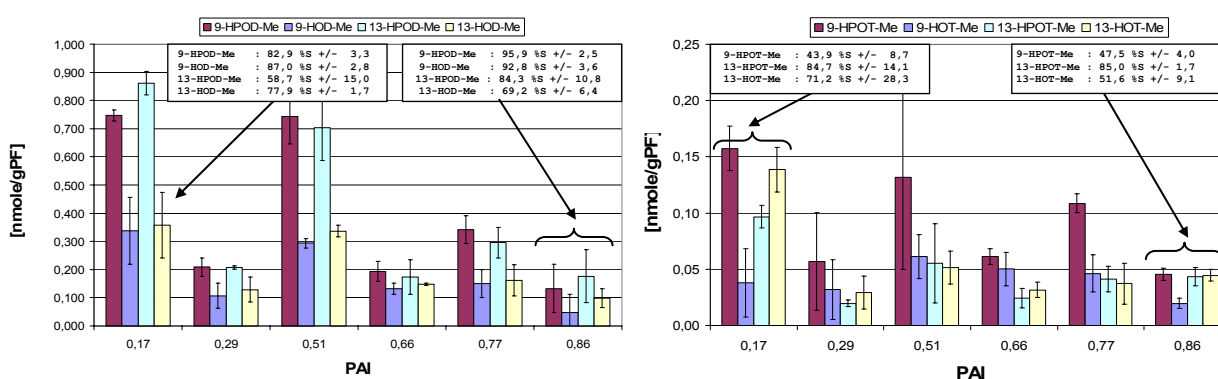


Figure 66. Evolution des profils en oxylipines estérifiées du cv. Bintje récolté en 2004. Les résultats présentés sont les moyennes de deux répétitions indépendantes +/- écart-type. HPOD-Me et HOD-Me : hydroperoxyde et hydroxyde estérifiés de l'acide linoléique ; HPOT-Me et HOT-Me : hydroperoxyde et hydroxyde estérifiés de l'acide linoléique. Les acides colneléique et colnelénique estérifiés ont été omis car leur concentration était très faible et proche du seuil de détection de la méthode employée. Les nombres 9 et 13 désignent le numéro du carbone portant les modifications précitées. Les encadrés précisent les pourcentages d'énantiomère S ± écart-type des oxylipines analysées avec succès en phase chirale.

L'analyse en phase chirale permet la détermination du rapport *R/S* pour chaque oxylipine individuelle à condition que l'intensité des pics collectés en SP et SP-Me soit suffisante (supérieure à 20 mUA environ). Les résultats présentés sur les graphiques concernent les extrêmes des cinétiques de vieillissement. Une proportion importante d'énantiomère *S* (plus de 80 %) est typique d'une oxylipine produite enzymatiquement (GÖBEL *et al.*, 2003).

Au cours du vieillissement des tubercules des 2 cv. étudiés, les dérivés 9-hydroxydes et 9-hydroperoxydes de l'acide linoléique sous forme libre et sous forme estérifiée sont formés enzymatiquement. Il en est de même pour le 13-HPOT-Me. D'autres oxylipines analysées avec succès en phase chirale présentent par contre une origine autooxydative. Le 13-HOD est ainsi composé à 50 % d'énantiomère *S* chez les 2 cv. étudiés. Remarquons enfin que le 9-HPOT du cv. Bintje est formé enzymatiquement dans les tubercules jeunes et non-enzymatiquement dans les tubercules âgés. Globalement, on observe généralement une baisse modérée du pourcentage d'énantiomère *S* chez les oxylipines formées enzymatiquement au cours du vieillissement. Cette évolution est cohérente avec la diminution observée pour l'activité LOX. Notons que lors des processus de peroxydation lipidique enzymatique, le radical peroxyde généré comme intermédiaire ne peut quitter le complexe enzymatique. *A contrario*, lors de peroxydation lipidique par autooxydation, les radicaux peroxydes ne sont pas liés au complexe et peuvent attaquer d'autres biomolécules telles que les protéines (SPITELLER, 2003).

En cas de stress oxydatif poussé, les dommages membranaires dus aux ROS augmentent la peroxydation lipidique (MONDAL *et al.*, 2003). Les données recueillies ne permettent pas de mettre en évidence une accumulation de dégâts oxydatifs sur les lipides membranaires des tubercules au cours du vieillissement. Certaines oxylipines passent par un maximum transitoire pour ensuite diminuer lorsque des valeurs de PAI élevées sont atteintes. Ainsi, les 9-HPOD et 9-HPOT mesurés dans les tubercules du cv. Désirée atteignent leur concentration maximale pour des valeurs de PAI comprises entre 0,46 et 0,62. Pour le cv. Bintje, ce maximum transitoire est atteint pour des valeurs de PAI comprises entre 0,29 et 0,51. Cette accumulation transitoire pourrait coïncider avec la levée de l'(endo)dormance des tubercules, Bintje possédant une dormance plus courte que Désirée (MARTIN & GRAVOUEILLE, 2001). L'ensemble des résultats sus-mentionnés est également à mettre en relation avec l'augmentation très significative du contenu en caroténoïdes au cours du vieillissement. Au cours du stockage, la production de ROS semble donc s'accroître, ce qui entraîne une activation du système antioxydant afin de prévenir une accumulation de dégâts oxydatifs. De plus, bien que la nature des ROS les rende théoriquement dangereuses pour les biomolécules, certains auteurs avancent l'hypothèse que les dégâts purement physicochimiques qu'elles génèrent seraient en fait bien plus limités que prévu (FOYER & NOCTOR, 2005).

3.6 Evaluation des dégâts oxydatifs sur protéines

Même s'ils ne résultent pas uniquement de modifications oxydatives directes des chaînes latérales, la mesure du contenu en carbonyles est généralement considérée comme une bonne évaluation du degré d'oxydation protéique (SHULAEV & OLIVER, 2006). Afin de compléter notre description des processus physiologiques liés au vieillissement, une mesure spectrophotométrique globale du contenu en carbonyles a été réalisée sur les tubercules des cv. Désirée et Bintje récoltés en 2004 (Figure 67). La méthode de préparation des échantillons utilisée permet d'extraire les protéines hydrosolubles ainsi que certaines protéines membranaires (DELAPLACE *et al.*, 2006)

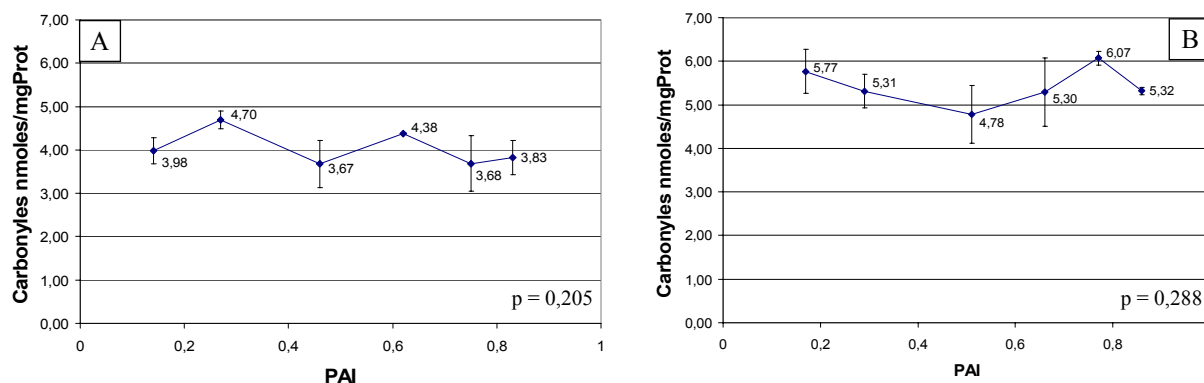


Figure 67. Evolution de la concentration en carbonyles en fonction de l'âge physiologique des tubercules Désirée (A) et Bintje (B) récoltés en 2004. Les valeurs présentées sont les moyennes de 3 mesures indépendantes +/- écart-type. Le traitement statistique est effectué selon le protocole décrit au point 2.8 de la section Matériel et Méthodes.

Aucune augmentation significative de la concentration en carbonyles n'a pu être mise en évidence pour le cv. Désirée au cours du vieillissement, ce paramètre ayant même tendance à diminuer en fonction de l'âge physiologique. Les mêmes conclusions statistiques peuvent être tirées pour Bintje, même si, graphiquement, une légère hausse est observée pour une valeur de PAI de 0,77.

Quantitativement, les tubercules Bintje contiennent davantage de carbonyles que les tubercules Désirée, ce qui est cohérent avec les différences observées au niveau des vitesses de vieillissement attendues (Figure 7). Les tendances mesurées ne permettent pas de mettre en évidence une accumulation de dégâts oxydatifs sur protéines. Cette mesure est toutefois globale et nous ne pouvons pas exclure l'existence d'oxydations spécifiques de certaines protéines.

4 CONCLUSION

Les résultats décrits dans ce chapitre sont synthétisés dans le Tableau 16. Pour chaque antioxydant, une valeur remarquable de PAI correspondant à un changement marqué de concentration ou d'activité est mentionnée afin d'établir des corrélations éventuelles avec les profils de levée décrits au chapitre 3. Ces relations seront précisées dans la partie Discussion et Perspectives. Les fonctions physiologiques décrites ne sont pas exhaustives, mais elles permettent de préciser les relations existant entre antioxydants, ainsi que les impacts potentiels de ces derniers sur la germination du tubercule.

Antioxydant	Cultivar	Tendance	Interactions	PAI critiques	Fonctions physiologiques
Mesure globale (DPPH)	Désirée	= ou -		Diminution pour des valeurs de PAI > 0,8	Bilan pondéré des différents constituants du système antioxydant en utilisant la DPPH comme radical libre universel.
	Bintje	= ou -		Diminution pour des valeurs de PAI > 0,25	
SOD	Désirée	+		Augmentation marquée pour des valeurs de PAI > 0,7	Catalyse la dismutation des anions superoxydes en O ₂ et H ₂ O ₂ .
	Bintje	+		Augmentation marquée pour des valeurs de PAI > 0,7	
APX	Désirée	+		Augmentation marquée pour des valeurs de PAI > 0,6	Catalyse l'élimination de l'H ₂ O ₂ en utilisant l'AsA voire les composés phénoliques comme donneurs d'électrons. Régulation fine.
	Bintje	++		Augmentation marquée pour des valeurs de PAI > 0,6	
POX	Désirée	+		Augmentation marquée pour des valeurs de PAI > 0,7	Enzymes oxydoréductases pouvant catalyser l'élimination de l'H ₂ O ₂ en présence d'un donneur d'électron autre que l'AsA.
	Bintje	-		Diminution marquée pour des valeurs de PAI > 0,7	
CAT	Désirée	++		Augmentation marquée pour des valeurs de PAI > 0,6	Catalyse l'élimination de l'H ₂ O ₂ en cas de stress oxydatif important.
	Bintje	++		Augmentation marquée pour des valeurs de PAI > 0,6	
AsA	Désirée	-		Phase plateau atteinte pour des valeurs de PAI > 0,6	Inactive enzymatiquement ou non la plupart des ROS. Sa déplétion active les mitoses de certaines lignées cellulaires.
	Bintje	--		Phase plateau atteinte pour des valeurs de PAI > 0,6	
DHA	Désirée	=		Stable	Produit d'oxydation de l'AsA. En cas d'accumulation, bloque le cycle cellulaire afin d'éviter les mutations liées à un stress oxydatif
	Bintje	=		Stable	
GSH	Désirée	+	Augmentation suivie d'une décroissance pour les PAI > 0,8	Son accumulation stimule les mitoses cell. et la transcription d'une SOD. Intervient dans la conversion du DHA en AsA.	
	Bintje	+	Augmentation suivie d'une décroissance pour les PAI > 0,8		
GSSG	Désirée	=	Stable	Forme oxydée du GSH. Intervient dans le rapport GSH/GSSG comme senseur de stress oxydatif. Inhibe les mitoses en cas d'accumulation.	
	Bintje	++	Augmentation légère pour des valeurs de PAI > 0,7		
Caroténoïdes	Désirée	++	Phase plateau atteinte pour des valeurs de PAI > 0,6	Préviennent la peroxydation lipidique et ralentissent le vieillissement des graines.	
	Bintje	++	Phase plateau atteinte pour des valeurs de PAI > 0,6		
Acide caféique	Désirée	++	Augmentation suivie d'une décroissance pour les PAI > 0,8	Précurseur des esters caftariques et chlorogéniques. Deuxième antioxydant phénolique après l'acide chlorogénique.	
	Bintje	++	Augmentation sigmoïde avec un minimum à PAI = 0,7		
Acide chlorogénique	Désirée	-	Diminution constante	Sa diminution de concentration accompagne la maturation des fruits et la levée des inhibitions de germination des graines.	
	Bintje	-(-)	Diminution suivie d'une phase plateau pour des PAI > 0,5		
LOX	Désirée	-	Diminution constante	Produit des hydroperoxydes d'acides gras au départ de PUFA	
	Bintje	=	Stable		

Tableau 16. Synthèse de l'évolution du système antioxydant au cours du vieillissement à basse température des cv. Désirée et Bintje. ++ ou -- : variation d'activité ou de concentration supérieure à 50% des valeurs initiales. + ou - : variations inférieures à 50% des valeurs initiales. Les interactions entre antioxydants sont symbolisées par des flèches vertes ou rouges selon que l'impact est respectivement positif ou négatif.

Les interactions mentionnées sous forme de flèches précisent si les tendances observées pour un antioxydant ont un impact positif (flèches vertes) ou négatif (flèches rouges) sur d'autres antioxydants. Parmi les synergies connues, nous pouvons citer notamment le recyclage de l'AsA par la DHAR utilisant le GSH, la génération de peroxyde d'hydrogène par la SOD entraînant l'activation des voies d'élimination catalysées par l'APX et la CAT (LANE, 2002 ; SAIRAM & SRIVASTAVA, 2002, MITTLER, 2002) et l'induction de l'expression d'une Cu/ZnSOD par une augmentation de la concentration en GSH. *A contrario*, la diminution de la concentration en AsA a de nombreuses répercussions négatives sur d'autres antioxydants. L'AsA est ainsi impliqué dans le recyclage des caroténoïdes et des polyphénols au départ de leur forme oxydée (Figures 15 et 16). Il se comporte comme donneur d'électrons pour l'APX. En cas de baisse de sa concentration, on peut donc s'attendre à une diminution de l'efficacité de l'activité APX, induisant une augmentation de l'activité CAT selon un mécanisme compensatoire bien connu (MITTLER & POULOS, 2005). Les composés phénoliques peuvent également se comporter comme donneurs d'électrons pour l'APX (qui possède un second site de liaison pour les composés phénoliques) et les POX.

Ces résultats nous indiquent que le modèle biologique étudié semble répondre efficacement à une génération accrue de ROS en activant le système antioxydant. Aucune accumulation de dégâts oxydatifs n'a pu en effet être mise en évidence sur lipides et sur protéines. Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus sur gels 2D indiquant une activation des systèmes de réparation et/ou de recyclage des produits d'oxydation. La production accrue de ROS ne semble donc pas avoir de conséquence délétère importante. Si l'on se réfère à la Figure 21, une stimulation de la multiplication cellulaire est clairement observée au cours du vieillissement (levée de dominance apicale). Ce stade est ensuite dépassé et une activation de différents systèmes (antioxydant, protecteur et de recyclage) s'opère afin de maintenir les concentrations en ROS et en produits d'oxydation à des niveaux compatibles avec un fonctionnement cellulaire normal (maintien de l'homéostasie).

CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1 INTRODUCTION

Au cours de ce chapitre, plusieurs points importants seront abordés. Ainsi, après une synthèse des données obtenues, les différentes hypothèses d'interprétation des résultats seront présentées. L'origine et les impacts (dégâts oxydatifs, rôle signal) du stress oxydatif potentiellement observé seront discutés. Les conséquences possibles des augmentations d'abondance de plusieurs enzymes impliquées dans le catabolisme oxydatif de l'amidon seront également présentées dans le contexte du sucrage au froid. Finalement, notre modèle sera comparé à d'autres modèles de sénescence et de vieillissement, afin de répondre à ce qui peut apparaître dans un premier temps comme une simple question de sémantique : « Dans nos conditions de stockage, peut-on réellement parler de vieillissement ? ». Nous clôturerons ce chapitre en développant les perspectives fondamentales et appliquées découlant de nos résultats.

2 DISCUSSION GÉNÉRALE

2.1 Synthèse des modifications physiologiques et biochimiques observées au cours du vieillissement

Comme mentionné dans l'introduction, une vue intégrée des modifications subies par le système oxydatif du tubercule de pomme de terre en stockage à basse température ne peut être obtenue sur une simple base bibliographique (Tableau 17). En effet, les conditions de stockage (température, HR, durée) utilisées par les différents groupes de recherche ne sont pas uniformes. De plus, les dosages effectués sont souvent contradictoires (cas de la DHAR, de la SOD, de l'APX ou des POX, par exemple). Ces incohérences apparentes peuvent être liées aux méthodes de dosage utilisées, au mode d'expression des données (activité spécifique ou exprimée sur base de la matière sèche ou fraîche), à la durée de stockage, voire même à une influence variétale. Dans ce contexte, il importait donc de réaliser une évaluation des constituants majeurs du système antioxydant, afin d'établir les synergies potentielles s'opérant entre antioxydants (Figures 68 et 69) et de pouvoir éventuellement corrélérer ces données avec les valeurs de PAI et les modifications du profil de germination. Afin de construire un modèle de vieillissement le plus complet possible, nous nous focaliserons sur le cv. Désirée dans la présente discussion. Ce cv. a en effet fait l'objet d'une caractérisation protéomique en sus de l'approche ciblée développée dans le chapitre 5. Au niveau biochimique, les différences variétales sont de plus en plus marquées entre Bintje et Désirée, les tendances observées étant globalement cohérentes (Tableaux 6 et 16).

Dans un premier temps, un cadre de référence physiologique a été établi à l'aide du PAI. Cet index d'âge physiologique est fiable et facile à mesurer. Il rend compte des effets de l'année de récolte, du cultivar et de leur interaction. Il est également influencé par l'histoire des lots (intervalle post-défanage) et compatible avec la notion d'âge chronologique (durée de stockage). Son utilisation a été préférée à celle de la période d'incubation car cette dernière présente des fluctuations ponctuelles marquées. Sa variabilité est aussi plus importante, ce qui nuit à sa capacité de distinguer les variations d'âge physiologique inter-annuelles ou inter-variétales. La définition-même du concept du PAI est plus rigoureuse. Ce

paramètre considère en effet implicitement qu'un tubercule commence à vieillir dès qu'il débute son existence indépendante de la plante mère. Ce n'est pas le cas de la période d'incubation.

Dans nos conditions de stockage, l'évolution physiologique des tubercules provoque des modifications du phénotype de levée. Les levées de dormance non synchrones s'opèrent au niveau des germes apicaux et proximaux sont à l'origine des différents stades de levée observés : dominance apicale, levée de dominance apicale et tiges multiples. Ainsi, pour le cv. Désirée, des valeurs de PAI inférieures à 0,5 correspondent au stade de dominance apicale ; la levée de dominance apicale se marque pour des valeurs proches de 0,6. Des tiges multiples sont finalement observées pour des valeurs de PAI supérieures à 0,7. L'optimum de plantation correspond au stade de développement correspondant à la production de germes multiples vigoureux. CALDIZ *et al.* (2001) ont ainsi montré que le rendement obtenu avec un PAI de 0,8 était très largement inférieur (38 t/ha) à celui obtenu avec un PAI proche de 0,6 (51 t/ha).

Au cours de cette évolution physiologique, de nombreuses modifications biochimiques peuvent être observées. Le contenu en ascorbate réduit diminue précocement jusqu'à la levée de dominance apicale. Parallèlement, les contenus en glutathion et en acide caféique augmentent fortement avant de décroître pour des valeurs de PAI supérieures à 0,8. Cette décroissance s'accompagne d'une diminution de la vigueur germinative (Figure 33). Le contenu en acide chlorogénique diminue constamment au cours du stockage, suivant la même évolution que celle observée lors de la maturation des graines.

Lorsque qu'une valeur plancher de concentration en ascorbate est atteinte, on observe une augmentation marquée des activités spécifiques des enzymes antioxydantes majeures (SOD, APX, POX et CAT). Des modifications complémentaires des composantes du système antioxydant s'opèrent donc au cours du stockage. Dans un premier temps, on observe une diminution de la concentration en AsA qui est un antioxydant non enzymatique majeur. Cette baisse du pouvoir antioxydant lié à l'AsA s'accompagne d'une augmentation de la concentration d'autres antioxydants non enzymatiques ainsi que de la surexpression d'enzymes antioxydantes travaillant en étroite synergie. Ces activations de défenses antioxydantes peuvent être provoquées par des accumulations transitoires de ROS, phénomène sur lequel nous reviendrons dans le paragraphe consacré à leur rôle signal.

Au cours du stockage à 4°C, une évaluation des dégâts oxydatifs sur lipides et sur protéines a également été réalisée afin d'évaluer si les modifications observées au niveau du système antioxydant permettaient au tubercule de répondre efficacement à une production accrue de ROS. Nos données semblent indiquer qu'aucune accumulation de dégâts oxydatifs n'intervient sur les lipides membranaires. Cette observation est cohérente avec l'augmentation de concentration en caroténoïdes observée au cours du vieillissement des tubercules. Le dosage des carbonyles n'a, en outre, pas permis de mettre en évidence de dégâts oxydatifs sur extraits protéiques contenant des protéines cytosoliques et membranaires. Remarquons, par ailleurs, que l'évolution physiologique des tubercules au cours du stockage s'accompagne d'une surexpression du protéasome 20S lorsque le stade « tiges multiples » est atteint. Tout semble donc indiquer que le vieillissement des tubercules s'accompagne d'une activation du système antioxydant ainsi que du système de recyclage des protéines oxydées lié au protéasome 20S.

Parallèlement à ces modifications du système antioxydant, d'autres réponses au stress ont été observées via l'approche biochimique sans *a priori* en DIGE. Une chaîne β -2 de tubuline s'accumule ainsi précocement suite au stockage à basse température. Une sHSP et

une glyoxalase I sont également surexprimées lorsque les tubercules atteignent respectivement les stades de « levée de dominance apicale » et « tiges multiples ». Remarquons cependant que ces réponses au stress sont complexes et que les tendances observées sont parfois contradictoires. Ainsi, les abondances de deux PDI et d'une LOX diminuent au cours du vieillissement. Les PDI pouvant assumer un rôle chaperon, cette diminution d'abondance pourrait altérer le repliement protéique, rendant ainsi certaines protéines non fonctionnelles ou plus sensibles à la dégradation. Une décroissance de l'abondance des PDI pourrait également diminuer le recyclage de l'AsA qui est lui-même impliqué dans la régénération des composés phénoliques au départ de leur forme radicalaire phénoxy.

Finalement, une augmentation d'abondance de trois enzymes liées au catabolisme oxydatif de l'amidon a été observée. Les conséquences physiologiques potentielles de ces modifications de concentration sont multiples. Elles seront abordées dans le point 2.2. A titre d'exemple, une augmentation de la concentration en énolase pourrait permettre une synthèse accrue de certains acides aminés via la voie de l'acide shikimique. Une augmentation de concentration en phénylalanine a ainsi été observée au cours du stockage. Elle pourrait cependant aussi résulter d'une protéolyse accrue de la patatine lorsque le PAI dépasse une valeur de 0,6 ou d'un recyclage des protéines oxydées par le protéasome 20S. Cet acide aminé est un précurseur important de la synthèse des composés phénoliques tels que l'acide caféique et ses esters caftariques et chlorogéniques.

Evolution des systèmes antioxydants au cours du stockage de tubercules de pomme de terre																	
Références	Durée de stockage	Température	Activité SOD	Activité CAT	Activité APX	Activité POX	Activité GR	Activité MDHAR	Activité DHAR	[AsA]	[DHA]	[AsA + DHA]	[GSH]	[GSSG]	[GSH + GSSG]	Caroténoïdes / DW	α-tocophérol
SPYCHALLA & DESBOROUGH, 1990a	40 semaines	3 et 9°C	++00-	+++													+++
KUMAR & KNOWLES, 1996b	30 mois, t ₀ = 6 mois	4°C					++						++	++	++		
DIPIERRO & DE LEONARDIS, 1997	40 semaines	3 et 9°C		-++++	00 ou --	+--	---00	00	---+	---00	très variable						
MIZUNO <i>et al.</i> , 1998	15 semaines	1 et 5°C	+o	-++	+--		++	- ou +	00			---00					
KAWAKAMI <i>et al.</i> , 2000	15 semaines	1 et 20°C		-00+	++o												
REVERBERI <i>et al.</i> , 2001	6 mois, sous germes	4°C	++00--	+++++													+++00-
ZABROUSKOV <i>et al.</i> , 2002	25 mois, t ₀ = 0 mois	4°C			o+	o+	++	++	--								
MORRIS <i>et al.</i> , 2004	6-9 mois	4°C															--, mais variable selon cultivar
DEPLACE <i>et al.</i> , 2007	9 mois	4°C	++00+	+++	00++	00+ ou 00-- selon cv.				---00	00	--00	++o-	00 ou ++	++o-	+++o par g PF	

Tableau 17. Comparaison des données biochimiques publiées mesurées au cours du vieillissement des tubercules de pomme de terre. - : diminution ; o : stable ; + : augmentation.

Evolution de différents paramètres mesurés au cours du vieillissement agronomique et accéléré de graines et de caryopses																			
Références	Conditions expérimentales	Oxydation lipidique	Activité LOX	Pertes d'électrolytes	Contenu en protéines	Contenu en H ₂ O ₂	Activité SOD	Activité CAT	Activité APX	Activité POX	Activité GR	Contenu en GSH	Contenu en GSSG	Contenu en GSH + GSSG	Contenu en AsA	Contenu en DHA	Contenu en AsA + DHA	Contenu en caroténoïdes	Contenu en α-tocophérol
DE VOS <i>et al.</i> , 1994	Vieillessement et vieillissement accéléré de graines de tomates											--	++	--					
SUNG & JENG, 1994	Vieillessement accéléré de graines de cacahuète	++	--				--	--	--	--									
REUZEAU & CAVALIE, 1995	Vieillessement de graines de tournesol	++					--	--	--	--	++	++	++	++					
SUNG & CHIU, 1995	Vieillessement de graines de soja	++	--	++			--	--	--	--									
BAILLY <i>et al.</i> , 1996	Vieillessement accéléré de graines de tournesol	++		++ ou 00			--	--			--								
HSU & SUNG, 1997	Vieillessement accéléré de graines de pastèque			+							-- ou +	--	--	--					
ZACHEO <i>et al.</i> , 1998	Vieillessement accéléré de graines d'amandier	++	++																
PINZINO <i>et al.</i> , 1999	Vieillessement de caryopses de blé					+o-												--	
ZACHEO <i>et al.</i> , 2000	Vieillessement de graines d'amandier	++	00 ou +		00														---
BAILLY <i>et al.</i> , 2002	Vieillessement accéléré de graines de tournesol		++					++			++								
GALLESCHI <i>et al.</i> , 2002, CALUCCI <i>et al.</i> , 2004	Vieillessement accéléré de caryopses de blé				--	++												--	
GOEL <i>et al.</i> , 2003	Vieillessement accéléré de graines de coton	++		++			--	--	--	--	--								
MITROVIC <i>et al.</i> , 2005	Vieillessement de graines de <i>Chenopodium rubrum</i>						--	--	--	--	--	--	--	--					

Tableau 18. Comparaison des données biochimiques publiées mesurées au cours du vieillissement de graines et de fruits. - : diminution ; o : stable ; + : augmentation.

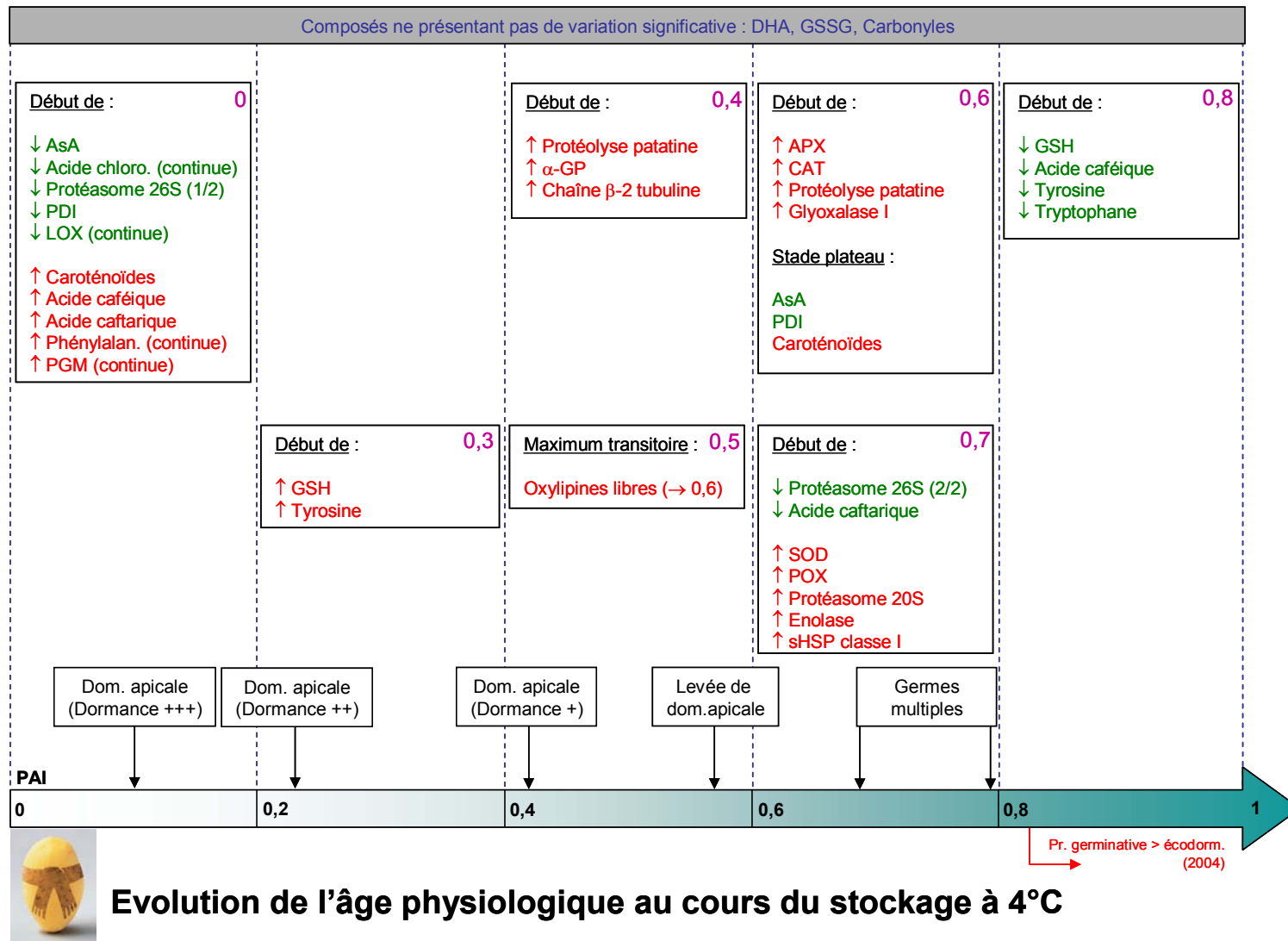


Figure 68. Chronologie des changements physiologiques et biochimiques observés au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée récoltés en 2004. Les composés présentés en vert (rouge) sont sous- (sur-) régulés au cours du vieillissement. Chaque encadré présente la valeur de PAI qui lui correspond en mauve. APX, ascorbate peroxydase ; AsA, ascorbate réduit ; CAT, catalase ; α-GP, α-glucane phosphorylase ; GSH, glutathion réduit ; LOX, lipoxygénase ; PDI, protéine disulfide isomérase ; PGM, phosphoglycérate mutase ; POX, peroxydase ; sHSP, petite protéine de choc thermique ; SOD, superoxyde dismutase.

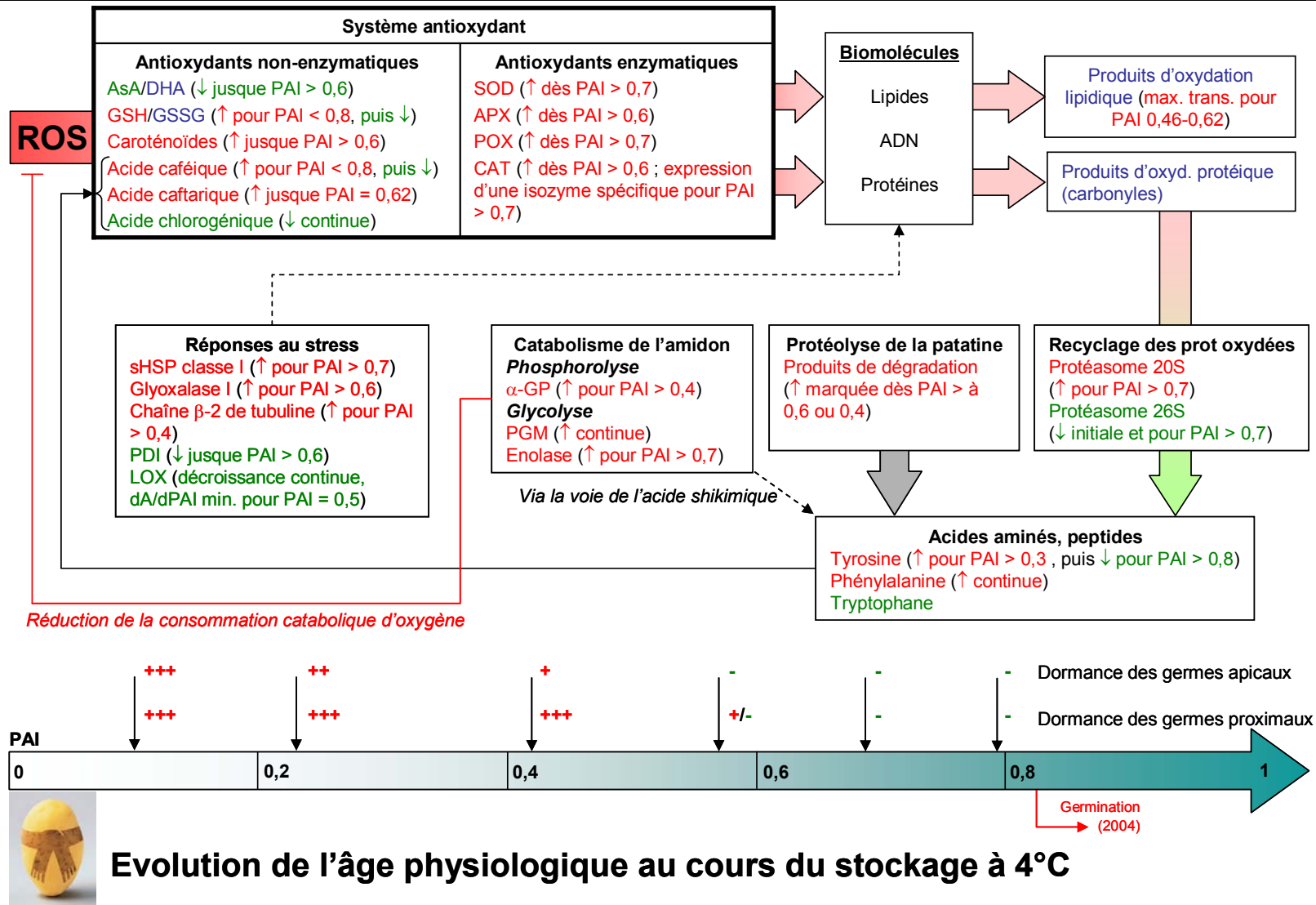


Figure 69. Schéma synthétique des principales modifications biochimiques et physiologiques observées au cours du vieillissement des tubercules du cv. Désirée. α-GP : α-glucane phosphorylase ; PDI : protéine disulfide isomérase ; PGM : phosphoglycérate mutase. Les flèches discontinues indiquent les relations potentielles entre voies métaboliques. La connecteur rouge barré précise une rétro-inhibition de la production des ROS suite à une modification du rapport glycolyse/respiration mitochondriale. Les composés apparaissant en vert ou rouge sont respectivement sous- ou sur-régulés. Les composés apparaissant en bleu ne présentent pas de variation significative au cours du vieillissement.

2.2 Enseignements tirés de cette étude

Origine(s) des modifications physiologiques et biochimiques observées

Selon SCHULZE *et al.* (2005), un stress peut être assimilé à une force déformant un corps physique, il s'agit donc d'un élément extérieur au système, provoquant des déformations, des déséquilibres métaboliques (contraintes). Cette définition partagée par TAIZ & ZEIGER (1991) rend correctement compte de l'impact de facteurs de stress abiotiques externes tels que le froid, la sécheresse, la salinité ou l'ozone sur un système, mais elle néglige l'évolution intrinsèque des propriétés du système étudié. Ainsi, dans le cadre de la théorie oxydative du vieillissement ou lors de la sénescence foliaire, les déséquilibres métaboliques observés provoquent un stress oxydatif qui n'est pas uniquement dû à des influences extérieures. A titre d'exemple, les différents cv. de pomme de terre présentent des vitesses de vieillissement distinctes, mêmes s'ils sont placés dans les mêmes conditions de stockage. Une feuille entre en sénescence même si la plante qui l'a produite n'est pas soumise à un stress. Dans notre discussion, nous adopterons donc une position intermédiaire en considérant que notre système évolue au cours du temps et qu'il peut être soumis à des facteurs de stress externes additionnels tels que les basses températures de stockage.

Les principaux paramètres susceptibles d'influencer la physiologie des tubercules de pomme de terre étudiés sont la température de stockage (stress thermique), la déshydratation liée aux pertes d'eau par évapo-transpiration, la germination (généralement, lorsque le PAI dépasse 0,83), l'évolution de l'âge physiologique et les maladies post-récolte. La plupart des modifications physiologiques et biochimiques mesurées sont antérieures au phénomène de germination n'intervenant que pour le dernier point de certaines cinétiques. On peut donc raisonnablement affirmer que ce paramètre n'est pas responsable de l'évolution de notre système. Il peut par contre devenir gênant si l'on prolonge les durées de stockage à 4°C, rendant ainsi l'interprétation des mesures délicates, voire incertaine. Les tubercules des cv. Désirée et Bintje stockés présentaient respectivement une teneur en eau initiale de $82,0 \pm 1,9$ et $81,8 \pm 2,1$ % m/m (moyennes de 10 tubercules séchés à 105 °C jusqu'à masse constante). Après 270 jours de stockage, les valeurs finales sont respectivement de $80,6 \pm 2,4$ et $80,5 \pm 3,2$ % m/m. Au vu des écarts observés, nous pouvons donc affirmer que les pertes en eau sont peu importantes et qu'elles influencent faiblement les dosages effectués (pas d'effet de concentration lié à une perte d'eau conséquente).

Les maladies de post-récolte peuvent également influencer le comportement de notre système, les ROS jouant, par exemple, un rôle important dans les relations hôte-pathogène (MITTLER, 2002 ; LEPOIVRE, 2003). Afin d'en évaluer l'incidence sur notre modèle, plusieurs éléments sont à considérer. Les tubercules utilisés pour cette étude ont été inspectés visuellement à la récolte ainsi que tout au long du stockage à 4°C afin de rechercher d'éventuels symptômes de maladie fongique ou bactérienne. L'échantillonnage a été réalisé de façon aléatoire au sein de chaque lot. Les modifications biochimiques observées sur le matériel biologique échantillonné sont de plus cohérentes d'une année à l'autre pour Bintje et Désirée. Si ces modifications étaient le fait du développement de pathogènes, les mesures réalisées auraient été influencées fortement par (1) la position des échantillons au sein des lots de tubercules, (2) le cv. et sa sensibilité aux maladies, (3) l'année de récolte et l'importance des inoculum. Même si nous ne pouvons pas écarter définitivement ce facteur de stress biotique, il semble cependant raisonnable d'affirmer que son influence sur notre matériel biologique est limitée. L'utilisation de tubercules plants caractérisés au niveau phytopathologique pourrait à l'avenir écarter définitivement cette hypothèse.

Deux paramètres indissociables restent encore à évaluer, à savoir l'évolution de l'âge physiologique et la température de stockage. D'une manière très générale, l'exposition à des stress environnementaux provoque des modifications de concentration des antioxydants répondant à une génération accrue de ROS (FOYER *et al.*, 2005 ; FEIERABEND, 2005 ; GRACE, 2005). Le stress lié au froid subi par des semis de *Zea mays* induit à ce titre une accumulation transitoire d'H₂O₂ provoquant un stress oxydatif. Ce stress oxydatif active l'expression du système antioxydant comprenant notamment la CAT. Une étude menée durant 180 jours de stockage à 4°C par REVERBERI *et al.* (2001) avançait ainsi l'hypothèse que les modifications du système antioxydant observées dans les tissus adjacents aux yeux des tubercules étaient une simple réponse à un stress thermique subi au cours du stockage à basse température. Dans notre contexte de stockage, il n'est pas possible d'être aussi catégorique : les modifications du système antioxydant observées peuvent raisonnablement découler soit du stockage à basse température, soit de l'évolution de l'âge physiologique, ces deux paramètres n'étant pas mutuellement exclusifs. Les modifications précoces des antioxydants tels que l'AsA ou le glutathion pourraient plutôt être mises en relation avec un stress thermique. *A contrario*, l'activation des enzymes antioxydantes est plus tardive et correspond à un âge physiologique plus avancé coïncidant avec une diminution de plus de 40 % du contenu en AsA. Par ailleurs, des modifications similaires des antioxydants ont également été mesurées lors de stockage de tubercules à 20°C durant 350 jours (DELAPLACE *et al.*, manuscrit soumis). Le stress thermique subi influencerait donc quantitativement la réponse métabolique de notre système, sans modifier profondément les tendances observées.

ROS : impacts délétères ou rôle signal ?

Les données que nous avons obtenues indiquent que des modifications profondes du système antioxydant interviennent au cours du vieillissement. L'activation de nombreuses défenses antioxydantes prévient les dégâts oxydatifs sur les lipides (résultat cohérent avec ceux obtenus par FAUCONNIER *et al.*, 2003) et les protéines. Pour ces dernières, aucune augmentation de la concentration en résidus carbonyles n'a été mesurée au cours du vieillissement, ce qui est cohérent avec l'activation du protéasome 20S en cours de stockage.

L'absence d'impact délétère détectable ne signifie cependant pas que les ROS n'ont aucun impact sur le métabolisme des tubercules. Depuis plusieurs années maintenant, une attention particulière est portée au rôle signal joué par les ROS (GECHEV *et al.*, 2002). Ces formes actives de l'oxygène peuvent en effet influencer l'expression génique à différents niveaux, depuis le niveau transcriptionnel (via l'expression ou l'activation de facteurs de transcription spécifiques) jusqu'au niveau fonctionnel en oxydant directement ou indirectement les enzymes grâce à des molécules ubiquistes rédox-sensibles comme le GSH ou les thiorédoxines (VRANOVA *et al.*, 2002 ; DESIKAN *et al.*, 2005 ; HALLIWELL, 2006 ; ZENTGRAF, 2007). Les conséquences cellulaires d'un stress oxydatif dépendent en outre du type de cellule et du niveau de stress appliqué (Figure 21).

En se référant à la figure précitée, nos données nous indiquent que le système étudié répond à une production relativement importante de ROS cours du vieillissement. Au début du stockage à 4°C, les tubercules sont dormants et se caractérisent par une forte concentration en AsA. Au cours du vieillissement, la génération de ROS devient de plus en plus intense, ce qui provoque une réponse adaptative caractérisée par une activation des systèmes de défense et de réparation. La surexpression d'antioxydants enzymatiques ou de HSP constitue à ce titre un bon exemple du rôle signal joué par les ROS (MITTLER, 2002 ; GECHEV *et al.*, 2002 ; MITTLER *et al.*, 2004). Au cours de son développement post-récolte, notre système évolue

donc et élabore les premiers éléments de réponse à un stress oxydatif. L'existence de ce dernier n'a cependant pas été directement démontrée expérimentalement, aucune accumulation de dégâts oxydatifs n'ayant été mise en évidence. Nos observations constituent cependant des preuves indirectes solides d'une génération accrue de ROS.

Les conséquences de cette production accrue de ROS sur le potentiel de germination des tubercules demeurent plus délicates à évaluer, le tubercule étant constitué d'un nombre important de tissus différents (Figure 2). Néanmoins, en partant des données physiologiques et biochimiques récoltées, certaines hypothèses peuvent être proposées. Un lien pourrait ainsi exister entre l'évolution du profil de levée et les modifications des composantes des systèmes de défense résultant d'une surproduction de ROS. A ce propos, le cycle cellulaire est fortement influencé par la concentration des formes réduites et oxydées de l'ascorbate et du glutathion (POTTERS *et al.*, 2004 ; ZENTGRAF, 2007). Une diminution de la concentration en AsA induit des mitoses chez certains types cellulaires (notamment des cellules de racine, SMIRNOFF, 2005). Le déplétion de l'ascorbate réduit pourrait donc influencer la capacité germinative du tubercule. Remarquons cependant que ce type de comportement n'est pas universel et qu'il existe de nombreux exemples où une augmentation de la concentration en AsA stimule la progression du cycle cellulaire de cellules compétentes (POTTERS *et al.*, 2002). *A contrario*, il est clairement établi qu'une accumulation de DHA bloque la progression du cycle cellulaire (POTTERS *et al.*, 2000). Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence la moindre accumulation de DHA au cours du vieillissement, ce qui est cohérent avec les modifications de profil de levée observées.

Le GSH et le GSSG ont également des rôles distincts dans la transduction d'un signal. Ces métabolites activent la signalisation du calcium et sont impliqués dans les cascades de transduction du signal véhiculé par l' H_2O_2 (FOYER *et al.*, 2005). Le couple GSH/GSSG joue en fait le rôle de senseur redox indicateur de l'équilibre redox thiol-disulfure général au niveau cellulaire. Cet équilibre a de profonds impacts sur le métabolisme et l'expression génique. L'accumulation de GSH stimule ainsi les mitoses cellulaires, les méristèmes racinaires étant incapables de se développer en-dessous d'une concentration critique en GSH (VRANOVA *et al.*, 2002 ; POTTERS *et al.*, 2002 ; FOYER *et al.*, 2005). Au même titre que les variations observées au niveau de l'ascorbate, cette accumulation pourrait donc avoir un effet inducteur sur la germination des tubercules. Le statut redox du glutathion est cependant indépendant de celui de l'ascorbate, aucun effet compensatoire au niveau du cycle cellulaire n'ayant pu être mis en évidence (FOYER *et al.*, 2005).

Outre l'ascorbate et le glutathion, d'autres composés influencent également la progression du cycle cellulaire. A ce titre, chez *Escherichia coli*, le méthylglyoxal provoque un arrêt des divisions cellulaires. Son élimination par la glyoxalase I permet *a contrario* la prolifération cellulaire (KALIA *et al.*, 1998) et pourrait, dans notre modèle, être associée à la levée de dominance apicale permettant la croissance de germes multiples. Dans ce contexte de développement, la glyoxalase I permet aussi de postposer la sénescence foliaire dans des lignées transgéniques surexprimant cette enzyme (SOPORY *et al.*, 2007). L'acide chlorogénique se comporte finalement comme un inhibiteur de la germination de graines. Au cours du vieillissement des tubercules, sa concentration décroît. Ce type d'évolution est également mesuré au cours de la maturation des fruits (MACHEIX *et al.*, 2005). Dans le tubercule de pomme de terre, elle s'accompagne par ailleurs d'une perte progressive de dominance apicale permettant la production de germes multiples.

Les couples AsA/DHA, GSH/GSSG ainsi que l'acide chlorogénique pourraient donc influencer la progression du cycle cellulaire dans les méristèmes des germes des tubercules, en se comportant comme messagers secondaires du signal de développement émis par les ROS. Cette hypothèse formulée sur base de nos résultats nécessiterait cependant de nombreuses validations en utilisant des modèles appropriés (suspensions cellulaires issues de tissus méristématiques de tubercule par exemple).

Origine(s) de la perte d'intégrité membranaire observée au cours du vieillissement

Les travaux réalisés par FAUCONNIER *et al.* (2002) ont permis de mettre en évidence une perte d'intégrité membranaire au cours du vieillissement de tubercules du cv. Désirée stockés à 4 ou 20°C pendant 360 jours. Cette perte d'intégrité membranaire n'était cependant pas corrélée avec l'évolution de la concentration en hydroperoxydes totaux en utilisant une température de stockage de 4 ou 20°C (FAUCONNIER *et al.*, 2002 et 2003). Les profils détaillés en oxylipines que nous avons obtenus confirment qu'aucune accumulation d'hydroperoxydes n'est détectable au cours du vieillissement à 4°C. Le dosage des résidus carbonyles sur extraits protéiques contenant des protéines cytosoliques et membranaires ne permet pas non plus de mettre en évidence d'augmentation significative des dégâts oxydatifs. Ces résultats peuvent être mis en relation avec l'activation de complexes protéolytiques observée sur gels 2D (voir Chapitre 4). Techniquement parlant, même si aucune accumulation globale de résidus carbonyles n'a été mesurée en spectrophotométrie, il se pourrait que certaines protéines membranaires soient la cible d'attaques oxydatives préférentielles. Seule une mesure en western-blot 2D utilisant des anticorps anti-DNPH (CONRAD *et al.*, 2001) permettrait de tester cette hypothèse, afin d'évaluer si ces modifications oxydatives sont à l'origine de la perte d'intégrité membranaire observée au cours du vieillissement. Remarquons également que le polypeptide DREPP4 membranaire identifié en gels 2D est surexprimé au cours du vieillissement et pourrait intervenir dans l'augmentation de la perméabilité membranaire observée. La validation de cette dernière hypothèse nécessiterait cependant de nombreuses manipulations complémentaires.

Impacts potentiels de la surexpression d'enzymes liées au catabolisme de l'amidon

Au cours du vieillissement des tubercules de pomme de terre, une augmentation des abondances de trois enzymes impliquées dans le catabolisme de l'amidon a été observée. L'abondance de l' α -glucane phosphorylase augmente lorsque des valeurs de PAI supérieures à 0,4 sont atteintes. Cette activation précède la surexpression de la phosphoglycérate mutase (croissance continue) et de l'énolase, cette dernière enzyme étant surexprimée lorsque le PAI dépasse 0,7.

Ces résultats indiquent que de profondes modifications du métabolisme du carbone s'opèrent au cours du vieillissement. Le catabolisme et la compartimentation de l'amidon, ainsi que le sucrage au froid qui y est associé, sont des processus extrêmement complexes impliquant des interactions entre les voies de dégradation et de synthèse de l'amidon et du saccharose, la glycolyse, la voie oxydative des pentoses phosphates, la respiration mitochondriale et les fermentations lactique et alcoolique (BLENKINSOP *et al.*, 2003). Le saccharose et les sucres réducteurs s'accumulant à basse température pourraient de plus agir comme cryoprotectants permettant une acclimatation aux basses températures (MALONE *et al.*, 2006). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le sucrage au froid. La première hypothèse suggère que le sucrage au froid est causé par une diminution immédiate de l'entrée des hexoses-phosphates dans la glycolyse. Cette diminution détournerait les produits de dégradation de l'amidon vers les voies de synthèse de saccharose. On a longtemps pensé que cette restriction de l'entrée des hexoses-phosphates dans la glycolyse à

basse température était due à une inactivation thermique des enzymes catalysant la synthèse de fructose 1,6-biphosphate au départ de fructose 6-phosphate. Cette hypothèse a cependant été infirmée récemment par MALONE *et al.* (2006). Ces auteurs ont également démontré que suite à un passage à basse température, le flux glycolytique est rapidement réduit au profit de la voie oxydative des pentoses phosphates. Les mesures du contenu en NADPH de cv. contrastés dans leur sensibilité au sucrage au froid permettent cependant d'affirmer que la voie oxydative des pentoses phosphates ne joue pas un rôle prépondérant dans l'accumulation des sucres réducteurs à moyen terme (BLENKINSOP *et al.*, 2003). D'autres études postulent que l'accumulation de sucres réducteurs nécessite des modifications métaboliques à plus long terme impliquant notamment l'induction d'une ou de plusieurs enzymes dégradant l'amidon. Des augmentations d'activité endo- ou exo- amylase et phosphorylase ont ainsi été publiées à de nombreuses reprises. *A contrario*, l'accumulation de sucres pourrait également résulter d'une activation des enzymes impliquées dans la synthèse de saccharose. Finalement, une dernière hypothèse suggère que la formation de glucose et de fructose est nécessaire pour provoquer l'accumulation de sucres en éliminant le saccharose. Cette dernière théorie a cependant été infirmée sur base des corrélations entre l'activité invertase et la quantité de sucres totaux accumulés. Des lignées transgéniques réprimées par antisens en activité invertase n'ont pas non plus été affectées dans leur contenu en sucres totaux (MALONE *et al.*, 2006).

Dans ce contexte, l'augmentation d'abondance de l' α -glucane phosphorylase que nous avons observée permet d'étayer l'hypothèse d'induction de modifications métaboliques à moyen terme. Son activation après 90 jours de stockage est compatible avec les données obtenues par HILL *et al.* (1996) sur le cv. Désirée. Elle est cohérente avec les données de DAVIES & VIOLA (1992) et CLAASSEN *et al.* (1993). Ces derniers auteurs ont par ailleurs montré que cette activité enzymatique était bien corrélée avec l'accumulation de sucres au cours du stockage à basse température. Même si l'augmentation d'activité phosphorylase n'a pas été systématiquement mise en évidence pour tous les cv. étudiés, on considère en général que cette enzyme est majoritairement responsable de la mobilisation du carbone au départ de l'amidon, les amylases jouant plutôt un rôle auxiliaire en facilitant l'action de cette enzyme (KRAUSE *et al.*, 1998). L'augmentation d'abondance de l' α -glucane phosphorylase pourrait finalement permettre un meilleur approvisionnement en sucres des germes produits au cours du processus de germination, ce qui limiterait la compétition entre les différents puits tout en permettant la croissance de germes multiples lorsque la concentration en sucres dépasse une valeur seuil.

Les enzymes phosphoglycérate mutase et énoïase sont impliquées dans la synthèse de phosphoénolpyruvate au départ de 3-phosphoglycérate. Les conséquences physiologiques des augmentations d'abondance de ces deux enzymes peuvent être multiples et demeurent – du moins en partie – hypothétiques.

Les données bibliographiques d'expression de ces enzymes nous apprennent qu'elles sont généralement surexprimées en cas de stress. Une activation de la glycolyse a ainsi été mise en évidence suite à un stress salin imposé à des plantes de tomate (ESPARTERO *et al.*, 1995) ou à des cultures cellulaires d'*Arabidopsis* (acclimatation, KIM *et al.*, 2007). Le métabolisme énergétique de plantules de riz est également activé en cas de stress thermique (froid, HASHIMOTO & KOMATSU, 2007). L'énoïase est finalement surexprimée dans différentes conditions de stress (MINHAS & GROVER, 1999 ; YAN *et al.*, 2005 ; HAUSMAN J.F., com. pers.) ainsi qu'au cours de la maturation des fruits (VAN DER STRAETEN *et al.*, 1991). Certains auteurs vont même plus loin et suggèrent un lien entre la glycolyse et une résistance accrue à l'accumulation de dégâts oxydatifs (KONDOH *et al.*, 2007a). Ces travaux

réalisés sur cellules humaines ont également mis en évidence le rôle primordial joué par la phosphoglycérate mutase dans la régulation du flux glycolytique dans un contexte de stress oxydatif (KONDOH *et al.*, 2007b). La transposabilité de cette hypothèse sur cellules végétales reste cependant à évaluer. Ainsi, une production accrue de phosphoénolpyruvate pourrait alimenter la voie de l'acide shikimique, permettant la production de phénylalanine, précurseur bien connu des voies de synthèse des composés phénoliques possédant un pouvoir antioxydant (Figure 69). Au niveau du métabolisme primaire, cette augmentation d'abondance de deux enzymes glycolytiques va de pair avec une diminution lente de la respiration très généralement observée au cours du stockage à basse température des tubercules (BURTON, 1989 ; BARICHELLO *et al.*, 1990 ; MARANGONI *et al.*, 1997). Cette diminution du taux respiratoire à basse température est liée à une inhibition des phosphorylations oxydatives mitochondriales (BLENKINSOP *et al.*, 2003). Chez les plantes sensibles au stress de basse température, elle est habituellement associée à une activation compensatoire des respirations anaérobies (LEVITT, 1980). Dans les tubercules de pomme de terre stockés à basse température, l'accumulation de sucres réducteurs est d'ailleurs inversement proportionnelle au contenu en lactate et en éthanol (BLENKINSOP *et al.*, 2003). Cette observation est donc cohérente avec l'hypothèse de LEVITT. L'augmentation de la glycolyse et des fermentations couplées à une diminution lente de la respiration pourrait donc modifier le métabolisme énergétique en favorisant la production d'ATP et de NADH non consommatrice d'oxygène. Ces couplages pourraient être responsables d'une diminution de la production de ROS et constituer ainsi une réponse à un stress oxydatif potentiel. Cette hypothèse devra cependant être validée à l'aide de données directes.

Vieillesse, sénescence ou maturation, simple question de sémantique ?

A l'échelle d'un organe, le vieillissement est principalement dû à des processus dégénératifs stochastiques dirigés par des forces extérieures qui dépassent progressivement le métabolisme domestique contrôlé génétiquement ainsi que le potentiel de protection (HADFIELD & BENNETT, 1997 ; BECK & SCHEIBE, 2003). La sénescence désigne, quant à elle, la dernière phase du développement végétal sous dépendance du patrimoine génétique de l'individu où s'initient des séries d'événements de plus en plus irréversibles qui conduisent à la dégénérescence cellulaire (HARTMANN, 1992 ; GAN & AMASINO, 1997, THOMAS, 2002 ; DERTINGER *et al.*, 2003 ; YOSHIDA, 2003 ; JONES & SMIRNOFF, 2005). Enfin, le concept de maturation est généralement utilisé au cours du développement des tubercules précédant la récolte (P. DU JARDIN, com. pers.).

Dans le contexte post-récolte étudié, notre index d'âge physiologique évolue entre 0,08 et 0,86. Cette évolution de l'âge physiologique est conséquente et permet de bien rendre compte des différentes modifications du profil de germination qui y sont associées. Nos données biochimiques ne cadrent cependant pas avec la théorie oxydative du vieillissement telle que décrite par Denham HARMAN en 1956. Cette théorie postule que l'accumulation de modifications non enzymatiques sur les biomolécules cellulaires, causées par des attaques de ROS, est l'un des facteurs principaux de la détérioration fonctionnelle observée au cours du vieillissement. Dans le modèle étudié, les nombreuses modifications métaboliques observées permettent aux tubercules de répondre efficacement à une génération accrue de ROS. Aucune accumulation de dégâts oxydatifs n'a en effet été mise en évidence. Il semblerait donc que, dans l'intervalle de stockage considéré, notre modèle ne vieillisse pas au sens délétère (gérontologique) du terme.

Peut-on dès lors parler de vieillissement ? Tout dépend en fait de la définition de ce concept. Défini de façon très neutre comme étant l'évolution de l'âge physiologique du tubercule de pomme de terre (REUST, 1982), le concept de vieillissement s'applique bien à nos données physiologiques et biochimiques. Au cours des 270 jours de stockage, cette évolution physiologique va de pair avec une augmentation de la vigueur de germination, seules les valeurs de PAI extrêmes manifestant des effets délétères au niveau du phénotype de levée (Figure 33). De même, certains antioxydants tels que le glutathion voient leur concentration diminuer en fin de stockage (Figure 68). Par analogie avec les modèles animaux, l'intervalle de stockage utilisé se situerait donc principalement dans une phase préreproductive se terminant lorsque le niveau maximal de vigueur physique est atteint. Le vieillissement au sens délétère du terme n'interviendrait qu'en fin de stockage, lorsque les premiers effets néfastes de l'âge se marquent sur le profil de germination. On entrerait ainsi dans une phase de déclin post-reproductive telle que décrite sur modèles animaux (SOHAL (2002a).

Comme nous le verrons au point 2.3, l'évolution du système étudié tranche nettement avec le comportement d'autres modèles liés au vieillissement au sens délétère (graines) ou à la sénescence. L'utilisation de tubercules de pomme de terre comme modèle de vieillissement au sens délétère ne peut donc se concevoir que si l'on réalise des stockages à basse température durant des intervalles de temps très longs (plusieurs années). Le PAI ou la période d'incubation ne peuvent cependant pas être utilisés pour caractériser l'âge physiologique dans ce type d'expérimentation car ils ne s'appliquent qu'à des tubercules non épuisés capables de régénérer une plante.

2.3 Comparaison de notre modèle avec d'autres modèles de vieillissement et de sénescence

Afin de caractériser plus avant notre système biologique, une comparaison sur base bibliographique peut être réalisée avec d'autres systèmes présentant une évolution d'âge physiologique. Dans un premier temps, nos données seront comparées avec celles obtenues au cours du vieillissement de graines. Par la suite, un parallèle sera également établi avec des modèles de sénescence d'organes photosynthétiques et non photosynthétiques.

2.3.1 Vieillessement agronomique et accéléré des graines

On distingue au niveau méthodologique deux types de vieillissement post-récolte de graines. Le premier, réalisé dans des conditions de température (comprise entre 5 et 20°C) et d'humidité (inférieure à 40%) permettant un stockage à long terme, est qualifié d'« agronomique ». Le second, réalisé dans des conditions favorisant l'évolution rapide de l'âge physiologique (HR relativement élevée, température généralement égale ou supérieure à 40°C), est qualifié d'« accéléré ». Les données obtenues à l'aide de ces deux variantes de vieillissement sont généralement cohérentes : nous ne les distinguerons donc pas systématiquement au cours de cette discussion (Tableau 18).

Au cours du vieillissement de graines et de caryopses, on observe une diminution du pouvoir germinatif, allant généralement de pair avec une diminution de concentration des antioxydants non enzymatiques tels que les caroténoïdes, l' α -tocophérol, le GSH et le glutathion total. Le système GSH est principalement localisé dans l'embryon des graines en vieillissement. Des réactions consommant le pool de GSH et empêchant une accumulation de GSSG lui permettent d'assurer un rôle protecteur des biomolécules (DE PAULA *et al.*, 1996). La diminution marquée de la concentration en glutathion et le déplacement de statut redox du glutathion vers une forme plus oxydée durant le vieillissement semblent jouer un rôle dans la

diminution du pouvoir germinatif observée (HSU & SUNG, 1997). L'AsA n'est pas présent dans les graines déshydratées (DE GARA *et al.*, 1997 ; SMIRNOFF, 2005). Les composantes enzymatiques du système antioxydant voient également leur activité diminuer au cours du vieillissement (cas de la SOD, de la CAT, de l'APX et de la POX). D'autres mesures sont variables selon les auteurs et ne permettent pas de dégager une tendance globale. C'est ainsi le cas de la concentration protéique, des activités LOX et GR et de la concentration en GSSG. La concentration en H₂O₂ augmente également au cours du vieillissement. Ces modifications de l'équilibre des systèmes pro- et anti- oxydants s'accompagnent d'une augmentation de l'oxydation lipidique et du taux de pertes d'électrolytes. Les activités protéolytiques hémoglobine, carboxypeptidase et azocasinase augmentent finalement nettement avec l'âge physiologique de grains de blé en vieillissement accéléré (GALLESCHI *et al.*, 2002).

Les résultats de GOEL *et al.* (2003) suggèrent que la détérioration membranaire des graines de coton durant un processus de vieillissement accéléré est très fortement corrélée avec une diminution des activités enzymatiques antioxydantes et une augmentation de la peroxydation lipidique. Il est cependant délicat de décider si les pertes d'activité enzymatique et l'augmentation des dégâts oxydatifs sont la cause ou la conséquence de la perte de pouvoir germinatif. Le lien entre peroxydation lipidique et perte d'intégrité membranaire n'est pas clairement établi (BAILLY *et al.*, 1996).

L'évolution du tubercule de pomme de terre au cours du vieillissement se distingue nettement de celle observée sur graines. En effet, la capacité germinative de notre système augmente au cours du vieillissement. Le tubercule comporte une phase aqueuse importante associée à la présence d'AsA. L'évolution des composantes non-enzymatiques et enzymatiques du système antioxydant est de plus typique d'une réponse à un stress oxydatif impliquant une activation séquentielle des différents constituants (cas de la SOD, de l'AsA-APX et de la CAT, par exemple). Le couple GSH/GSSG présente également une évolution très différente de celle observée sur graines. Cette activation du système antioxydant couplée à la surexpression de systèmes de recyclage (protéasome 20S) permet d'éviter la production ou l'accumulation de dégâts oxydatifs, tant sur lipides que sur protéines. Nous avons par contre observé une protéolyse accrue de la patatine. Une augmentation de la perte d'intégrité membranaire a également été mise en évidence par FAUCONNIER *et al.* en 2002 dans des conditions de stockage identiques aux nôtres (même cv., même température, durée similaire). Cependant, ces deux processus ne semblent pas être associés à une détérioration fonctionnelle précoce du système, mais plutôt à une mobilisation des substances de réserve au départ des différents tissus parenchymateux. Les résultats obtenus au niveau de l'évolution de l'activité LOX sont cohérents avec ceux obtenus par SUNG & JENG (1994) et SUNG & CHIU (1995), mais sont contradictoires avec ceux de ZACHEO *et al.* (1998) et BAILLY *et al.* (2002). La signification physiologique de cette évolution reste néanmoins à établir.

2.3.2 *Sénescence d'organes photosynthétiques et non photosynthétiques*

La sénescence implique des processus de mobilisation et de recyclage des biomolécules. Les résultats obtenus dans le cadre d'études ciblant la sénescence végétale sont relativement cohérents, mais la multiplicité des modèles étudiés ne permet pas toujours de généraliser les tendances observées (Tableau 19).

Même si la formation des ROS n'initie pas en elle-même la sénescence naturelle, des modifications importantes du système antioxydant s'opèrent cependant au cours de ce processus (JONES & SMIRNOFF, 2005 ; ZENTGRAF, 2007). En ce qui concerne les antioxydants non enzymatiques, les concentrations en AsA (JONES & SMIRNOFF, 2005), glutathion total et

caroténoïdes diminuent au cours de la sénescence, alors que la concentration en α -tocophérol a tendance à augmenter (SMIRNOFF, 2005). Cette dernière augmentation permet de limiter le stress oxydatif engendré par la β -oxydation des acides gras (SMIRNOFF, 2005). Les composés antioxydants enzymatiques (SOD, CAT, APX, GR) voient également leur activité diminuer (ZENTGRAF, 2007). Les modifications liées à la sénescence dans le métabolisme des ROS au sein des peroxysomes sont ainsi principalement caractérisées par une diminution de l'activité CAT, une surproduction de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène et une forte diminution des activités MDHAR et APX (DEL RIO *et al.*, 2006). La capacité d'élimination des ROS est donc clairement diminuée, ce qui entraîne l'accumulation d' H_2O_2 provoquant une oxydation lipidique accrue. Ce processus d'oxydation non enzymatique s'accompagne généralement d'une augmentation de l'activité LOX. L'équilibre correctement ajusté entre le catabolisme des phospholipides membranaires et leur synthèse et remodelage joue en fait un rôle important dans la régulation des processus de sénescence. Au niveau catabolique, après fixation sur la calmoduline, l'entrée de Ca^{2+} dans le cytosol active la phospholipase A_2 . Cette dernière libère l'acide linoléique ou l'acide linolénique de leur position *sn-2* dans les phospholipides intacts, ce qui rend ces substrats disponibles pour la LOX. L'action de cette enzyme génère des hydroperoxydes, de l'éthylène, des ionophores à Ca^{2+} endogènes, du malonedialdéhyde et de l'acide jasmonique. Ces composés peuvent se recycler dans les membranes, ce qui accentue l'entrée de Ca^{2+} et induit un nouveau cycle catabolique. Les membranes entrent ainsi progressivement en sénescence et subissent des changements biophysiques altérant la microviscosité, la fluidité, la configuration de phase des phospholipides membranaires ainsi que leur température de transition (LESHEM, 1987). A ce sujet, les effets des ions superoxydes sur la fluidité membranaire peuvent être indirects, en induisant une désestérification, ou directs s'il s'agit d'attaques oxydatives de ROS sur les phospholipides membranaires (MAYAK *et al.*, 1983). Ces changements biophysiques vont de pair avec une dégradation lipidique accrue. Les produits de dégradation des lipides sont métabolisés et convertis en saccharose translocable en dehors de la structure sénescence par voie phloémienne (YOSHIDA, 2003). La sénescence se marque enfin par une augmentation de la perte d'électrolytes, très nette au cours de la sénescence avancée menant rapidement à la mort (HARTMANN, 1992). Parallèlement à ces modifications, une décroissance de la concentration protéique est observée. Elle est liée à une protéolyse accrue impliquant notamment les protéasomes 20S et 26S et permettant de recycler les acides aminés avant la mort de l'organe concerné (ROBERTS *et al.*, 2002 ; YOSHIDA, 2003 ; HOPKINS *et al.*, 2007). Le protéasome 26S est également impliqué dans la maturation (sénescence) des trachéides (SMALLE & VIERSTRA, 2004).

De nouveau, le parallèle entre notre modèle de vieillissement et les modèles de sénescence évoqués n'est pas évident, les modifications subies par le système antioxydant au cours du vieillissement des tubercules ne semblant pas avoir d'impacts délétères majeurs dans l'intervalle d'âge physiologique étudié. Malgré ces différences, la concentration en AsA diminue au cours du vieillissement et de la sénescence. Cette diminution s'accompagne cependant chez la pomme de terre d'une activation des systèmes de défense impliquant le GSH, les caroténoïdes et les antioxydants enzymatiques. Au niveau lipidique, le vieillissement et la sénescence s'accompagnent tous deux d'une perte d'intégrité membranaire. Aucune accumulation d'oxylipines n'a pu être détectée au cours du vieillissement des tubercules, contrairement à ce que l'on peut observer au cours de la sénescence. En outre, à l'exception du 9-HPOT du cv. Bintje, la proportion d'oxylipines produites non enzymatiquement évolue peu au cours du vieillissement. *A contrario*, dans le contexte de la sénescence foliaire, plus de 50 % des HPO sont produits de façon non enzymatique avant l'abscission (BERGER *et al.*, 2001). Nous pouvons néanmoins mentionner

que des études réalisées dans des conditions favorisant le vieillissement des tubercules ont permis de mettre en évidence une production non enzymatique accrue de 9-HPOD au cours d'un stockage à 20°C pendant 350 jours (DELAPLACE *et al.*, manuscrit soumis).

En ce qui concerne la concentration protéique, aucun impact significatif du vieillissement n'a été mesuré au cours du stockage de nos tubercules. Une diminution importante du contenu en protéines solubles a cependant été mise en évidence par KUMAR & KNOWLES (1993a) après un stockage de 30 mois à 4°C. Au cours de notre étude, nous avons également détecté la surexpression du protéasome 20S impliqué dans les processus de sénescence. Il semblerait cependant que cette surexpression soit liée ici à une réponse à une production accrue de ROS destinée à éviter une accumulation de protéines oxydées et non à un recyclage des biomolécules précédant la mort.

Comme nous avons pu le constater, le taux respiratoire décroît très généralement au cours du stockage des tubercules de pomme de terre. Cette tendance va également à l'encontre de ce qui est observé au cours de la sénescence foliaire (CARP & GEPSTEIN, 2007).

En conclusion, notre modèle se distingue nettement des autres modèles liés au vieillissement des graines et à la sénescence de feuilles ou de fruits. Comme mentionné précédemment, cette comparaison pourrait remettre en question l'usage même du terme « vieillissement » pour décrire l'évolution physiologique des tubercules dans un contexte agronomique.

Evolution de différents paramètres mesurés au cours de la sénescence d'organes végétaux																			
Références	Conditions expérimentales	Oxydation lipidique	Activité LOX	Pertes d'électrolytes	Contenu en protéines	Contenu en H ₂ O ₂	Activité SOD	Activité CAT	Activité APX	Activité POX	Activité GR	Contenu en GSH	Contenu en GSSG	Contenu en GSH + GSSG	Contenu en AsA	Contenu en DHA	Contenu en AsA + DHA	Contenu en caroténoïdes	Contenu en α-tocophérol
GROSSMANN & LESCHEM, 1978	Feuilles de pois sénescences		+																
DHINDSA <i>et al.</i> , 1981	Feuille de tabac sénescence, attachée à la plante et exposée à la lumière	++		++	--		-- OU OO	--											
LESHEM <i>et al.</i> , 1981	Tige et feuilles de pois coupées (explants caulino-foliaires), sénescences à la lumière		++																
KAR & FEIERABEND, 1984	Feuilles coupées de blé et de seigle, sénescences à l'obscurité	+	--		---	++	'--- OU OO	---		+++									
KAR & FEIERABEND, 1984	Feuilles coupées de blé et de seigle, sénescences à la lumière	+++	---		--	+++	'--- OU OO	--		++									
LYNCH & THOMPSON, 1984	Cotylédons étioles de pois en sénescence		+++																
VENKATARAYAPPA <i>et al.</i> , 1984	Feuilles primordiales de pois, intactes et sénescences à la lumière	+++		OO--	--		++--	++--		++								--	
PETERMAN & SIEDOW, 1985	Cotylédons de soja sénescents à la lumière		---																
SYLVESTRE <i>et al.</i> , 1989	Œillets coupés et sénescents à la lumière	+++	++				--	++--											
ROUET-MAYER <i>et al.</i> , 1992	Pétales d'œillet sénescents		+																
DU & BRAMLAGE, 1994	Epiderme de pomme sénescence à 0°C						O+ OU --												
PANAVAS & RUBINSTEIN, 1998	Pétales d'hémérocalce sénescents		+																
FUKUCHI <i>et al.</i> , 2000	Pétales de rose sénescents		+																
BAILLY <i>et al.</i> , 2001	Tépales d'iris en inflorescence coupée et sénescence à la lumière						--	++	--		OO								
PROCHAZKOVA <i>et al.</i> , 2001	Feuilles de maïs intactes, sénescences à la lumière	++				++	+OO--	+OO-	OO--	+OO--									+++
DETINGER <i>et al.</i> , 2003	Feuilles de tabac intactes sénescences à la lumière				---		--	--	--		---			---			---		+++
MONDAL <i>et al.</i> , 2003	Tomate coupée et sénescence à l'obscurité	++	++			++	--	--	--	--	--								
DEPLAACE <i>et al.</i> , 2007	Vieillessement à 4°C de tubercules de pomme de terre	+-- (oxylipines libres)	-		OO		++OO+	-+++	OO++	OO+ OU OO-		++O-	OO OU ++	++O-	---OO	OO	--OO	+++O par g PF	

Tableau 19. Comparaison des données biochimiques publiées mesurées au cours de la sénescence de différents organes. - : diminution ; o : stable ; + : augmentation.

3 PERSPECTIVES

3.1 Aspects fondamentaux

Nos travaux nous ont permis de caractériser de façon intégrée certaines modifications physiologiques et biochimiques s'opérant au cours de l'évolution de l'âge physiologique des tubercules de pomme de terre. Notre démarche s'est voulue la plus large possible en combinant une approche sans *a priori* basée sur le DIGE et une approche ciblée étudiant le système antioxydant. En établissant un parallèle avec les recherches effectuées sur le vieillissement animal (SOHAL, 2002), nos résultats pourraient être utilement complétés grâce à l'outil transgénique. Ainsi, dans le contexte de la théorie oxydative du vieillissement, l'utilisation de lignées transgéniques sur- ou sous- exprimant une catalase (BAJJI *et al.*, 2007b) pourrait permettre d'évaluer l'impact de ces modifications métaboliques sur (1) la vitesse de vieillissement via le PAI, (2) le protéome en utilisant l'outil DIGE développé pour cette thèse et (3) le système antioxydant et ses composantes enzymatiques et non enzymatiques en recherchant d'éventuels mécanismes compensatoires.

Néanmoins, au vu de la complexité des processus impliqués dans le vieillissement, nous devons reconnaître que cette démarche possède un caractère moniste et que d'autres facettes importantes du problème restent à évaluer.

Ainsi, au cours du stockage, de nombreuses modifications s'opèrent également au niveau des phytohormones (COLEMAN, 2000). A titre d'exemple, la concentration en acide indole-3-acétique (IAA : *Indole-3-acetic Acid*) augmente fortement au cours du vieillissement (REVERBERI *et al.*, 2001). Par ailleurs, LINDBLOOM avait proposé dès 1966 que la dominance apicale observée dans les premiers stades de vieillissement était déterminée par le rapport de concentrations en IAA et acide gibbérellique GA₃. Plus récemment, COLEMAN (2000) a avancé l'idée que l'IAA, les cytokinines et l'acide abscissique pourraient être impliqués dans la levée de dominance apicale et dans la modulation de la vigueur de croissance. Les différentes classes de phytohormones influencent également la levée de dormance (pour revue, voir FERNIE & WILLMITZER, 2001). Comme présenté à la Figure 22, ces phytohormones agissent en interaction avec le système antioxydant, de nombreux échanges (*cross-talking*) existant entre les voies de signalisation métabolique. A ce titre, les phytohormones peuvent intervenir en aval du signal transmis par les ROS. Parallèlement, les ROS sont également des messagers secondaires dans de nombreuses voies de signalisation hormonales (VRANOVA *et al.*, 2002 ; DESIKAN *et al.*, 2005). L'impact de ces interactions reste cependant à évaluer au cours du vieillissement des tubercules de pomme de terre.

Finalement, dans une perspective fondamentale plus large, l'index d'âge physiologique que nous avons employé pourrait être utilisé afin de caractériser d'autres processus dépendant du vieillissement des tubercules. Comme mentionné dans l'introduction bibliographique, la capacité de cicatrisation du tubercule est influencée par son âge. D'autres paramètres tels que l'évolution des propriétés technologiques ou la sensibilité aux maladies de post-récolte pourraient également être étudiés en référence aux valeurs de PAI.

3.2 Aspects appliqués

Comme suggéré par O'BRIEN *et al.* (1983), l'âge physiologique optimal d'un tubercule dépend des débouchés prévus pour la culture (Figure 8). Dans une perspective de filière intégrée, notre index d'âge physiologique pourrait être appliqué afin de caractériser des lots de tubercules ou d'évaluer les modifications d'âge physiologique en fonction des conditions de stockage. Néanmoins, en raison du délai nécessaire pour obtenir les résultats, cet index ne peut être utilisé dans un but prédictif.

L'ensemble des données obtenues dans le cadre de cette thèse peut par contre être utilisé afin de rechercher des marqueurs biochimiques de l'âge physiologique pouvant être utilisés dans un but prédictif. Cette problématique d'application est complexe et nécessite de nombreuses validations (établissement d'un protocole standard d'échantillonnage, sélection des biomarqueurs les mieux adaptés au but recherché, comparaisons inter-variétales et interannuelles, etc...) avant de parvenir à un résultat exploitable sur le terrain. Un indicateur d'âge physiologique idéal doit être (a) facile à mesurer, objectif, reproductible et fiable ; (b) capable de prendre en compte l'environnement, le cultivar et leur interaction ; (c) sensible au traitement des tubercules semences ; (d) discriminant en fonction du lot, de son origine et de son histoire de stockage ; (e) compatible avec la notion d'âge chronologique (CALDIZ *et al.*, 2001) ; (f) peu coûteux et (g) rapide à analyser afin de permettre le traitement de nombreux échantillons en parallèle. Dans les paragraphes qui viennent, nous tenterons d'esquisser certaines pistes pouvant mener à l'utilisation en routine de certains marqueurs du vieillissement.

La première étape consiste à définir la base d'évaluation des biomarqueurs et à choisir le type de tendance recherché. Dans une perspective d'application, on peut en effet rechercher des biomarqueurs corrélés soit avec le PAI, soit avec les paramètres de levée à 30 ou 100 jours. Un ou plusieurs biomarqueurs peuvent être utilisés en parallèle afin d'évaluer l'âge physiologique. En fonction des objectifs poursuivis, une tendance linéaire pourra être préférée si l'on désire caractériser finement l'âge physiologique. *A contrario*, il est également possible de sélectionner des biomarqueurs présentant des variations uniquement liées au stade physiologique optimum recherché (par exemple, germes multiples vigoureux). A titre d'exemple, l'abondance de la phosphoglycérate mutase varie de façon linéaire en fonction du PAI ($R^2 = 0,96$). Il est donc aisé d'établir un lien entre l'abondance de cette protéine et l'âge physiologique des tubercules. Il faudra cependant identifier pour chaque cv. les valeurs critiques de PAI correspondant aux différents stades de levée. Complémentairement, la glyoxalase I, le polypeptide DREPP4 ou le produit de dégradation de la LOX identifiés sur gel 2D présentent une augmentation d'abondance très nettement liée avec la levée de dominance apicale mesurée via le nombre de tiges produites à 100 jours. L'identité des protéines utilisées comme biomarqueurs est également à prendre en compte. Nous ne conseillons pas l'utilisation des produits de dégradation de la patatine comme biomarqueurs car ils peuvent par exemple poser de lourds problèmes lors de la mise au point de la technique permettant l'évaluation de leur abondance en routine (épitopes communs, par exemple).

Au niveau technique, plusieurs solutions sont également envisageables. Les biomarqueurs identifiés sur gels 2D peuvent être quantifiés à l'aide de techniques sérologiques de type ELISA ou dérivées (version multiplexée). Une quantification plus précise peut par ailleurs être obtenue en établissant des rapports d'abondance avec des protéines issues de gènes ménagers qui présentent une expression stable. Les données issues de l'approche ciblée ne sont cependant pas à négliger. Des dosages spectrophotométriques d'activité enzymatique telle que la CAT sont aisés à réaliser et pourraient se révéler bien adaptés à notre problématique.

Comme nous pouvons le constater, le problème n'est pas simple et ces perspectives d'application constituent un sujet de recherche en soi, nécessitant de nombreuses années de mise au point. Nous sommes cependant en mesure d'espérer que la recherche que nous avons développée permettra, via les données obtenues et/ou les techniques mises au point, d'établir des bases solides de caractérisation de l'âge physiologique, prémices à de futures applications agronomiques.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS S., GREEN P., CLAXTON R., SIMCOX S., WILLIAMS M., WALSH K., LEEUWENBURGH C. (2001). Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Frontiers in bioscience*. Vol. 6, 17-24.

ANDRE C., OUFIR M., GUIGNARD C., HOFFMANN L., HAUSMAN J.F., EVERS D., LARONDELLE Y. (2007). Antioxidant profiling of native Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) reveals tubers with high levels of β -carotène, α -tocopherol, chlorogenic acid and petanin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Sous presse.

ANONYME. (2007). *FAOSTAT Database Results* [en ligne]. Disponible sur : < <http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx> > (consulté le 02/06/2007).

APELBAUM A. (1984). Polyamines as possible indicators of physiological age. *Potato Research*. Vol. 27, 309.

ARKING R. (1998). *Biology of aging : Observations and principles*. 2 éd. Sunderland : Sinauer Associates.

ARORA A., SAIRAM R.K., SRIVASTAVA C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. Vol. 82, 1227-1238.

ARTS I.C., HOLLMAN P.C.H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 81 Suppl., 317S-325S.

BACHEM C., VAN DER HOEVEN R., LUCKER J., OOMEN R., CASARINI E., JACOBSEN E., VISSER R.G.F. (2000). Functional genomic analysis of potato tuber life-cycle. *Potato Research*. Vol. 43, 297-312.

BACHEM C.W.B., VAN DER HOEVEN R.S., DE BRUIJN S.M., VREUGDENHIL D., ZABEAU M., VISSER R.G.F. (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal*. Vol. 9, 745-753.

BAILLY C., BENAMAR A., CORBINEAU F., COME D. (1996). Changes in malondialdehyde content and in superoxyde dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*. Vol. 97, 104-110.

BAILLY C., BOGATEK-LESZCZYNSKA R., COME D., CORBINEAU F. (2002). Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Science Research*. Vol. 12, 47-55.

BAILLY C., CORBINEAU F., VAN DOORN W.G. (2001). Free radical scavenging and senescence in *Iris* tepals. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 39, 649-656.

BAJJI M., COLSON M., DELAPLACE P., GASTINY F., DU JARDIN P. (2004). Wound-healing of the potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber in response to catalase inhibition. *Acta Physiologiae Plantarum*. Vol. 26 supplément, 223.

BAJJI M., M'HAMDI M., GASTINY F., DELAPLACE P., FAUCONNIER M.-L., DU JARDIN P. (2007a). Catalase inhibition alters suberization and wound-healing in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Physiologia Plantarum*, Vol. 129, 472-483.

BAJJI M., M'HAMDI M., GASTINY F., ROJAS-BELTRAN J.A., DU JARDIN P. (2007b). Catalase inhibition accelerates dormancy release and sprouting in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. Vol. 11, 121-131.

BARICHELLO V., YADA R.Y., COFFIN R.H., STANLEY D.W. (1990). Respiratory activity in low temperature sweetening of susceptible and resistant potatoes. *Journal of Food Science*. Vol. 55, 1060-1063.

- BAUW G., NIELSEN H., EMMERSEN J., NIELSEN K.L., JORGENSEN M., WELINDER K.G. (2006).** Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. *FEBS Journal*. Vol. 273, 3569-3584.
- B-CGMS (2006).** Agrometeorological bulletins [en ligne]. Disponible sur < http://b-cgms.cra.wallonie.be/en/Agrometeorological_Bulletins/Bulletins_FR.aspx > (consulté le 25/09/2007)
- BEAUCHAMP C.O., FRIDOVICH I. (1971).** Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Analytical Biochemistry*. Vol. 44, 276-287.
- BECK E., SCHEIBE R. (2003).** Senescence and ageing in plants and cyanobacteria. *Physiologia Plantarum*. Vol. 119, 1-4.
- BERGER S., WEICHERT H., PORZEL A., WASTERNAK C., KÜHN H., FEUSSNER I. (2001).** Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochimica Biophysica Acta*. Vol. 1533, 266-276.
- BERKELMAN T., STENSTEDT T. (1998).** *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients : Principles and Methods*. Edition AB. Upssala, Sweden : Amersham Biosciences.
- BERLETT B.S., STADTMAN E.R. (1997).** Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. Vol. 272, 20313-20316.
- BIOTTO C., SIEGENTHALER P.A. (1991).** Study of physiological states of seed potato tubers during their storage. Correlations between morphological and biochemical parameters. Réunion de la Section Physiologie EAPR. Le Conquet, France, pp. 39-40.
- BLENKINSOP R.W., COPP L.J., YADA R.Y., MARANGONI A.G. (2003).** A proposed role for the anaerobic pathway during low-temperature sweetening in tubers of *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*. Vol. 118, 206-212.
- BLOKHINA O., VIROLAINEN E., FAGERSTEDT K.V. (2003).** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. Vol. 91, 179-194.
- BODLAENDER K.B.A., DEKHUIJZEN H.M., MARINUS J., VAN ES A., HARTMANS K.L., KUPERS L.J.P., VAN LOON C.D., VAN DER ZAAG D.E. (1987).** Effect of physiological age on growth vigour of seed potatoes. A study with seed tubers of two cultivars stored at two different temperatures. Rapport 555. Instituut voor Bewaring en Verwerking van Land bouwprodukten (IBVL), Wageningen, the Netherlands, p. 142.
- BOHAC J.R. (1991).** A modified method to purify patatin from potato tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 39, 1411-1415.
- BOHLER S., BAGARD M., OUFIR M., PLANCHON S., HOFFMANN L., JOLIVET Y., HAUSMAN J.-F., DIZENGREMEL P., RENAUT J. (2007).** A DiGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics*. Vol. 7, 1584-1599.
- BORGHETTI F., NAKAMURA NODA F., MARTINS DE SÁ C. (2002).** Possible involvement of proteasome activity in ethylene-induced germination of dormant sunflower embryos. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. Vol. 14, 125-131.
- BORGMANN K., SINHA P., FROMMER W.B. (1994).** Changes in the two-dimensional protein pattern and in gene expression during the sink-to-source transition of potato tubers. *Plant Science*. Vol. 99, 97-108.
- BRADFORD M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol. 72, 248-254.
- BRIERLEY E.R., BONNER P.L.R., COBB A.H. (1997).** Aspects of amino acid metabolism in stored potato tubers (cv. Pentland Dell). *Plant Science*. Vol. 127, 17-24.

- BRISSON N., GIROUX H., ZOLLINGER M., CAMIRAND A., SIMARD C. (1989).** Maturation and subcellular compartmentation of potato starch phosphorylase. *The Plant Cell*. Vol. 1, 559-566.
- BUCHANAN B.B., BALMER Y. (2005).** Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Reviews of Plant Biology*. Vol. 56, 187-220.
- BUCHANAN B.B., GRUISSEM W., JONES R.L. (2000).** *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville : American Society of Plant Physiologists.
- BURTON W.G. (1966).** *The potato. A survey of its history and of factors influencing its yield, nutritive value, quality and storage*. Wageningen : H. Weeman & Zonen N.V.
- BURTON W.G. (1989).** *Post-harvest physiology*. In *The potato* (Burton, W.G., ed.), Harlow: Longman Scientific and Technical, pp. 423-522.
- CALDIZ D.O. (1991).** Influence of crop origin and storage system on physiological age, crop growth and tuber yield of seed potato (*Solanum tuberosum* L.) *Indian Journal of Agricultural Research*. Vol. 61, 1-6.
- CALDIZ D.O., BROCCHI G., ALANIZ J.R., MARCHAN L. (1996).** Effects of the physiological age of seed potatoes on tuber initiation and starch and dry matter accumulation. *Pesq. Agrop. Brasileira*. Vol. 31, 853-858.
- CALDIZ D.O., FERNANDEZ L.V., STRUIK P.C. (2001).** Physiological age index : a new, simple and reliable index to assess the physiological age of seed potato tubers based on the haulm killing date and length of the incubation period. *Field Crops Research*. Vol. 69, 69-79.
- CALDIZ D.O., PANELO M., CLAVER F.K., MONTALDI E.R. (1985).** The effect of two planting dates on the physiological age and yielding potential of seed potatoes grown in a warm temperature climate in Argentina. *Potato Research*. Vol. 28, 425-434.
- CALUCCI L., CAPOCCHI A., GALLESCHI L., GHIRINGHELLI S., PINZINO C., SAVIOZZI F., ZANDOMENEGHI M. (2004).** Antioxidants, free radicals, storage proteins, puroindolines, and proteolytic activities in bread wheat (*Triticum aestivum*) seeds during accelerated aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 52, 4274-4281.
- CARP M.-J., GEPSTEIN S. (2007).** Genomics and proteomics of leaf senescence. In Gan S., ed. *Senescence Processes in Plants*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, p. 39-62.
- CARPENTIER S.C., WITTERS E., LAUKENS K., DECKERS P., SWENNEN R., PANIS B. (2005).** Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*. Vol. 5, 2497-2507.
- CARRARD G., BULTEAU A.L., PETROPOULOS I., FRIGUET B. (2002).** Impairment of proteasome structure and function in aging. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol. 34, 1461-1474.
- CLAIBORNE A. (1985).** Catalase activity. In: Greenwald R.A. (eds). *CRC Handbook of methods in oxygen radical research*. Boca Raton, Florida : CRC Press., p 283-284.
- CLASSEN P.A.M., BUDDÉ M.A.W., VAN CALKER M.H. (1993).** Increase in phosphorylase activity during cold-induced sugar accumulation in potato tubers. *Potato Research*. Vol. 36, 205-217.
- CLAVER F.K. (1973).** Influence of temperature during the formation of tubers in relation with their incubation state (physiological age) and seed value. *Experientia*. Vol. 30, 97-98.
- COLAS DES FRANCS C., THIELLEMENT H., DE VIENNE D. (1985).** Analysis of leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*. Vol. 78, 178-182.
- COLEMAN W.K. (2000).** Physiological ageing of potato tubers : A Review. *Annals of Applied Biology*. Vol. 137, 189-199.

- CONRAD C.C., CHOI J., MALAKOWSKY C.A., TALENT J.M., DAI R., MARSHALL P., GRACY R.W. (2001).** Identification of protein carbonyls after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*. Vol. 1, 829-834.
- DALLE-DONNE I., ROSSI R., GIUSTARINI D., MILZANI A., COLOMBO R. (2003).** Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. Vol. 329, 23-38.
- DAMERVAL C., DE VIENNE D., ZIVY M., THIELLEMENT H. (1986).** Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*. Vol. 7, 52-54.
- DANON A., DELORME V., MAILHAC N., GALLOIS P. (2000).** Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 38, 647-655.
- DAVIES K.J.A. (1987).** Protein damage and degradation by oxygen radicals. I General aspects. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 162, 9895-9901.
- DAVIES K.J.A. (2001).** Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*. Vol. 83, 301-310.
- DAVIES H.V., VIOLA R. (1992).** Regulation of sugar accumulation in stored potato tubers. *Postharvest News and Information*. Vol. 3, 97N-100N.
- DE MAGALHÃES J.P. (2006).** *Glossary : Aging and Gerontology* [en ligne]. Disponible sur <<http://www.senescence.info/glossary.html>> (consulté le 07/07/2007).
- DE PAULA M., PEREZ-OTAOLA M., DARDER M., TORRES M., FRUTOS G., MARTIMEZ-HONDUVILLA C.J. (1996).** Function of the ascorbate-glutathione cycle in aged sunflower seeds. *Physiologia Plantarum*. Vol. 96, 543-550.
- DE PINTO M.C., FRANCIS D., DEGARA L. (1999).** The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco TBY2 cells. *Protoplasma*. Vol. 209, 90-97.
- DE VOS C.H.R., KRAAK H.L., BINO R.J. (1994).** Ageing of tomato seeds involves glutathione oxidation. *Physiologia Plantarum*. Vol. 92, 131-139.
- DE WEERD J.W., HILLER L.K., THORNTON R.E. (1995).** Electrolyte leakage of aging potato tubers and its relationship with sprouting capacity. *Potato Research*. Vol. 38, 257-270.
- DEL RIO L.A., SANDALIO L.M., CORPAS F.J., PALMA J.M., BARROSO J.B. (2006).** Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signalling. *Plant Physiology*. Vol. 141, 330-335.
- DELAPLACE P. (2004).** *Etude et caractérisation de l'âge physiologique de tubercules de pomme de terre (Solanum tuberosum L.) – Mise en place du modèle expérimental*. Gembloux : FUSAGx, 95 p.
- DELAPLACE P., FAUCONNIER M.-L. (2004).** Le stockage post-récolte des tubercules de pommes de terre : une étape clé du processus de production. *Troupeaux et cultures des tropiques*, Vol. 4, pp. 27-34.
- DELAPLACE P., DIERICK J.-F., FAUCONNIER M.-L., VAN DER WAL F., CORDEWENER J., AMERICA A.H.P., DU JARDIN P. (2005).** Characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing using physiological and proteomic markers (2D-PAGE). *The FEBS Journal*, Vol. 272, Supplement 1, p.71.
- DELAPLACE P., VAN DER WAL F., DIERICK J.-F., CORDEWENER J.H.G., FAUCONNIER M.-L., DU JARDIN P., AMERICA A.H.P. (2006).** Potato tuber proteomics: Comparison of two complementary extraction methods designed for 2-DE of acidic proteins. *Proteomics*, Vol. 6, 6494-6497.
- DEROCHER A.E., VIERLING E. (1994).** Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *The Plant Journal*. Vol. 5, 93-102.

- DETINGER U., SCHAZ U., SCHULZE E.-D. (2003).** Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins. *Physiologia Plantarum*. Vol. 119, 19-29.
- DESIKAN R., HANCOCK J., NEILL S. (2005).** Reactive oxygen species as signalling molecules. In Smirnoff N., ed. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, p. 169-196.
- DÉSIRÉ S., COUILLEROT J.P., HILBERT J.L., VASSEUR J. (1995).** Protein changes in *Solanum tuberosum* during storage and dormancy breaking of *in vitro* microtubers. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 33, 479-487.
- DHINDSA R.S., PLUMB-DHINDSA P., THORPE T.A. (1981).** Leaf senescence : correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 32, 93-101.
- DIAZ-CAMINO C., CONDE R., OVSENEK N., VILLANUEVA M.A. (2005).** Actin expression is induced and three isoforms are differentially expressed during germination in *Zea mays*. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 56, 557-565.
- DIPIERRO S., DE LEONARDIS S. (1997).** The ascorbate system and lipid peroxidation in stored potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 48, 779-783.
- DRØBAK B.K., FRANKLIN-TONG V.E., STAIGER C.J. (2004).** The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. *New Phytologist*. Vol. 163, 13-30.
- DU Z., BRAMLAGE W.J. (1994).** Superoxide dismutase activities in senescing apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Food Science*. Vol. 59, 581-584.
- DYSON P.W., DIGBY J. (1985).** Effects of calcium on sprout growth of ten potato cultivars. *Potato Research*. Vol. 18, 363-377.
- EMILSSON B. (1949).** Studies on the rest period and dormant period in the potato tuber. *Act. Agr. Suec.* Vol. 111, 189-284.
- ESPARTERO J., SANCHEZ AGUAYO I., PARDO J.M. (1995).** Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Molecular Biology*. Vol. 29, 1223-1233.
- ESPEN L.S., MORGUTTI S., COCUCCI S.M. (1999).** Changes in the potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber at the onset of dormancy and during storage at 23 °C and 3 °C. II. Evaluation of protein patterns. *Potato Research*. Vol. 42., 203-215.
- EWING E.E. (1978).** Critical photoperiods for tuberization : a screening technique with potato cuttings. *American Potato Journal*. Vol. 55, 43-53.
- EWING E.E., WAREING P.F. (1978).** Shoot, stolon and tuber formation on potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. *Plant Physiology*. Vol. 61, 348-353.
- FAUCONNIER M.-L., ROJAS-BELTRÁN J., DELCARTE J., DEJAEGHERE F., MARLIER M., dU JARDIN P. (2002).** Lipoxigenase Pathway and Membrane Permeability and Composition during Storage of Potato Tubers (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje and Désirée) in Different Conditions. *Plant Biology*. Vol. 4, 77-85.
- FAUCONNIER M.-L., WELTI R., BLEE E., MARLIER M. (2003).** Lipid and oxylipin profiles during aging and sprout development in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1633, 118-126.
- FEIERABEND J. (2005).** Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. In Smirnoff N., ed. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, p. 101-140.

- FERNIE A.R., WILLMITZER L. (2001).** Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology*. Vol. 127, 1459-1465.
- FEUSSNER I., WASTERNAACK C. (2002).** The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*. Vol. 53, 275-297.
- FIRMAN D.M., O'BRIEN P.J., ALLEN E.J. (1995).** Appearance and growth of individual leaves in canopies of several potato cultivars. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. Vol. 125, 379-394.
- FLINN B., ROTHWELL C., GRIFFITHS R., LÄGUE M., DeKOEYER D., SARDANA R., AUDY P., GOYER C., LI X.-Q., WANG-PRUSKI G., REGAN S. (2005).** Potato expressed sequence tag generation and analysis using standard and unique cDNA libraries. *Plant Molecular Biology*. Vol. 59, 407-433.
- FOYER C.H., GOMEZ L.D., VAN HEERDEN P.D.R. (2005).** Glutathione. In Smirnoff N., ed. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, p. 1-24.
- FOYER C.H., NOCTOR G. (2003).** Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*. Vol. 119, 355-364.
- FOYER C.H., NOCTOR G. (2005).** Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment*. Vol. 28, 1056-1071.
- FRIEDMAN M. (1997).** Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 45, 1523-1540.
- FU H., DOELLING J.H., ARENDT C.S., HOCHSTRASSER M., VIERSTRA R.D. (1998).** Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. Vol. 149, 677-692.
- FUKUCHI-MITZUTANI M., ISHIGURO K., NAKAYAMA T., UTSUNOMIYA Y., TANAKA Y., KUSUMI T., UEDA T. (2000).** Molecular and functional characterization of a rose lipoxygenase cDNA related to flower senescence. *Plant Science*. Vol. 160, 129-137.
- GADJEV I., VANDERAUWERA S., GECHEV T.S., LALOI C., MINKOV I.N., SHULAEV V., APEL K., INZE D., MITTLER R., VAN BREUSEGEM F. (2006).** Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signalling in Arabidopsis. *Plant Physiology*. Vol. 141, 436-445.
- GALLESCHI L., CAPOCCHI A., GHIRINGHELLI S., SAVIOZZI F., CALUCCI L., PINZINO C., ZANDOMENEGHI M. (2002).** Antioxidants, free radicals, storage proteins, and proteolytic activities in wheat (*Triticum durum*) seeds during accelerated aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 50, 5450-5457.
- GAN S., AMASINO R.M. (1997).** Making sense of senescence. *Plant Physiology*. Vol. 113, 313-319.
- GANTET P., MASSON F., DOMERGUE O., MARQUIS MENTION M., BAUW G., INZE D., ROSSIGNOL M. DE LA SERVE B.T. (1996).** Cloning of a cDNA encoding a developmentally regulated 22 kDa polypeptide from tobacco leaf plasma membrane. *Biochemistry and Molecular Biology International*. Vol. 40, 469-477.
- GAPPER C., DOLAN L. (2006).** Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiology*. Vol. 141, 341-345.
- GECEV T., GADJEV I., VAN BREUSEGEM F., INZE D., DUKIANDJIEV S., TONEVA V., MINKOV I. (2002).** Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 59, 708-714.
- GERSHON H., GERSHON D. (2000).** Paradigms in aging research : a critical review and assessment. *Mechanisms of Ageing and Development*. Vol. 117, 21-28.
- GHISELLI A., SERAFINI A., NATELLA F., SCACCINI C. (2000).** Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology Medicine*. Vol. 29, 1106-1114.

- GIL M.I., TOMAS-BARBERAN A., HESS-PIERCE B., HOLCROFT D., KADER A.A. (2000).** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 48, 4581-4589.
- GIVAN C.V. (1999).** Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biological Reviews*. Vol. 74, 277-309.
- GÖBEL C., FEUSSNER I., HAMBERG M., ROSAHL S. (2002).** Oxylin profiling in pathogen infected potato leaves. *Biochimica Biophysica Acta*. Vol. 1584, 55-64.
- GÖBEL C., FEUSSNER I., ROSAHL S. (2003).** Lipid peroxydation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 278, 52834-52940.
- GOEL A., GOEL A.K., SHEORAN I.S. (2003).** Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 160, 1093-1100.
- GÖRG A., WEISS W., DUNN M.J. (2004).** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. Vol. 4, 3665-3685.
- GRACE S.C. (2005).** Phenolics as antioxidants. In Smirnoff N., ed. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, p. 141-168.
- GROSSMAN S., LESHEM Y.Y. (1978).** Lowering of endogenous lipoxygenase activity in *Pisum sativum* foliage by cytokinin as related to senescence. *Plant Physiology*. Vol. 43, 359-362.
- GRUBER C.W., CEMAZAR M., HERAS B., MARTIN J.L., CRAIK D.J. (2006).** Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *TRENDS in biochemical Sciences*. Vol. 31, 455-464.
- GRUNE T., MERKER K., SANDIG G., DAVIES K.J.A. (2003).** Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 305, 709-718.
- HADFIELD K.A., BENNETT A.B. (1997).** Programmed senescence of plant organs. *Cell death and differentiation*. Vol. 4, 662-670.
- HALLIWELL B. (2006).** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. Vol. 141, 312-322.
- HARMAN D. (1956).** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*. Vol. 11, 298-300.
- HARRISON P.A., BLACK C.C. (1982).** Two-dimensional electrophoretic mapping of proteins of bundle sheath and mesophyll cells of the C₄ grass *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. (Crabgrass). *Plant Physiology*. Vol. 70, 1359-1366.
- HARTMANN C. (1992).** *La sénescence des végétaux*. 1 éd. Paris : Hermann, éditeurs des sciences et des arts.
- HARTMANS K.J., VAN ES A. (1984).** Changes in dry matter and carbohydrate content of potato sprouts during physiological ageing. *Potato Research*. Vol. 27, 311.
- HARTMANS K.J., VAN LOON C.D. (1987).** Effect of physiological age on growth vigour of seed potatoes of two cultivars. I. Influence of storage period and temperature on sprouting characteristics. *Potato Research*. Vol. 30, 397-409.
- HASHIMOTO M., KOMATSU S. (2007).** Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics*. Vol. 7, 1293-1302.
- HAWKES J.G. (1990).** *The potato. Evolution, biodiversity and genetic resources*. Londres : Belhaven Press.

- HEATH M. (1998).** Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 104, 117-124.
- HERTOG M.L.A.T.M., TIJSKENS L.M.M., HAK P.S. (1997).** The effects of temperature and senescence on the accumulation of reducing sugars during storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers: A mathematical model. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 10, 67-79.
- HILL L.M., REIMHOLZ R., SCHRÖDER R., NIELSEN T.H., STITT M. (1996).** The onset of sucrose accumulation in cold-stored potato tubers is caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose-phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase. *Plant Cell & Environment*. Vol. 19, 1223-1237.
- HOPKINS M., McNAMARA L., TAYLOR C., WANG T.-W., THOMPSON J. (2007).** Membrane dynamics and regulation of subcellular changes during senescence. In Gan S., ed. *Senescence Processes in Plants*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, p. 39-62.
- HOPKINS W.G. (2003).** *Physiologie végétale*. 2ème éd. traduite par Serge Rambour. Bruxelles : 2ditions De Boeck Université.
- HOWITT C.A., POGSON B. (2006).** Carotenoid accumulation and function in seeds and non green tissues. *Plant Cell Environment*. Vol. 29, 435-445.
- HSU J.L., SUNG J.M. (1997).** Antioxidant role of glutathione associated with accelerated aging and hydration of triploid watermelon seeds. *Physiologia Plantarum*. Vol. 100, 967-974.
- HUANG D., OU B., PRIOR R.L. (2005).** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. Vol. 53, 1841-1856.
- HURKMAN W.J., TANAKA C.K. (1986).** Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*. Vol. 81, 802-806.
- INZE D., VAN MONTAGU M. (1995).** Oxidative stress in plants. *Current Biology* Vol. 6, 153-158.
- JEFFERIES R.A., LAWSON H.M. (1991).** A key for the stages of development of potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology*. Vol. 119, 387-399.
- JOHNSON S.B. (1997).** *Selecting, Cutting and Handling Potato Seed – University of Maine* [en ligne]. Disponible sur : < <http://www.umext.maine.edu/onlinepubs/htmpubs/2412.htm> > (Consulté le 04/07/2007).
- JONES M.A., SMIRNOFF N. (2005).** Reactive oxygen species in plant development and pathogen defence. In Smirnoff N., ed. *Antioxidants and reactive oxygene species in plants*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, p. 197-214.
- KALIA S., PAL S., GUHA-MUKHERJEE S. (1998).** Activation of glyoxalase I during the cell division cycle and its homology with auxin regulated genes. *Plant Science*. Vol. 132, 55-62.
- KAMPFENKEL K., VAN MONTAGU M., INZE D. (1994).** Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry*. Vol. 225, 165-167.
- KAR M., FEIERABEND J. (1984).** Metabolism of activated oxygen in detached wheat and rye leaves and its relevance to the initiation of senescence. *Planta*. Vol. 160, 385-391.
- KAUR-SAWHNEY R., TIBURCIO A.F., ALTABELLA T., GALSTON A.W. (2003).** Polyamines in plants: an overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*. Vol. 2, 1-12.
- KAWAKAMI S., MIZUNO M., TSUCHIDA H. (2000).** The defense mechanism against oxidative stress generated in potato tubers during low-temperature storage. *Plant Peroxidase Newsletter*. Vol. 14, 125-132.
- KELLER J.N., HANNI K.B., MARKESBERY W.R. (2000).** Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development*. Vol. 113, 61-70.

- KIM J.K., BAMBA T., HARADA K., FUKUSAKI E., KOBAYASHI A. (2007).** Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 58, 415-424.
- KLOOSTERMAN B., VORST O., HALL R.D., VISSER R.G.F., BACHEM C.W. (2005).** Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development. *Plant Biotechnology Journal*. Vol. 3, 505-519.
- KNOWLES N.R., KNOWLES L.O. (1989).** Correlations between electrolyte leakage and degree of saturation of polar lipids from aged potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber tissue. *Annals of Botany*. Vol. 63, 331-338.
- KOHEN R., BERRY E. (1997).** What does the total antioxidant status of plasma reflect? *Redox Report*. Vol. 3, 253-254.
- KOISTINEN K.M., HASSINEN V.H., GYNTHYER P.A.M., LEHESRANTA S.J., KEINÄNEN S.I., KOKKO H.I., OKSANEN E.J., TERVAHAUTA A.I., AURIOLA S., KÄRENLAMPI S.O. (2002).** Birch PR-10c is induced by factors causing oxidative stress but appears not to confer tolerance to these agents. *New Phytologist*. Vol. 155, 381-391.
- KONDOH H., LLEONART M.E., BERNARD D., GIL J. (2007a).** Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization. *Histology and Histopathology*. Vol. 22, 85-90.
- KONDOH H., LLEONART M.E., NAKASHIMA Y., YOKODE M., TANAKA M., BERNARD D., GIL J., BEACH D. (2007b).** A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 9, 1-6.
- KOVTUN Y., CHIU W.L., TENA G., SHEEN J. (2000).** Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 97, 2940-2945.
- KRAUSE K.-P., HILL L., REIMHOLZ R., HAMBORG NIELSEN T., SONNEWALD U., STITT M. (1998).** Sucrose metabolism in cold-stored potato tubers with decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant, Cell and Environment*. Vol. 21, 285-299.
- KRIJTHE N.K. (1958).** Changes in the germinating power of seed potatoes. *European Potato Journal*. Vol. 1, 69-72.
- KRIJTHE N.K. (1962).** Observations on the sprouting of seed potatoes. *European Potato Journal*. Vol. 5, 316-333.
- KUHLA B., BOECK K., LÜTH H.J., SCHMIDT A., WEIGLE B., SCHMITZ M., OGUNLADE V., MÜNCH G., ARENDT T. (2006).** Age-dependent changes of glyoxalase I expression in human brain. *Neurobiology of Aging*. Vol. 27, 815-822.
- KUHLA B., BOECK K., SCHMIDT A., OGUNLADE V., ARENDT T., MÜNCH G., LÜTH H.J. (2007).** Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of Aging*. Vol. 28, 29-41.
- KUMAR G.N.M., HOUTZ R.L., KNOWLES N.R. (1999).** Age-induced protein modifications and increased proteolysis in potato seed-tubers. *Plant Physiology*. Vol. 119, 89-100.
- KUMAR G.N.M., KNOWLES N.R. (1993a).** Age of potato seed-tubers influences protein synthesis during sprouting. *Physiologia Plantarum*. Vol. 89, 262-270.
- KUMAR G.N.M., KNOWLES N.R. (1993b).** Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiology*. Vol. 102, 115-124.
- KUMAR G.N.M., KNOWLES N.R. (1996a).** Nature of enhanced respiration during sprouting of aged potato seed tubers. *Physiologia Plantarum*. Vol. 97, 228-236.

- KUMAR G.N.M., KNOWLES N.R. (1996b).** Oxidative stress results in increased sinks for metabolic energy during aging and sprouting of potato seed-tubers. *Plant Physiology*. Vol. 112, 1301-1313.
- LAEMMLI E.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Vol. 227, 680-685.
- LALOI C., APEL K., DANON A. (2004).** Reactive oxygen signalling : the latest news. *Current Opinion in Plant biology*. Vol. 7, 323-328.
- LANE N. (2002).** *Oxygen: the molecule that made the world*. Oxford: Oxford University Press, pp. 140-186.
- LANG G.A., EARLY J.D., MARTIN G.C., DARNELL R.L. (1987).** Endo-, para-, and ecodormancy : physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience*. Vol. 22, 371-377.
- LAW R.D., SUTTLE J.C. (2002).** Transient decreases in methylation at 5'-CCGG-3' sequences in potato (*Solanum tuberosum* L.) meristem DNA during progression of tubers through dormancy precede the resumption of sprout growth. *Plant Molecular Biology*. Vol. 51, 437-447.
- LEHESRANTA S.J., DAVIES H.V., SHEPHERD L.V.T., KOISTINEN K.M., MASSAT N., NUNAN N., MCNICOL J.W., KÄRENLAMPI S.O. (2006).** Proteomic analysis of the potato tuber life cycle. *Proteomics*. Vol. 6, 6042-6052.
- LEHESRANTA S.J., DAVIES H.V., SHEPHERD L.V.T., NUNAN N., MCNICOL J.W., AURIOLA S., KOISTINEN K.M., SUOMALAINEN S., KOKKO H.I., KÄRENLAMPI S.O. (2005).** Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. *Plant Physiology*. Vol. 138, 1690-1699.
- LEPOIVRE P. (2003).** *Phytopathologie*. 1 éd. Bruxelles : Editions De Boeck Université.
- LESHEM Y.Y. (1987).** Membrane phospholipid catabolism and Ca²⁺ activity in control of senescence. *Physiologia Plantarum*. Vol. 69, 551-559.
- LESHEM Y.Y., WURZBURGER J., GROSSMAN S., FRIMER A.A. (1981).** Cytokinin interaction with free radical metabolism and senescence : effects on endogenous lipoxygenase and purine oxidation. *Physiologia Plantarum*. Vol. 53, 9-12.
- LEVITT J. (1980).** Responses of plants to environmental stresses: chilling, freezing and high temperature stresses. In: Kozlowski T.T. (ed). *Physiological ecology: A series of monographs, texts and treatises*, 2ème éd. New-York, USA : Academic Press, pp. 23-64.
- LEWIS C.E., WALKER J.R.L., LANCASTER J.E., SUTTON K.H. (1998).** Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 77, 45-57.
- LIAVONCHANKA A., FEUSSNER I. (2006).** Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 163, 348-357.
- LINDBLOM H. (1966).** Apical dominance in relation to indole-3-acetic acid and gibberellic acid. *Proceedings 3rd Triennial Conference EAPR (Zürich)*, 184-185.
- LIU Y.-W., HAN C.-H., LEE M.-H., HSU F.-L., HOU W.-C. (2003).** Patatin, the tuber storage protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) exhibits antioxidant activity in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 51, 4389-4393.
- LLESUY S., EVELSON P., CAMPOS A.M., LISSI E. (2001).** Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. *Biological Research*. Vol. 34, 51-73.
- LOGAN D.C., DOMERGUE O., DE LA SERVE B.T., ROSSIGNOL M. (1997).** A new family of plasma membrane polypeptides differentially regulated during plant development. *Biochemistry and Molecular Biology International*. Vol. 43, 1051-1062.

- LOJKOWSKA E., HOLUBOWSKA M. (1989).** Changes of the lipid catabolism in potato tubers from cultivars differing in susceptibility to autolysis during storage. *Potato Research*. Vol. 32, 463-470.
- LUBARETZ O., ZUR NIEDEN U. (2002).** Accumulation of plant small heat-stress proteins in storage organs. *Planta*. Vol. 215, 220-228.
- LULAI E.C., ORR P.H. (1994).** Techniques for detecting and measuring developmental and maturational changes in tuber native periderm. *American Potato Journal*. Vol. 71, pp. 491-505.
- LYNCH D.V., THOMPSON J.E. (1984).** Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion in senescing plant tissue. *FEBS Letters*. Vol. 173, 251-254.
- MACDONALD M.M., OSBORNE D.J. (1988).** Synthesis of nucleic acids and protein in tuber buds of *Solanum tuberosum* during dormancy and early sprouting. *Physiologia Plantarum*. Vol. 73, 392-400.
- MACHEIX J.-J., FLEURIET A., JAY-ALLEMAND C. (2005).** *Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes.
- MADEC P. (1958).** Le rôle du tubercule-mère dans l'évolution des germes de pomme de terre. *Ann. Amél. Des Plantes*. Vol. 8, 15-26.
- MALONE J.G., MITTOVA V., RATCLIFFE R.G., KRUGER N.J. (2006).** The response of carbohydrate metabolism in potato tubers to low temperature. *Plant Cell Physiology*. Vol. 47, 1309-1322.
- MARANGONI A.G., DUPLESSIS P.M., YADA R.Y. (1997).** Kinetic model for carbon partitioning in *Solanum tuberosum* tubers stored at 2°C and mechanism for low temperature stress-induced accumulation of reducing sugars. *Biophysical Chemistry*. Vol. 65, 211-220.
- MARTIN M., GRAVOUEILLE J.-M. (2001).** Stockage et conservation de la pomme de terre – Collection ITCF-ITPT Pomme de terre. 1 éd. Paris : ITCF.
- MARTINS A.M., MENDES P., CORDEIRO C., PONCES FREIRE A. (2001).** *In situ* kinetic analysis of glyoxalase I and glyoxalase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 268, 3930-3936.
- MATSUURA-ENDO C., OHARA-TAKADA A., CHUDA Y., ONO H., YADA H., YOSHIDA M., KOBAYASHI A., TSUDA S., TAKIGAWA S., NODA T., YAMAUCHI H., MORI M. (2006).** Effects of storage temperature on the contents of sugars and free amino acids in tubers from different potato cultivars and acrylamide in chips. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. Vol. 70, 1173-1180.
- MATTILA P., HELLSTRÖM J. (2007).** Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 20, 152-160.
- MAYAK S., LEGGE R.L., THOMPSON J.E. (1983).** Superoxide radical production by microsomal membranes from senescing carnation flowers : an effect on membrane fluidity. *Phytochemistry*. Vol. 22, 1375-1830.
- MCCURDY D.W., KOVAR D.R., STAIGER C.J. (2001).** Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma*. Vol. 215, 89-104.
- McKERSIE B.D. (1996).** *Oxidative stress* [en ligne]. Disponible sur : < <http://www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm> > (Consulté le 13/07/2007).
- MECHIN V., CONSOLI L., LE GUILLOUX M., DAMERVAL C. (2003).** An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics*. Vol. 3, 1299-1302.
- MENEGUZZO S., SGHERRI C.L.M., NAVARI-IZZO F., IZZO R. (1998).** Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in NaCl-treated wheat. *Physiologia Plantarum*. Vol. 104, 735-740.

- MILLER H.E., RIGELHOF F., MARQUART L., PRAKASH A., KANTER M. (2000).** Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits and Vegetables. *Journal of the American College of Nutrition*. Vol. 19, 312S-319S.
- MINHAS D., GROVER A. (1999).** Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. *Plant Science*. Vol. 146, 41-51.
- MITROVIĆ A., DUČIĆ T., LIRIĆ -RAJLIĆ I., RADOTIĆ K., ŽIVANOVIĆ B. (2005).** Changes in *Chenopodium rubrum* seeds with aging. *Annals of New York Academy of Sciences*. Vol. 1048, 505-508.
- MITTLER R. (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science*. Vol. 7, 405-410.
- MITTLER R., POULOS T.L. (2005).** Ascorbate peroxidase. In Smirnoff N., ed. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, p. 87-100.
- MITTLER R., VANDERAUWERA S., GOLLERY M., VAN BREUSEGEM F. (2004).** Reactive oxygen gene network of plants. *TRENDS in Plant Science*. Vol. 9, 490-498.
- MIZUNO M., KAMEI M., TSUCHIDA H. (1998).** Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. *Biochemistry and Molecular Biology International*. Vol. 44, 717-726.
- MONDAL K., SHARMA N.S., MALHOTRA S.P., DHAWAN K., SINGH R. (2003).** Oxidative stress and antioxidant systems in tomato fruits during storage. *Journal of Food Biochemistry*. Vol. 27, 515-527.
- MONTILLET J.L., CHAMNONGPOL S., RUSTERUCCI C., DAT J., VAN DE COTTE B., AGNEL J.P., BATESTI C., INZE D., VAN BREUSEGEM F., TRIANTAPHULIDÈS C. (2005).** Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology*. Vol. 138, 1516-1526.
- MORRIS W.L., DUCREUX L., GRIFFITHS D.W., STEWART D., DAVIES H.V., TAYLOR M.A. (2004).** Carotenogenesis during tuber development and storage in potato. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 55, 975-982.
- MÜNCH G., KUHLA B., LÜTH H.J., ARENDT T., ROBINSON S.R. (2003).** Anti-AGEing defences against Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions*. Vol. 31, 1397-1399.
- NAKANO Y., ASADA K. (1981).** Hydrogen peroxyde is scavenged by ascorbate specific peroxydase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*. Vol. 22, 867-880.
- NARA K., MIYOSHI T., HONMA T., KOGA H. (2006).** Antioxidative activity of boud-form phenolics in potato peel. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. Vol. 70, 1489-1491.
- NIEHAUS W.G. JR. (1978).** A proposed role of superoxide anion as a biological nucleophile in the deesterification of phospholipids. *Bioorganic Chemistry*. Vol. 7, 7-84.
- NOCTOR G., ARISI A.-C.M., JOUANIN L., KUNERT K.J., RENNENBERG H., FOYER C.H. (1998).** Glutathione : biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 49, 623-647.
- NOCTOR G., FOYER C.H. (1998).** Ascorbate and glutathione : keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology and Plant Molecular biology*. Vol. 49, 249-279.
- NOURIAN F., RAMASWAMY H.S., KUSHALAPPA A.C. (2003).** Kinetics of quality change associated with potatoes stored at different temperatures. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. Vol. 36, 49-65.
- O'BRIEN P.J., ALLEN E.J. (1978).** The relationships between storage temperature of seed tubers and tuber yields. Abstracts of Conference Papers 7th Triennial Conference EAPR (Warsaw). p. 18-19.

- O'BRIEN P.J., ALLEN E.J. (1981).** The concept and measurement of physiological age. Abstracts of conference papers. In : Proceedings of the Eighth Triennial Conference on EAPR, München, Germany, pp. 64-66.
- O'BRIEN P.J., ALLEN E.J., BEAN J.N., GRIFFITH R.J., JONES S.A., JONES J.L. (1983).** Accumulated day-degrees as a measure of physiological age and the relationships with growth and yield in early potato varieties. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. Vol. 101, 613-631.
- PANAVAS T., RUBINSTEIN B. (1998).** Oxidative events during programmed cell death in daylily (*Heimerocallis* hybrid) petals. *Plant Science*. Vol. 133, 125-138.
- PARK S.M., HONG C.B. (2002).** Class I heat-shock protein gives thermotolerance in tobacco. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 159, 25-30.
- PERENNEC P., MADEC P. (1960).** Influence du tubercule-mère sur la croissance et le développement du germe de pomme de terre. *Ann. Physiol. Vég.* Vol. 2, 29-67.
- PETERMAN T.K., SIEDOW J.N. (1985).** Behavior of lipoxygenase during establishment, senescence, rejuvenation of soybean cotyledons. *Plant Physiology*. Vol. 78, 690-695.
- PINZINO C., CAPOCCHI A., GALLESCHI L., SAVIOZZI F., NANNI B., ZANDOMENEGHI M. (1999).** Aging, free radicals, and antioxidants in wheat seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 47, 1333-1339.
- POTS A.M., GRUPPEN H., HESSING M., VAN BOEKEL M.A.J.S., VORAGEN A.G.J. (1999).** Isolation and characterization of patatin isoforms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 47, 4587-4592.
- POTTERS G., DE GARA L., ASARD H., HOREMANS N. (2002).** Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 40, 537-548.
- POTTERS G., HOREMANS N., BELLONE S., CAUBERGS R.J., TROST P., GUISEZ Y., ASARD H. (2004).** Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione-independent reduction mechanism. *Plant Physiology*. Vol. 134, 1479-1487.
- POTTERS G., HOREMANS N., CAUBERGS R.J., ASARD H. (2000).** Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. *Plant Physiology*. Vol. 124, 17-20.
- PROCHAZKOVA D., SAIRAM R.K., SRIVASTAVA G.C., SINGH D.V. (2001).** Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*. Vol. 161, 765-771.
- PUNCHARD N. A. (1996).** Free radicals : A practical approach. 1 éd. Oxford : IRL Press.
- RABILLOUD T., BLISNICK T., HELLER M., LUCHE S., AEBERSOLD R., LUNARDI J., BRAUN-BRETON C. (1999).** Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: Comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium falciparum* - infected erythrocyte ghosts. *Electrophoresis*. Vol. 20, 3603-3610.
- RADTKE W., RIECKMANN W. (1991).** *Maladies et ravageurs de la pomme de terre*. Gelsenkirchen-Buer : Th. Mann, 168 pp.
- REINHECKEL T., SITTE N., ULLRICH O., KUCKELKORN U., DAVIES K.J.A., GRUNE T. (1998).** Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochemical Journal*. Vol. 335, 637-642.
- REUST (1982).** Contribution à l'appréciation de l'âge physiologique des tubercules de pommes de terre (*Solanum tuberosum* L.) et étude de son importance sur le rendement (thèse de doctorat). Zurich : Ecole Polytechnique Fédérale, 113 pp.
- REUST W. (1986).** EAPR working group physiological age of the potato. *Potato Research*. Vol. 29, 268-271.

- REUST W., AERNY J. (1985).** Determination of physiological age of potato tubers using sucrose, citric and malic acid as indicators. *Potato Research*. Vol. 28, 251-261.
- REUST W., MUNSTER W. (1975).** La période d'incubation des variétés de pomme de terre de l'assortiment suisse et son importance. *Rev. Suisse Agric.* Vol. 7, 185-187.
- REUZEAU C., CAVALIE G. (1995).** Activities of free radical processing enzymes in dry sunflower seeds. *New Phytologist*. Vol. 130, 59-66.
- REVERBERI M., PICARDO M., RICELLI A., CAMERA E., FANELLI C., FABBRI A.A. (2001).** Oxidative stress, growth factor production and budding in potato tuber during cold storage. *Free Radical Research*. Vol. 35, 833-841.
- REZNICK A.Z., PACKER L.** Oxidative Damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*. Vol. 233, 357-363.
- RHOADS D.M., UMBACH A.L., SUBBAIAH C., SIEDOW J.N. (2006).** Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signalling. *Plant Physiology*. Vol. 141, 357-366.
- ROBERTS I., FERNÁNDEZ MURRAY P., PASSERON S., BARNEIX A.J. (2002).** The activity of the 20S proteasome is maintained in detached wheat leaves during senescence in darkness. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 40, 161-166.
- ROJAS-BELTRAN J.A., DEJAEGHERE F., KOTB M.A., DU JARDIN P. (2000).** Expression and activity of antioxidant enzymes during potato tuber dormancy. *Potato Research*. Vol. 43, 383-393.
- RONNING C.M., STELGAKINA S.S., ASCENZI R., BOUGRI O., HART A.L., UTTERBACH T.R., VANAKEN S.E., RIEDMULLER S.B., WHITE J.A., CHO J., PERTEA G.M., LEE Y., KARAMYCHEVA S., SULTANA R., TSAI J., QUACKENBUSH J., GRIFFITHS H.M., RESTREPO S., SMART C.D., FRY W.E., VAN DER HOEVEN R., TANKSLEY S., ZHANG P., JIN H., YAMAMOTO M.L., BAKER B.J., BUELL R. (2003).** Comparative analyses of potato Expressed Sequence Tag libraries. *Plant Physiology*. Vol. 131, 419-429.
- ROUET-MAYER M.A., BUREAU J.M., LAURIERE C. (1992).** Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. *Plant Physiology*. Vol. 98, 971-978.
- ROUSSELLE P., ROBERT Y., CROSNIER J.-C. (1996).** La pomme de terre – Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. 1 éd. Paris : INRA Editions.
- ROYO J., VANCANNEYT G., PEREZ A.G., SANZ C., STORMANN K., ROSAHL S., SANCHEZ-SERRANO J.J. (1996).** Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271, 21012-21019.
- SAIRAM A.A., SRIVASTAVA G.C. (2002).** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. Vol. 82, 1227-1238
- SAKIHAMA Y., COHEN M.F., GRACE S.C., YAMASAKI H. (2002).** Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plant. *Toxicology*. Vol. 177, 67-80.
- SARAVANAN R.S., ROSE J.K.C. (2004).** A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*. Vol. 4, 2522-2532.
- SCANDALIOS J.G. (1993).** Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*. Vol. 101, 7-12.
- SCHOLTE K. (1987).** Relation between storage T sum and vigour of seed potatoes. *Abstracts of Conference papers 10th Triennial Conference EAPR (Wageningen)*. Pp. 28-29.
- SCHULZE E.-D., BECK E., MÜLLER-HOHENSTEIN K. (2005).** *Plant ecology*. 1 éd. Berlin – Heidelberg, Allemagne : Springer.

SCHWARZEROVÁ K., PETRÁŠEK J., PANIGRAHI K.C.S., ZELENKOVÁ S., OPATRŇY Z., NICK P. (2006). Intranuclear accumulation of plant tubulin in response to low temperature. *Protoplasma*. Vol. 227, 185-196.

SEMSEI I. (2000). On the nature of aging. *Mechanisms of ageing and development*. Vol. 117, 93-108.

SHACTER E., WILLIAMS J.A., STADTMAN E.R., LEVINE R.L. (1996). Determination of carbonyl groups on oxidized proteins. In *Free Radicals: a practical approach* (N.A. PUNCHARD & F.J. KELLY Eds). Oxford : University Press.

SHAKYA R., NAVARRE D.A. (2006). Rapid screening of ascorbic acid, glycoalkaloids, and phenolics in potato using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 54, 5253-5260.

SHEWRY P.R. (2003). Tuber storage proteins. *Annals of Botany*. Vol. 91, 755-769.

SHULAEV V., OLIVER D.J. (2006). Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiology*. Vol. 141, 367-372.

SIMPSON R.J. (2003). *Proteins and Proteomics A Laboratory Manual*. 1 éd. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SLATER J.W. (1968). The effect of night temperature on tuber initiation of the potato. *European Potato Journal*. Vol. 11, 14-22.

SMALLE J., VIERSTRA R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Reviews of Plant Biology*. Vol. 55, 555-590.

SMIRNOFF N. (1995). *Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation*. 1 éd. Oxford : BIOS Scientific Publishers.

SMIRNOFF N. (2000). Ascorbic acid : metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion Plant Biology*. Vol. 3, 229-235.

SMIRNOFF N. (2005). Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In Smirnoff N., ed. *Antioxidants and reactive oxygene species in plants*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, p. 53-86.

SOHAL R.S. (2002a). Oxidative stress hypothesis of aging. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 33, 573-574.

SOHAL R.S. (2002b). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 33, 37-44.

SOHAL R.S., MOCKETT R.J., ORR W.C. (2002). Mechanisms of aging : An appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 33, 575-586.

SONG J., BRAUN G., BEVIS E., DONCASTER K. (2006). A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. *Electrophoresis*. Vol. 27, 3144-3151.

SOPORY S., SINGLA-PAREEK S., YADAV S., MUSTAFIZ A. (2007). Genetic manipulation of glyoxalase pathway delays plant senescence under stress conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 146, S58.

SØRENSEN J.G., KRISTENSEN T.N., LOESCHCKE V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*. Vol. 6, 1025-1037.

SOWOKINOS J. (1990). Stress-induced alterations in carbohydrate metabolism. In Vayda M.E., Park W.D., eds. *The molecular and cellular biology of the potato*. Oxon, UK : C.A.B. International, p. 137-158.

- SPITELLER G. (2001).** Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Experimental Gerontology*. Vol. 36, 1425-1457.
- SPITELLER G. (2003).** The relationship between changes in the cell wall, lipid peroxidation, proliferation, senescence and cell death. *Physiologia Plantarum*. Vol. 119, 5-18.
- SPYCHALLA J.P., DESBOROUGH S.L. (1990a).** Superoxide dismutase, catalase, and a-tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiology*. Vol. 94, 1214-1218.
- SPYCHALLA J.P., DESBOROUGH S.L. (1990b).** Fatty acids, membrane permeability, and sugars of stored potato tubers. *Plant Physiology*. Vol. 94, 1207-1213.
- STADTMAN E.R. (1986).** Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems : implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends in Biochemical Sciences*. Vol. 11, 11-12.
- STAIGER C.J., BLANCHOIN L. (2006).** Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 9, 554-562.
- STRUİK P.C., BOON E.J., VREUGDENHIL D. (1987).** Effects of extracellular extracts from leaves on the tuberization of cuttings of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiology*. Vol. 84, 214-217.
- STRUİK P.C., VAN DER PUTTEN P.E.L., CALDIZ D.O., SCHOLTE K. (2006).** Response of stored potato seed tubers from contrasting cultivars to accumulated day-degrees. *Crop Science*. Vol. 46, 1156-1168.
- STRUİK P.C., WIERSEMA S.G. (1999).** *Seed potato technology*. 1 éd. Wageningen : Wageningen Press.
- SUN W., VAN MONTAGU M., VERBRUGGEN N. (2002).** Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1577, 1-9.
- SUNG J.M., CHIU C.C. (1995).** Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Science*. Vol. 110, 45-52.
- SUNG J.M., JENG T.L. (1994).** Lipid-peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiologia Plantarum*. Vol. 91, 51-55.
- SURREY K. (1964).** Spectrophometric method for determination of lipoxydase activity. *Plant Physiology*. Vol. 39, 65-70.
- SWINDELL W.R., HUEBNER M., WEBER A.P. (2007).** Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*. Vol. 8, 1-15.
- SYLVESTRE I., DROILLARD M.J., BUREAU J.M., PAULIN A. (1989).** Effects of the ethylene rise on the peroxidation of membrane lipids during the senescence of cut carnations. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 27, 407-413.
- TAIZ L., ZEIGER E. (1991).** *Plant Physiology*. 1 éd. Redwood City, Californie : The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- TAKAHAMA U., ONIKI T. (1997).** A peroxidase/phenolics/acorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum*. Vol. 101, 845-852.
- TANAKA K., CHIBA T. (1998).** The proteasome: a protein-destroying machine. *Genes to Cells*. Vol. 3, 499-510.
- TAUSZ M., SIRCELJ H., GRILL D. (2004).** The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany*. Vol. 55, 1955-1962.

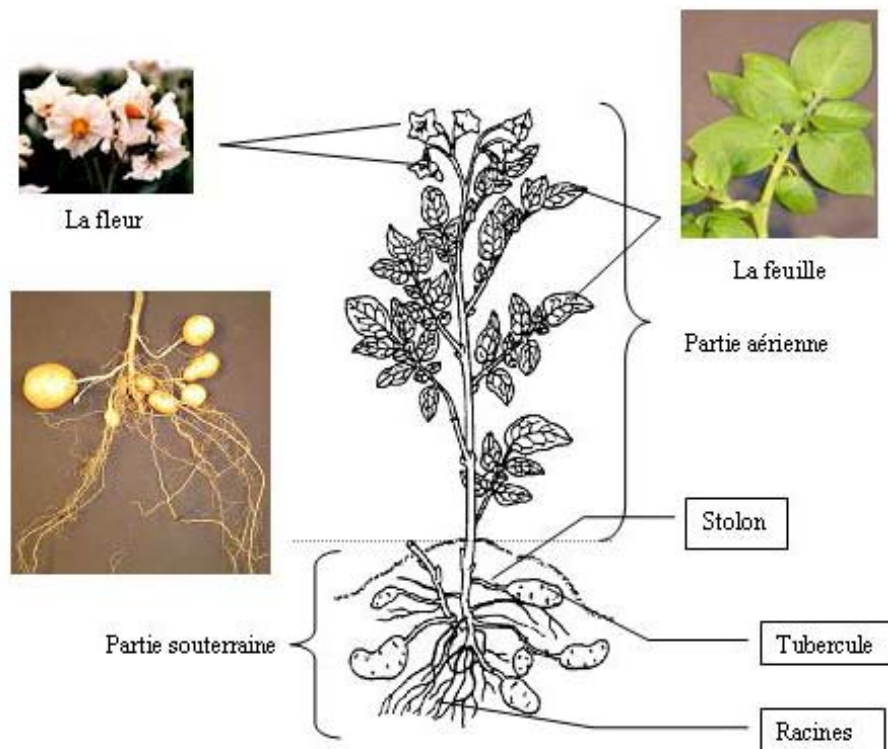
- TAYLOR M.A., DAVIES H.V., SCOBIE L.A. (1991).** Molecular changes associated with tuberization in *Solanum tuberosum* - differential expression of alpha-tubulin isotypes. *Physiologia Plantarum*. Vol. 81, 244-250.
- TAYLOR M.A., WRIGHT F., DAVIES H.V. (1994).** Characterization of the cDNA clones of 2 beta-tubulin genes and their expression in the potato plant (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Molecular Biology*. Vol. 26, 1013-1018.
- THIELLEMENT H., ZIVY M., DAMERVAL C., MECHIN V. (2007).** Plant Proteomics Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 355, 399 pp.
- THOMAS H. (2002).** Ageing in plants. *Mechanisms of Ageing and Development*. Vol. 123, 747-753.
- THOMAS H., OUGHAM H.J., WAGSTAFF C., STEAD A.D. (2003).** Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 54, 1127-1132.
- TRINDADE L.M., HORVATH B.M., VAN BERLOO R., VISSER R.G.F. (2004).** Analysis of genes differentially expressed during potato tuber life cycle and isolation of their promoter regions. *Plant Science*. Vol. 166, 423-433.
- TURNBULL N.D., COBB A.H. (1992).** A study of tuber cell integrity and ultrastructure during prolonged potato storage. *Aspects of Applied Biology*. Vol. 33, 113-118.
- VAN BREUSEGEM F., DAT J.F. (2006).** Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*. Vol. 141, 384-390.
- VAN BREUSEGEM F., VRANOVA E., DAT J.F., INZE D. (2001).** The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. Vol. 161, 405-414.
- VAN DER STRAETEN D., RODRIGUES-POUSADA R.A., GOODMAN H.M., VAN MONTAGU M. (1991).** Plant enolase: gene structure, expression, and evolution. *The Plant Cell*. Vol. 3, 719-735.
- VAN DER ZAAG D.E., VAN LOON C.D. (1987).** Effect of physiological age on growth vigour of seed potatoes of two cultivars. 5. Review of literature and integration of some experimental results. *Potato Research*. Vol. 30, 451-472.
- VAN DOORN W.G., WOLTERING, E.J. (2004).** Senescence and programmed cell death: substance or semantics. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 55, 2147-2153.
- VAN ES A., HARTMANS K.J. (1984).** Some aspects of changes in chemical composition of tubers and sprouts during physiological aging. Abstracts of conference papers. In : Proceedings of the Ninth Triennial Conference on EAPR, Interlaken, Switzerland, pp. 231-232.
- VAN ES A., HARTMANS K.J. (1987).** Effect of physiological age on growth vigour of seed potatoes of two cultivars. 2. Influence of storage and storage temperature on dry matter content and peroxidase activity of sprouts. *Potato Research*. Vol. 30, 411-421.
- VAN ITTERSUM M.K. (1992).** *Dormancy and growth vigour of seed potatoes* (thèse de doctorat). Wageningen : Wageningen Agricultural University.
- VAN ITTERSUM M.K., SCHOLTE K., KUPERS L.J.P. (1990).** A method to assess cultivar differences in rate of physiological ageing of seed tubers. *American Potato Journal*. Vol. 67, 603-613.
- VELJOVIC-JOVANOVIC S., NOCTOR G., FOYER C.H. (2002).** Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and Ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 40, 501-507.
- VENKATARAYAPPA T., FLETCHER R.A., THOMPSON J.E. (1984).** Retardation and reversal of senescence in bean leaves by benzyladenine and decapitation. *Plant & Cell Physiology*. Vol. 25, 407-418.

- VERHEES J. (2002).** *Cell cycle and storage related gene expression in potato tubers* (Thèse de doctorat). Wageningen : Wageningen Agricultural University, 133 p.
- VIERSTRA R.D. (2003).** The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science*. Vol.8, 135-142.
- VRANOVA E., INZE D., VAN BREUSEGEM F. (2002).** Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53, 1227-1236.
- VREUGDENHIL D., STRUIK P.C. (1989).** An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*. Vol. 75, 525-531.
- WADAHAMA H., KAMAUCHI S., ISHIMOTO M., KAWADA T., URADE R. (2007).** Protein disulfide isomerase family proteins involved in soybean protein biogenesis. *FEBS Journal*. Vol. 274, 687-703.
- WADDELL W.J. (1956).** A simple ultraviolet spectrophotometric method for determination of protein. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. Vol. 48, 311-314.
- WICKENS A.P. (2001).** Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*. Vol. 128, 379-391.
- WILLEKENS H., INZE D., VAN MONTAGU M., VAN CAMP W. (1995).** Catalases in plants. *Molecular Breeding*. Vol. 1, 207-228.
- WURR D.C.E. (1978).** The effects of the date of defoliation of the seed potato crop and the storage temperature of the seed on subsequent growth. 1. Sprout growth. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. Vol. 91, 737-745.
- WURR D.C.E. (1979).** The effect of variation in the storage temperature of seed potatoes on sprout growth and subsequent yield. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. Vol. 93, 619-622.
- YADAV S.K., SINGLA-PAREEK S.L., RAY M., REDDY M.K., SOPORY S.K. (2005).** Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 337, 61-67.
- YOSHIDA S. (2003).** Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 6, 79-84.
- ZABROUSKOV V., KUMAR G.N.M., SPYCHALLA J.P., KNOWLES N.R. (2002).** Oxidative metabolism and the physiological age of seed potatoes are affected by increased α -linolenate content. *Physiologia Plantarum*. Vol. 116, 172-185.
- ZACHEO G., CAPPELLO A.R., PERRONE L.M., GNONI G.V. (1998).** Analysis of factors influencing lipid oxidation of almond seeds during accelerated ageing. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. Vol. 31, 6-9.
- ZACHEO G., CAPPELLO M.S., GALLO A., SANTINO A., CAPPELLO A.R. (2000).** Changes associated with post-harvest ageing in almond seeds. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. Vol. 33, 415-423.
- ZENTGRAF U. (2007).** Oxidative stress and leaf senescence. In Gan S., ed. *Senescence Processes in Plants*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, p. 39-62.
- ZHANG F., KIRKHAM M.B. (1996).** Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*. Vol. 132, 361-373.

<h2>ANNEXES</h2>

- 1. Description et classification de la pomme de terre (Rousselle et al., 1996)**
- 2. Cycle de production de *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum***
- 3. Cartes peptidiques des produits de dégradation de la patatine**
- 4. Gels natifs présentant l'évolution des activités POX, CAT, SOD et APX au cours du vieillissement des cv. Bintje (gauche) et Désirée (droite) récoltés en 2004**
- 5. Méthodologie utilisée pour les identifications en MS/MS**
- 6. Technologie DIGE (fluorescence Difference Gel Electrophoresis)**

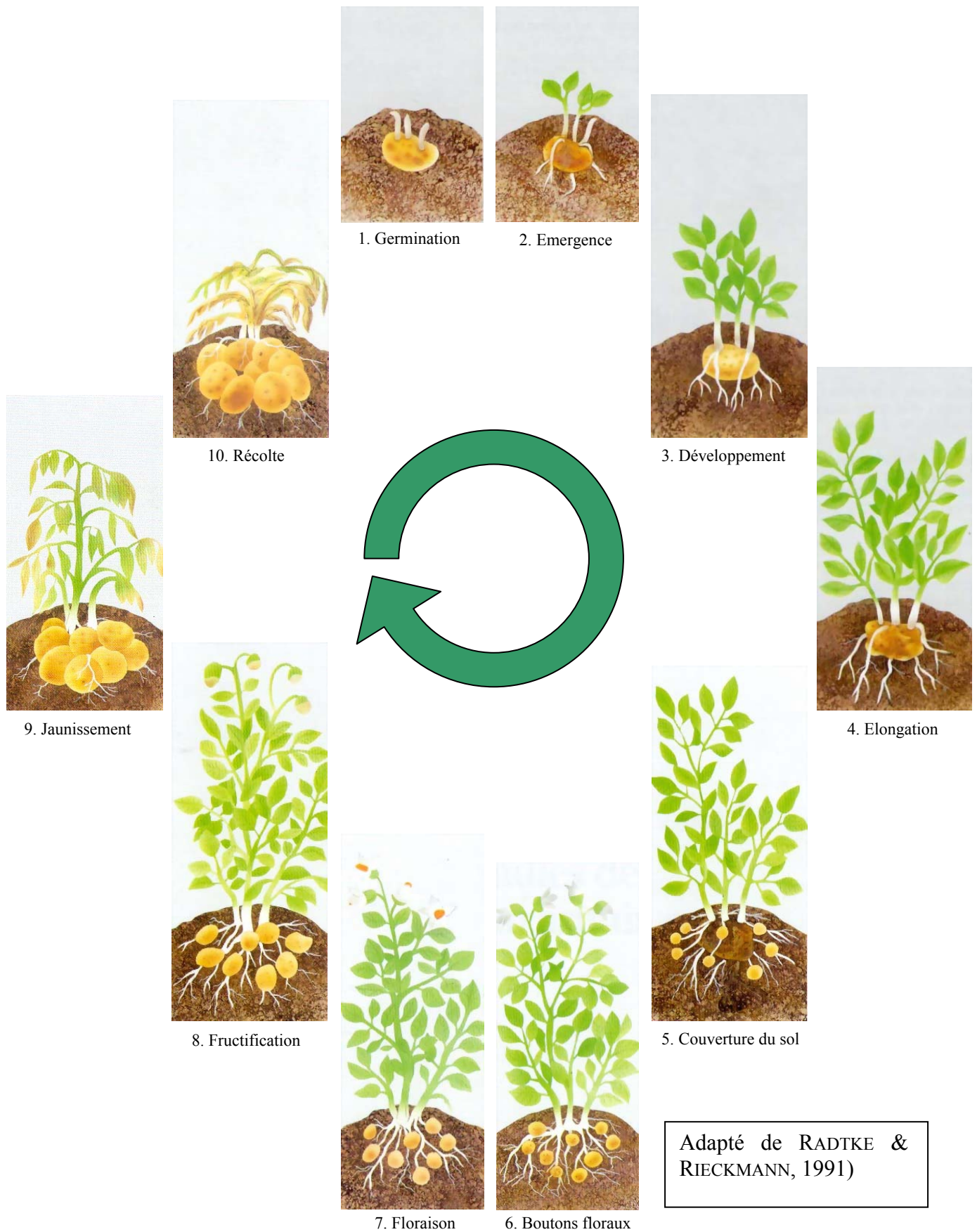
1. Description et classification de la pomme de terre (ROUSSELLE et al., 1996)



Classification d'après HAWKES, 1990 :

Règne : *Métaphytes* (Végétaux supérieurs)
 Embranchement : *Spermatophytes*
 Sous-embranchement : *Angiospermes*
 Classe : Dicotylédones
 Sous-classe : *Asteridae*
 Ordre : Polemoniales
 Famille : *Solanaceae*
 Genre : *Solanum* L.
 Sous-Genre : *Potatoe* (G. Don) D'Arcy
 Section : *Petota* Dumort
 Sous-section : *Potatoae*
 Super-série : *Rotata*
 Série/Groupe : *Tuberosa* (cultivées)
 Espèce : *tuberosum*
 Sous-espèce : *tuberosum*

2. Cycle de production de *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*

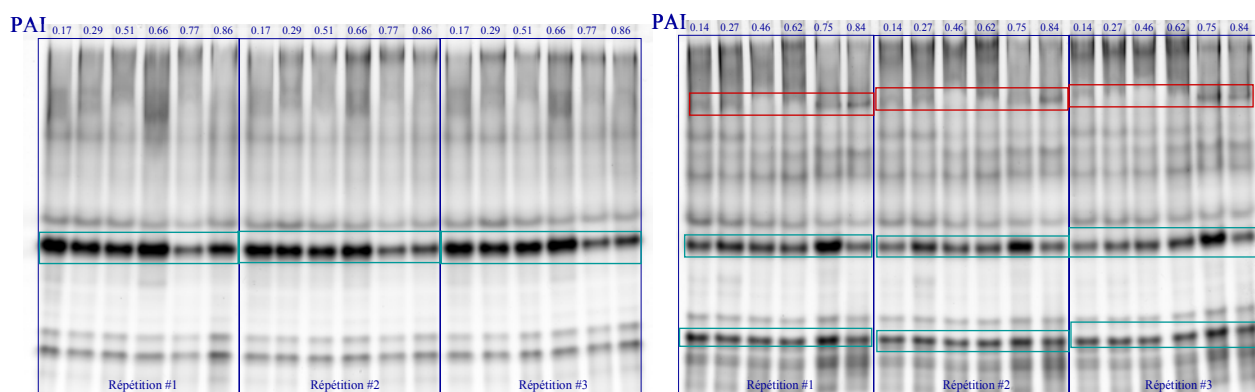


3. Cartes peptidiques des produits de dégradation de la patatine

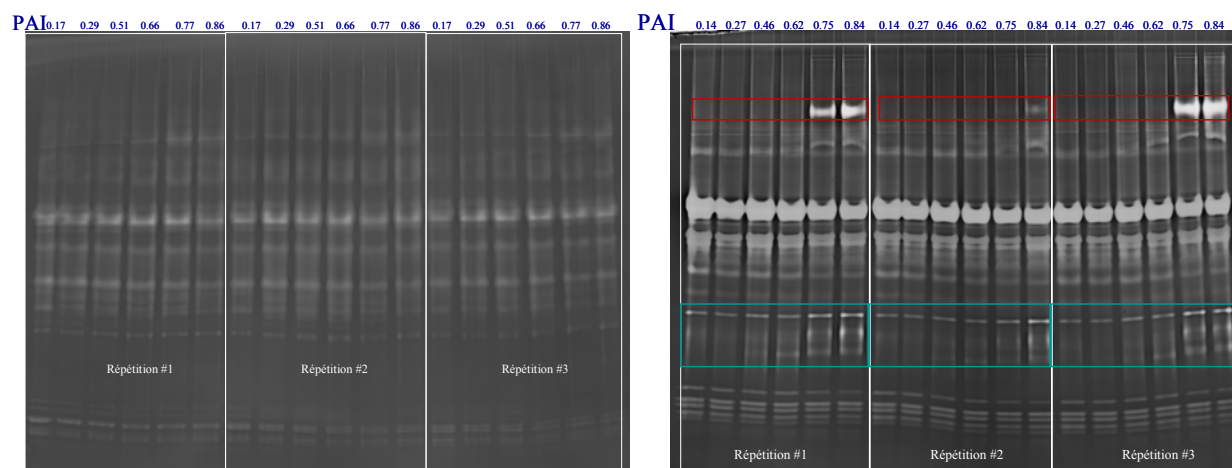
Spot	47		2	3	4	9	10	7	8	11	14	15	21	16	22	23	
Com. Pep.	m/z	aa début	aa fin														
	1705,91	24	41	1705,91	1705,88	1705,88	1705,9		1705,92	1757,94	1705,88	1705,92	1705,92		1705,92	1705,9	
	1868,1	41	57		1868,96	1868,13			1868,12	1868,14	1868,07					1868,09	
	2771,45	41	65								2771,47						
	922,379	58	65	922,358	922,469	922,385	922,445		922,37	922,478	922,36			922,499	922,391	922,368	
	3642,78	66	100	3642,71					3642,84		3642,79					3642,78	
	1723,91	129	144	1723,92								1723,89					
	1167,61	130	138	1167,61	1167,66	1167,75	1167,63	1167,55	1167,61	1167,72	1167,59	1167,68	1167,61	1167,64	1167,67	1167,58	1167,66
	1757,95	144	159	1757,95	1757,94	1757,94	1757,95		1757,95	1757,94	1757,93	1757,94	1757,95	1757,95	1757,94	1757,88	1757,94
	2786,47	144	168	2786,46	2787,54	2786,53	2786,53		2786,58	2786,53	2786,45	2786,57	2786,55	2786,51	2786,5	2786,41	2786,52
	1047,63	160	188	1047,61	1047,62	1047,59	1047,63		1047,62		1047,61	1047,62	1047,61	1047,63	1047,6	1047,59	1047,62
	1361,7	236	247				1361,71	1361,71	1361,75		1361,67			1361,71		1361,7	1361,69
	1360,67	236	247								1360,66						1360,68
	1204,59	237	247								1204,56			1204,67			
	1205,6	237	247								1205,57			1205,62			1205,59
	2441,3	248	289								2441,28			2441,32			2441,27
	2818,52	248	278														
	1835,98	253	269								1835,95						1835,97
	2803,42	253	278								2803,42						2803,42
	3518,75	319	353								3518,72						
	2275,1	331	353								2275,1						
	2785,55	332	357														
	2004,05	352	370					2005			2004,02					2004,94	
	1464,72	357	370								1464,68			1464,72		1464,74	
Orig. Pep.		66	100									3612,72	3612,79				
		66	100						3642,85		3642,77						
		101	112	1448,93	1448,72	1448,92	1448,75	1448,93	1448,94	1448,94	1448,9	1448,81	1448,73	1448,81		1448,93	
		126	138	1630,83					1630,82			1630,83	1630,82	1630,82		1630,82	
		130	138							1133,73		1133,72					
		130	138	1151,7	1151,72	1151,72		1151,73	1151,74	1151,72	1151,71	1151,73	1151,74	1151,73		1151,73	
		130	143	1691,86													
		139	159			2314,25											
		144	168					2786,58		2786,45							
		160	180								2301,18						
		174	209									3926,78					
		236	247					1289,68								1289,63	
		248	269					2431,24								2431,15	
		253	278							2803,41							
		253	269													1825,83	
		269	289	2284,23													
		294	319					3137,38									
		332	352							2275,1							
		353	368	1820,13													
		379	387							1050,09						1050,1	

Tableau a. Cartes peptidiques des produits de dégradation de la patatine présentant les peptides communs (Com. Pep., cases bleues) avec la patatine identifiée au sein du spot 47 (G|84316415). Les peptides originaux (Origin. Pep., cases vertes) propres aux produits de dégradation sont également listés en mentionnant les acides aminés de début et de fin de séquence.

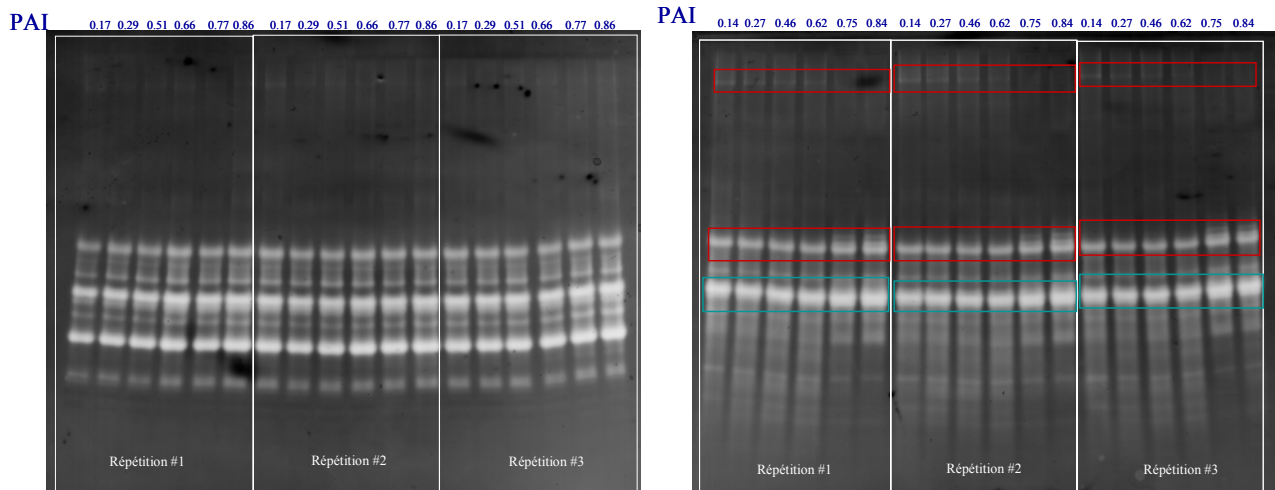
4. Gels natifs présentant l'évolution des activités POX, CAT, SOD et APX au cours du vieillissement des tubercules des cv. Bintje (gauche) et Désirée (droite) récoltés en 2004.



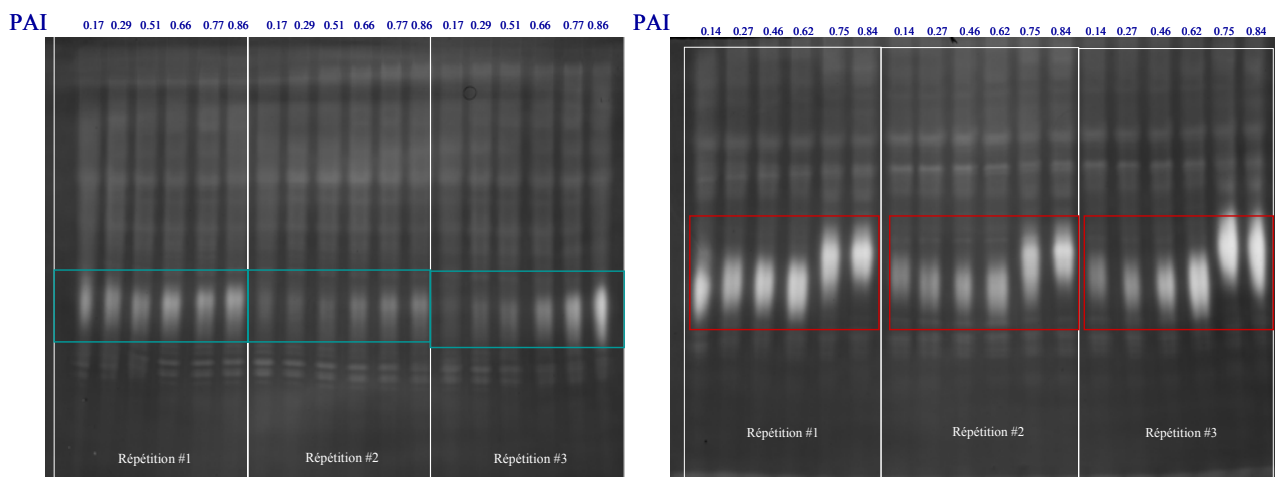
1. Activité peroxydase (POX) colorée à la diaminobenzidine. Chaque gel comporte trois répétitions indépendantes de la cinétique et est chargé avec 100 μg de protéines totales. Le gel de gauche correspond au cv. Bintje et celui de droite, au cv. Désirée. Les variations qualitatives et quantitatives illustrées dans le corps de texte sont encadrées respectivement en rouge et en bleu.



2. Activité catalase (CAT). Chaque gel comporte trois répétitions indépendantes de la cinétique et est chargé avec 100 μg de protéines totales. Le gel de gauche correspond au cv. Bintje et celui de droite, au cv. Désirée. Les variations qualitatives et quantitatives illustrées dans le corps de texte sont encadrées respectivement en rouge et en bleu.



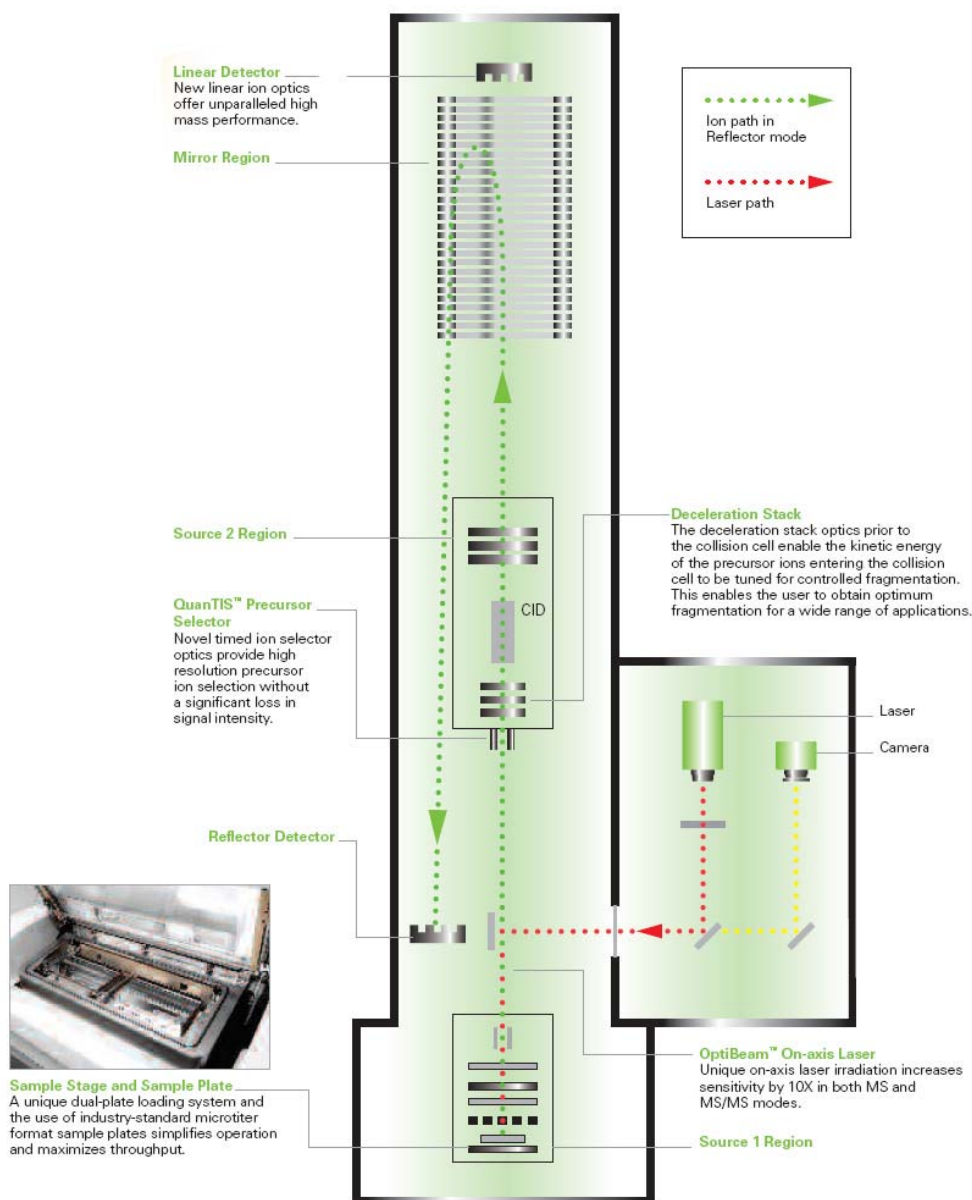
3. Activité superoxyde dismutase (SOD). Chaque gel comporte trois répétitions indépendantes de la cinétique et est chargé avec 50 μg de protéines totales. Le gel de gauche correspond au cv. Bintje et celui de droite, au cv. Désirée. Les variations qualitatives et quantitatives illustrées dans le corps de texte sont encadrées respectivement en rouge et en bleu.



4. Activité ascorbate peroxydase (APX). Chaque gel comporte trois répétitions indépendantes de la cinétique et est chargé avec 110 μg de protéines totales. Le gel de gauche correspond au cv. Bintje et celui de droite, au cv. Désirée. Les variations qualitatives et quantitatives illustrées dans le corps de texte sont encadrées respectivement en rouge et en bleu.

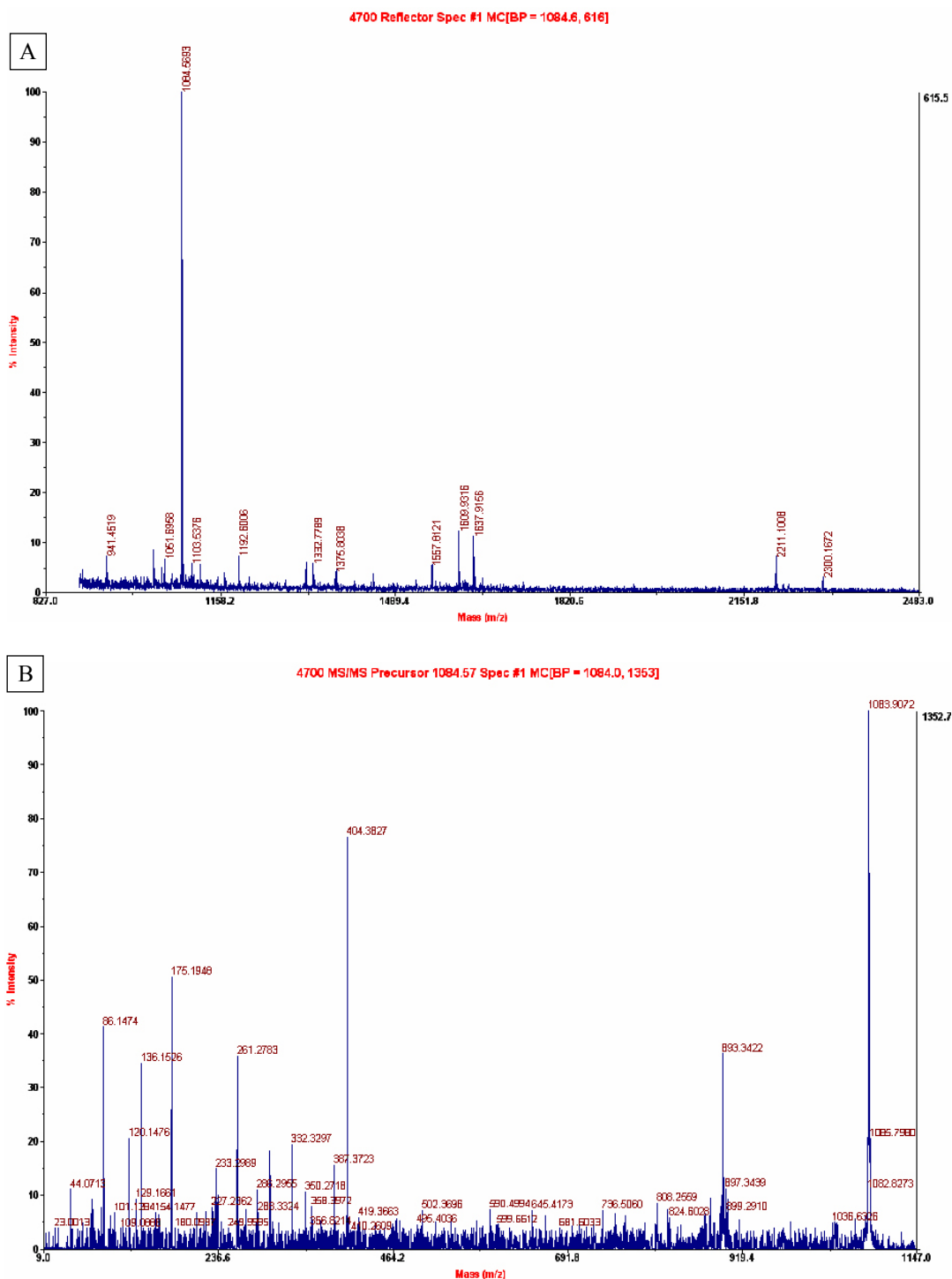
5. Méthodologie utilisée pour les identifications en MS/MS

Après digestion et dépôt du mélange de peptides tryptiques sur la cible du MALDI-TOF-TOF, plusieurs étapes sont nécessaires avant de parvenir à une identification protéique en MS/MS. Dans un premier temps, le spectromètre de masse est utilisé en mode MS afin d'acquérir une carte peptidique (PMF : *Peptide Mass Fingerprint*) de l'échantillon (Figure 2A). Les échantillons à analyser sont mélangés et co-cristallisés avec une matrice constituée de petites molécules organiques possédant un chromophore qui absorbe à la longueur d'onde du laser utilisé. Un tir laser est effectué sur le mélange matrice/analyte et l'énergie apportée est absorbée par la matrice. Cette absorption provoque la désorption de la matrice et de l'analyte (mélange de peptides tryptiques), ces derniers étant également photoionisés. Les ions ainsi produits sont transférés vers l'analyseur de masse où ils sont séparés selon leur rapport m/z . Ce flux d'ions résolus arrive finalement au détecteur où ils sont comptés, le signal obtenu étant converti en signal électrique destiné au traitement informatique.



1. Structure interne du MALDI-TOF-TOF 4800 Proteomic Analyzer (Applied Biosystems™)

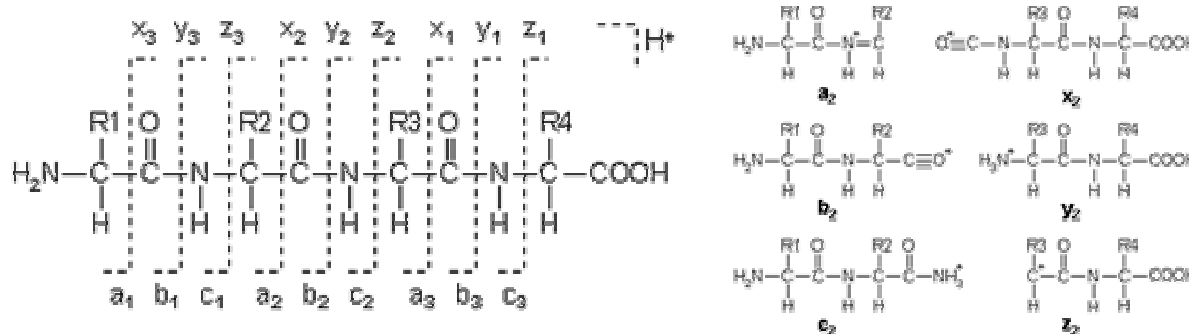
Un exemple de PMF d'un mélange peptidique provenant de la digestion tryptique d'une catalase exprimée dans le tubercule de pomme de terre est présenté à la Figure 2A.



2. Carte peptidique de la catalase identifiée sur gel 2D (A). Spectre de fragmentation MS/MS correspondant à l'ion précurseur possédant une valeur m/z de 1084,57 (B).

Dans un second temps, plusieurs ions précurseurs sont sélectionnés (automatiquement, puis manuellement) sur base de leur intensité et de leur rapport m/z afin d'être fragmentés dans la chambre de collision à l'aide d'un gaz (dans notre cas, l'air). Chaque peptide ionisé sélectionné est ainsi fragmenté en de nombreux ions fils (Figure 2B). Le schéma de fragmentation suivi par un peptide est complexe et dépend

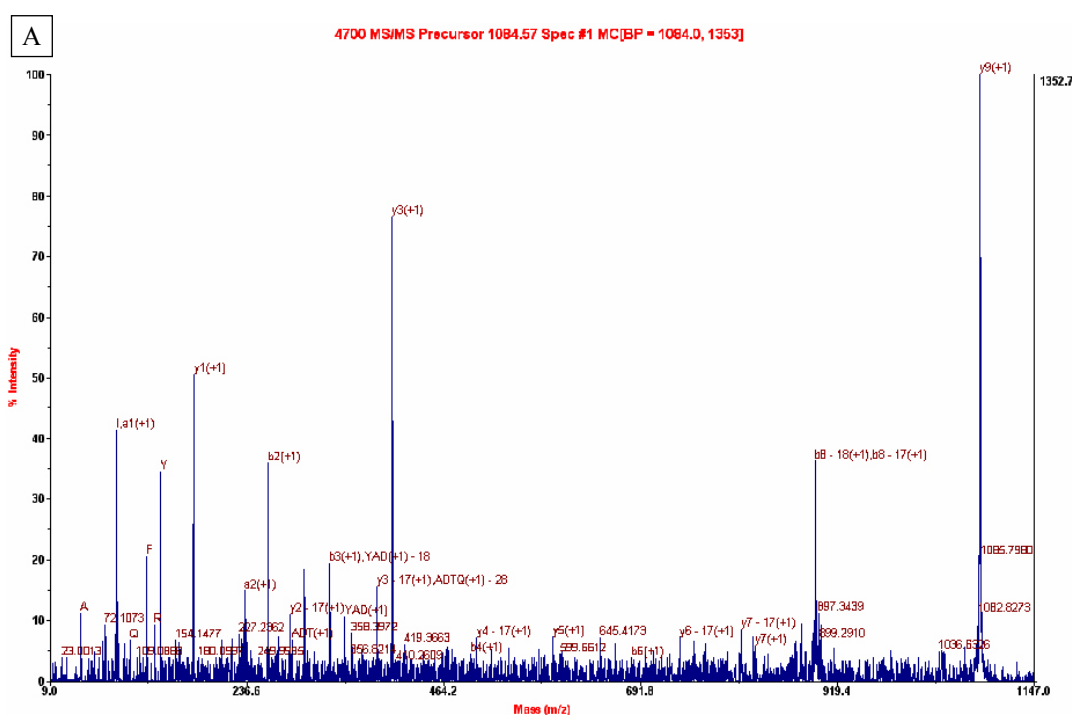
notamment de la séquence d'acides aminés, de l'énergie interne du peptide, du mode d'introduction de cette énergie, de l'état de charge, etc.



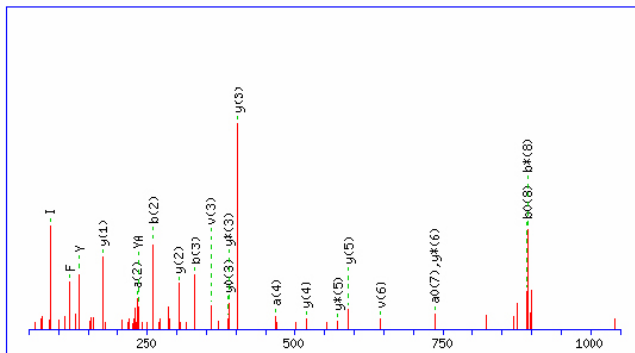
3. Modalités de fragmentation des liaisons peptidiques et nomenclature associée.

Les fragments seront seulement détectés s'ils portent au moins une charge électrique. Pour les fragments correspondant à une fragmentation de lien peptidique entre acides aminés (Figure 3), si la charge électrique est conservée sur le fragment N-terminal, l'ion est dénommé *a*, *b*, ou *c*. Au contraire, si la charge est portée par le fragment C-terminal, l'ion est nommé *x*, *y*, ou *z*. Les ions *c* et *y* soustraient un proton additionnel au peptide précurseur. D'autres types d'ions fils appelés fragments internes existent. Ils résultent d'une double fragmentation de la chaîne peptidique (combinaison de clivages *b* et *y* ou *a* et *y*). Les ions immoniums sont à ce titre un exemple particulier de fragment interne formé par combinaison de clivage *a* et *y* et ne contenant qu'une seule chaîne latérale (un seul résidu acide aminé).

Les séries d'ions obtenus en mode MS/MS avec le MALDI-TOF-TOF sont principalement de type *b* ou *y*. Les spectres MS/MS obtenus sont finalement annotés manuellement ou automatiquement en établissant la séquence d'acides aminés sur base des différences de masse observées entre fragments (Figure 4). Chaque séquence obtenue se voit finalement attribuer un score et une valeur *E* permettant de juger de la fiabilité de l'identification.



B



MONOISOTOPIC mass of neutral peptide Mr(calc): 1083.5349
 Ions Score: 36 Expect: 0.72
 Matches (Bold Red): 24/108 fragment ions using 28 most intense peaks

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	w	w'	y	y*	y ⁰	#
1	86.0964	86.0964			114.0913			I							9
2	120.0808	233.1648			261.1597			F	879.3955			971.4581	954.4316	953.4475	8
3	44.0495	304.2019			332.1969			A	808.3584			824.3897	807.3632	806.3791	7
4	136.0757	467.2653			495.2602			Y	645.2951			753.3526	736.3260	735.3420	6
5	44.0495	538.3024			566.2973			A	574.2580			590.2893	573.2627	572.2787	5
6	88.0393	653.3293		635.3188	681.3242		663.3137	D	459.2310	458.2358		519.2522	502.2256	501.2416	4
7	74.0600	754.3770		736.3664	782.3719		764.3614	T	358.1833	371.2037	373.1830	404.2252	387.1987	386.2146	3
8	101.0709	882.4356	865.4090	864.4250	910.4305	893.4039	892.4199	Q	230.1248	229.1295		303.1775	286.1510		2
9	129.1135							R	74.0237	73.0284		175.1190	158.0924		1

4. Annotation automatique du spectre MS/MS obtenu pour l'ion précurseur 1084,57 (A). La table (B) présente les correspondances de masse avec les fragments théoriques attendus pour l'accession sélectionnée.

6. Technologie DIGE (fluorescence Difference Gel Electrophoresis)

La technologie DIGE est une version multiplexée de la 2D-PAGE classique permettant la résolution simultanée de deux échantillons sur un même gel (Figure 1). La normalisation des intensités des spots fait intervenir une référence interne utilisée comme dénominateur commun à l'ensemble des gels utilisés dans l'analyse d'abondance protéique.

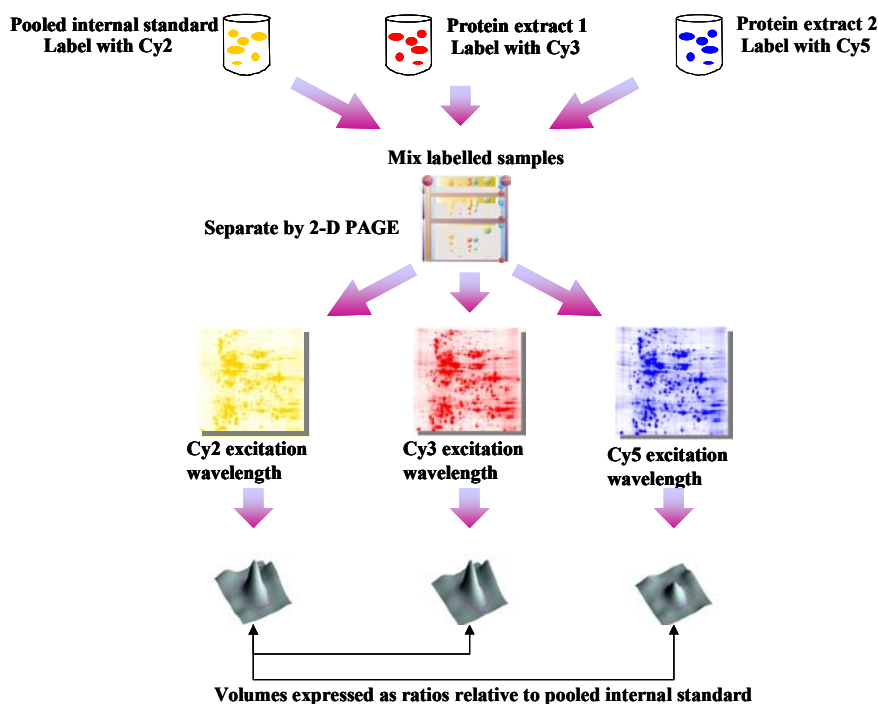


Figure 1. Principe de la technologie DIGE (version multiplexée de la 2D-PAGE).

La méthodologie utilisée au cours de cette thèse est la suivante. Pour chacune des valeurs de PAI, trois extractions indépendantes sont réalisées au départ des échantillons de poudre de tubercules stockés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chaque extrait subit une étape de lavage à l'aide du kit 2D-Clean-up (GE Healthcare), ainsi qu'une vérification qualité en SDS-PAGE et en gel 2D de 7cm de large coloré au nitrate d'argent ou au SYPRO-Ruby. Après vérification du pH ($\approx 8,5$), chaque échantillon est coloré individuellement à l'aide de cyanines 3 ou 5 différant par leur spectre d'absorption et d'émission (Figure 2). Ces fluorochromes ont des masses moléculaires très proches afin de limiter les écarts de position sur les gels 2D.

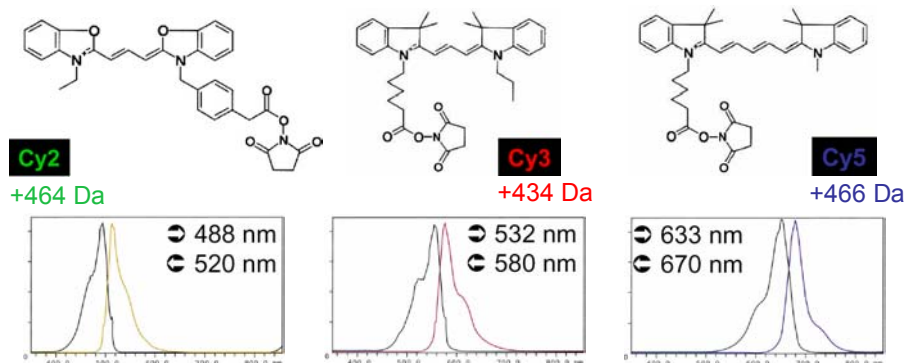


Figure 2. Structures, masses moléculaires et spectres d'émission / absorption des 3 cyanines.

En raison des conditions expérimentales utilisées (pH, rapport des quantités de cyanines et de protéines utilisées), le marquage ne concerne qu'une faible proportion (environ 3 %) de chaque espèce protéique. Il cible les groupements ϵ des résidus lysines (Figure 3). Ici aussi, les conditions expérimentales permettent de limiter le nombre de lysines marquées par protéine. En théorie, aucun marquage multiple comportant plus d'une lysine marquée par protéine n'est réalisé. Dans la pratique, il est plus juste de dire que ces marquages multiples peuvent exister, mais qu'ils se situent en-dessous du seuil de détection des scanners. A la fin du processus de marquage, un ajout de lysines libres permet de fixer les fluorochromes n'ayant pas encore réagi avec les résidus lysines des protéines. Ces lysines libres marquées seront éliminées lors de la migration de la seconde dimension. En plus des échantillons, une référence constituée d'un mélange pondéré de chacun des échantillons à analyser est marquée à l'aide de la cyanine 2 (cette dernière présente le moins bon rapport signal vs. bruit de fond). Les quantités marquées doivent permettre de charger 50 μg de cette référence sur chacun des gels DIGE.

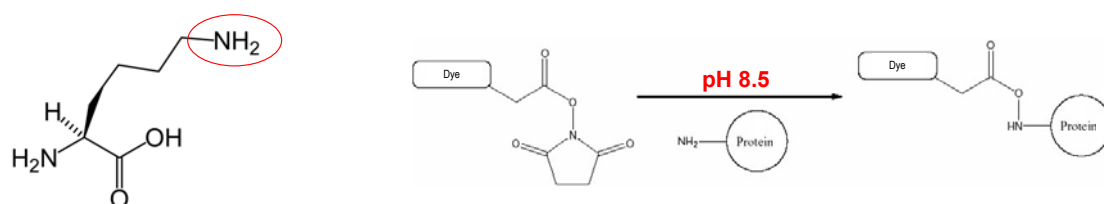


Figure 3. Structure de la lysine (groupe ϵ entouré en rouge) et réaction de marquage à pH 8,5.

Le chargement des gels diffère sensiblement par rapport à une approche conventionnelle (Figure 4). La technologie DIGE permet ici de réduire le nombre de strips et de gels utilisés, ce qui diminue fortement la variabilité expérimentale. Pour chacune des trois répétitions prévues, les couplages d'échantillons diffèrent afin d'éviter les pertes simultanées de plusieurs répétitions du même échantillon si certains gels se révèlent inexploitable. Une permutation des fluorochromes (*Dye swap*) est également réalisée afin d'intégrer les effets de canal dans l'analyse statistique.

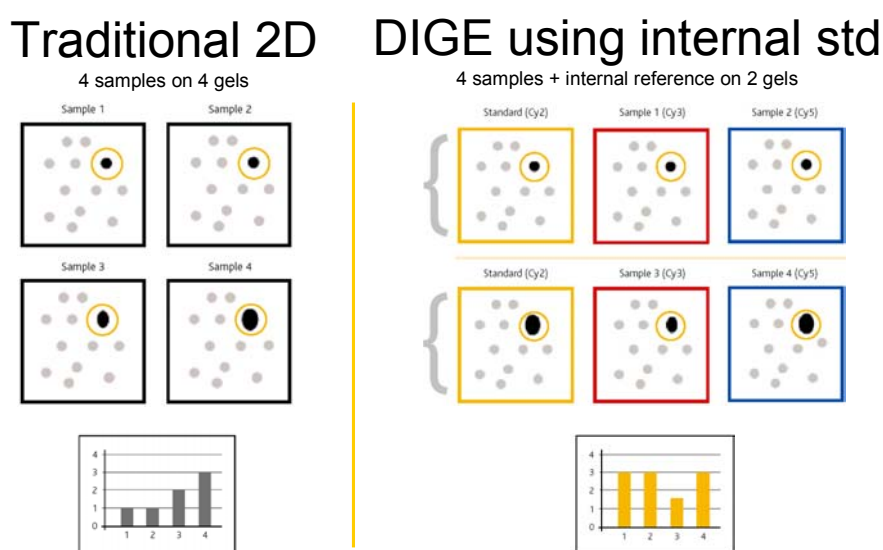


Figure 4. Comparaison des dispositifs expérimentaux utilisés en 2D-PAGE classique ou multiplexée (DIGE).

Deux expériences DIGE indépendantes ont été nécessaires afin de produire les gels utilisés dans notre analyse, chaque expérience comportant une proportion de gels non exploitables (problèmes de focalisation isoélectrique). *In fine*, nous avons néanmoins obtenu au minimum deux images de gels indépendantes pour chacune des valeurs de PAI (Tableau 1).

Gel #	A01	A02	A04	A09	A24	B12	B20	B21
Cy5	1,1	8,1	2,2	2,3	10,3	4,1	8,1	6,3
Cy3	10,1	2,1	1,2	8,3	4,3	6,1	1,3	2,1
Cy2	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
Age	0,14	0,27	0,46	0,62	0,75	0,84		
Image	A01 Cy5	A04 Cy5	A24 Cy3	B12 Cy3	A09 Cy3	A01 Cy3		
	A04 Cy3	A09 Cy5	B12 Cy5	B21 Cy5	B20 Cy5	A24 Cy5		
	B20 Cy3	B21 Cy3			A02 Cy5			
		A02 Cy3						

Tableau 1. Caractéristiques des gels utilisés pour l'analyse DeCyder.

Après numérisation, les gels sont analysés à l'aide du logiciel DeCyder (Figure 5). Dans le module *Differential in-gel analysis (DIA)*, les spots sont codétectés pour chaque gel en utilisant les images cumulées issues des marquages avec les cyanines 2, 3 et 5. Les spots sont ensuite quantifiés et les abondances sont exprimées par rapport à la référence interne marquée à l'aide de la cyanine 2. Le module *Biological variation analysis (BVA)* permet ensuite d'établir les correspondances inter-gels en disposant une quarantaine de repères (*landmarks*) sur chacune des images des références internes. Les données d'abondance peuvent enfin être exprimées en fonction de notre facteur fixe (le PAI) et être triées en fonction des paramètres statistiques retenus (valeur de p pour l'ANOVA, rapport d'abondance protéique des extrêmes de la cinétique,...). Au final, chaque valeur d'abondance utilisée pour l'analyse statistique fait l'objet d'une vérification manuelle permettant de confirmer la correspondance des spots différenciellement exprimés.



Figure 5. Illustration des différents modules du logiciel DeCyder.