

50376  
1979  
184

N° d'ordre : 803

50376  
1979  
184

# THÈSE

présentée à

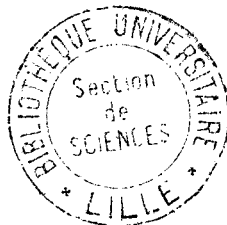
L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE 3<sup>ème</sup> CYCLE**

par

Michel POULLE



**ETUDE DE LA NADH : NITRATE REDUCTASE  
D'UNE SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE ALBA :  
CARACTERISATION, INDUCTION ET PURIFICATION**

Soutenu en Décembre 1979 devant la Commission d'Examen  
Membres du Jury

|               |            |
|---------------|------------|
| MM. BOURIQUET | Président  |
| KREMBEL       | Rapporteur |
| Mlle SPIK     | Examineur  |
| M. NOTTON     | Examineur  |

*A mes Parents, dont les sacrifices  
me permettent aujourd'hui de présenter  
ce travail et de réaliser un désir cher .-*

Le moment est venu pour moi d'exprimer à Monsieur le Professeur BOURIQUET ma profonde gratitude. Je le remercie de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir suivi, conseillé et encouragé pendant ces trois années de travail.

Je sais gré à Mademoiselle le Professeur SPIK et Monsieur le Professeur KREMBEL d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'ils soient remerciés, ainsi que le laboratoire de Biochimie dirigé par Monsieur le Professeur MONTREUIL, pour avoir permis de réaliser les premiers essais immunologiques.

Que le Docteur HEWITT et son équipe de recherche soient chaleureusement remerciés de l'accueil qu'ils m'ont réservé dans leur laboratoire de Long Ashton. Leur aide m'a été précieuse dans la résolution de certains problèmes posés par la purification de l'enzyme. Je suis particulièrement touché de l'honneur que me fait le Docteur NOTTON en participant à ce Jury de thèse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Monsieur RAMBOUR qui m'a continuellement suivi et aidé dans ce travail de recherche, je lui suis très reconnaissant de son constant dévouement.

L'aide et les conseils que m'ont donnés Mademoiselle BRASSART, Messieurs DUBOIS, LEGRAND, VASSEUR, m'ont permis de mener à bien cette étude. Qu'ils en soient vivement remerciés ainsi que Messieurs BATCHO et COUILLEROT pour l'amitié et la sympathie qu'ils m'ont toujours portées.

J'exprime ma reconnaissance à Madame MAËS pour avoir permis la réalisation de ce mémoire.

Je ne saurais oublier de témoigner de mon affection à Mesdames DANNOOT et ECREPONT et de ma sincère amitié à toute l'équipe du laboratoire dont j'ai toujours apprécié la gentillesse et la sympathie.

Enfin, que tous ceux qui m'ont aidé soient vivement remerciés.

o o o o o o o o o

## ABREVIATIONS .-

|   |   |
|---|---|
| D P N - D P N H :<br>( = N A D et N A D H ) | Formes oxydée et réduite du diphospho-pyridine nucléotide.              |
| T P N - T P N H :<br>( = N A D P H )        | Formes oxydée et réduite du triphospho-pyridine-nucléotide.             |
| N A D <sup>+</sup> - N A D H :              | Formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine dinucléotide.          |
| N A D P <sup>+</sup> - N A D P H :          | Formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| F M N - F M N H <sub>2</sub> :              | Formes oxydée et réduite du flavine mononucléotide.                     |
| F A D - F A D H <sub>2</sub> :              | Formes oxydée et réduite du flavine adénine dinucléotide.               |
| E D T A :                                   | Acide éthylène diamino tétraacétique                                    |
| A T P :                                     | Adénosine triphosphate  |
| D C P I P :                                 | Dichlorophénolindophénol  |
| S D S :                                     | Sodium dodecyl sulfate  |

## I N T R O D U C T I O N

γ Les nitrates sont généralement considérés comme la source principale d'azote pour les plantes supérieures, exception faite des légumineuses. Leur incorporation dans les acides aminés nécessite une série de réductions dont la première est leur transformation en nitrites, étape catalysée par la nitrate réductase (E.C. 1.6.6.1).

γ Lorsque des cellules végétales sont cultivées en suspension dans un milieu non renouvelé, elles utilisent plus ou moins rapidement les éléments nutritifs du milieu et assurent ainsi leur prolifération. Celle-ci s'arrête avec l'épuisement du milieu en ses éléments essentiels. La durée, pendant laquelle une quantité définie de cellules est capable de croître et de se multiplier dans des conditions contrôlées de température, de lumière et de milieu peut définir un cycle de croissance de la suspension.

γ Un tel cycle comporte alors une série d'évènements physiologiques et biochimiques dont l'ordre et la durée sont caractéristiques du végétal étudié. Dans le cas de la suspension cellulaire de Silene alba, l'un des tous premiers évènements déclenchés avant même que la croissance et les premières divisions cellulaires ne soient amorcées, est une synthèse très brève d'ARN (DUBOIS et Coll., 1976). D'autre part, la réduction des nitrates s'opère pendant une période assez brève qui se situe au début de la phase exponentielle de croissance de la suspension (POULLE, 1977). Il apparaît par conséquent important de savoir si ces deux faits précoces sont en relation. C'est dans cette perspective que s'inscrit ce travail.

γ Celui-ci s'est donc attaché à préciser le moment de l'apparition de l'activité enzymatique et sa signification et à caractériser certains facteurs qui pouvaient la modifier.

γ Enfin, des essais de purification de la protéine enzymatique ont été entrepris\*. L'isolement de la nitrate réductase entre dans un projet de recherche ultérieure qui devrait conduire à l'obtention d'un immun-sérum contenant les anticorps de la nitrate réductase et permettre ainsi une étude plus fine de la succession d'évènements moléculaires qui apparaissent lors d'un cycle de croissance de la suspension cellulaire de Silene alba.

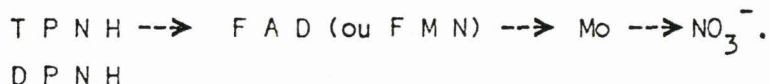
\* Une partie du travail de purification de l'enzyme a été effectuée à la station de recherche agronomique de Long Ashton (G.B.) dans le laboratoire du Docteur E.J. HEWITT, grâce à une subvention du British Council.

## H I S T O R I Q U E

### 1) STRUCTURE ET MECANISME D'ACTION DE LA NITRATE REDUCTASE CHEZ LES EUCARYOTES

#### A) F A D ET GROUPEMENT PROSTHETIQUE

Les premiers travaux effectués sur Neurospora crassa et le Soja ont révélé que le FAD est le groupement prosthétique naturel de la nitrate réductase (NASON et EVANS, 1953 ; EVANS et NASON, 1953). Son rôle, comme transporteur d'électrons, est mis en évidence (NICHOLAS et NASON, 1954a et 1955) selon le schéma suivant :



Des études précises de chromatographie et de fluorométrie montrent qu'une molécule d'enzyme native chez Chlorella contient au moins deux molécules de F A D (SOLOMONSON et Coll., 1975). Certains auteurs observent que le F A D stimule l'activité de la nitrate réductase obtenue après gel-filtration et qu'il exerce un effet protecteur contre la dénaturation thermique (ZUMFT et Coll., 1970 ; RELIMPIO et Coll., 1971 ; BAREA et Coll., 1976 ; DE LA ROSA et Coll., 1977 ; ROUSTAN et Coll., 1974). En outre, comme nous le verrons ultérieurement, la nitrate réductase est souvent considérée comme une flavoprotéine.

#### B) PRESENCE DE GROUPEMENTS THIOLS

L'inhibition enzymatique exercée par le parachloromercuribenzoate, rendue réversible par l'addition de cystéine, de glutathion ou de dithiothréitol, suggère la présence d'un ou plusieurs groupements thiols à la surface active de l'enzyme (NASON et EVANS, 1953 ; EVANS et NASON, 1953 ; SCHRADER et Coll., 1968 ; WRAY et FILNER, 1970). Ces observations ont conduit de nombreux auteurs à ajouter dans les milieux d'extraction, des protecteurs tels que la cystéine, le glutathion, le dithiothréitol ou encore le B-mercaptoéthanol. Toutefois, la dose de cystéine à employer pour obtenir une protection maximale est variable selon l'espèce et la nature du tissu (HEWITT et NICHOLAS, 1964).

La présence de cystéine peut être indispensable (BEEVERS et Coll., 1964) ou inutile (WALLACE et PATE, 1965). JONES et SHEARD signalent même un effet inhibiteur de la cystéine, sur l'enzyme de pois (JONES et SHEARD, 1973). De même, le B mercaptoéthanol exerce un effet néfaste sur l'activité des enzymes de l'Ortie et de l'épinard (WELANDER, 1978).

### C) PRESENCE DU MOLYBDENE

NASON et EVANS (1953) constatent que l'enzyme du Soja renferme probablement un métal qui peut être soit le molybdène, soit le manganèse. Cultivés en absence de molybdène, des plants de choux fleurs manquent ou ne possèdent que très peu d'activité nitrate réductase (CANDELA et Coll., 1957 ; AFRIDI et HEWITT, 1964). Le molybdène est identifié comme étant le métal de l'enzyme de *Neurospora* et celle du Soja (NICHOLAS et NASON, 1954b et 1955).

VEGA et Coll. (1971) montrent le besoin absolu de ce métal pour l'activité enzymatique chez *Chlorella fusca*. Ils concluent que le métal est incorporé, in vivo, à l'intérieur de l'apoenzyme préexistante et inactive et que son rôle est lié, à la réduction des nitrates en nitrites. Des épinards, cultivés en absence de molybdène, ne présentent pas d'activité nitrate réductase (NOTTON et HEWITT, 1971a). En fournissant à ces plantes du molybdène marqué, NOTTON et HEWITT (1971a) observent, après purification, que les seules protéines radioactives sont celles associées à la nitrate réductase sur le gel d'acrylamide. Ils suggèrent que l'enzyme est une protéine molybdène dépendante renfermant le métal. L'incorporation d'un analogue structural, le tungstène, provoque l'inhibition de l'activité enzymatique chez l'Orge, le Tabac et le Maïs (WRAY et FILNER, 1970 ; HEIMER et FILNER, 1971 ; ASLAM et OAKS, 1976). Le tungstène peut empêcher l'insertion du molybdène dans le complexe nitrate réductase. Selon WRAY et FILNER (1970) le molybdène ne serait pas nécessaire à la formation de l'apoenzyme, mais pourrait agir commeco-inducteur avec les nitrates ou fonctionner comme groupe-ment prosthétique de l'enzyme ou encore les deux à la fois.

De même, SUBRAMANIAN et SORGER (1972c) pensent qu'en absence de molybdène ou en présence de tungstène, les unités protéiques du complexe enzymatique de *Neurospora* sont toutes synthétisées mais que le site de fixation du molybdène est replié in vivo de telle façon que le métal ne peut être lié in vitro. L'induction par les nitrates semble dépendre d'AR N messagers pour la synthèse de l'apoprotéine suivie d'une activation rapide

par le molybdène indépendamment de la synthèse protéique (JONES et Coll., 1978).

Quant au mécanisme d'inhibition par le tungstène, il peut se traduire par la formation d'une enzyme non fonctionnelle qui serait rendue active, in vivo, par l'addition de molybdène en absence de synthèse protéique (HEIMER et FILNER, 1971). Ceci est confirmé par NOTTON et HEWITT (1971b), NOTTON et Coll. (1972) qui montrent la formation d'un tungstoprotéine inactive.

Chez l'épinard, il est possible de reconstituer, in vitro, une nitrate réductase active à partir d'un complexe contenant du molybdène obtenu par traitement acide de l'enzyme purifiée, et de l'apoprotéine de l'enzyme obtenue à partir de plantes carencées en molybdène (HEWITT et Coll., 1977).

NICHOLAS et NASON (1954a et 1955) démontrent le rôle du molybdène comme transporteur d'électrons chez Neurospora et le soja.

#### D) LES DIFFERENTS DONNEURS D'ELECTRONS

##### 1) Spécificité des nucléotides à pyridine N A D H (D P N H) et N A D P H (T P N H)

Chez Neurospora crassa et Aspergillus nidulans, la nitrate réductase est essentiellement T P N H spécifique (NASON et EVANS, 1953 ; NICHOLAS et Coll., 1954) tandis que celle, extraite du soja, utilisent T P N H et D P N H (EVANS et NASON, 1953). L'enzyme provenant de 15 des 16 plantes supérieures étudiées par BEEVERS et Coll. (1964), a un besoin spécifique ou préférentiel de N A D H ; seule celle du soja fonctionne avec N A D H et N A D P H. Cette spécificité du N A D H comme donneur d'électrons est confirmée chez le pois (WALLACE et PATE, 1965), la tomate (SANDERSON et COCKING, 1964a), l'épinard (PANEQUE et LOSADA, 1966), Chlorella fusca (ZUMFT et Coll., 1969), le pommier (KLEPPER et HAGEMAN, 1969), la fève (OJI et IZAWA, 1969a), l'orge (WRAY et FILNER, 1970), le maïs, la courge et l'épinard (SCHRADER et Coll., 1968), Thalassiosera pseudonana (AMY et GARRETT, 1974), le blé (UPCROFT et DONE, 1974), le tournesol (CHISHOLM et GALITZ, 1975) et 8 graminées (DUSKY et GALITZ, 1977).

Par contre, chez les champignons, l'enzyme semble être N A D P H spécifique (ITO et SUZUKI, 1978 ; GARRETT et NASON, 1969 et DOWNEY, 1971).



La possibilité d'accepter des électrons à partir de N A D H et de N A D P H par l'enzyme de Soja est l'objet de controverses. En effet, WELLS et HAGEMAN (1974) montrent que les extraits de soja et de maïs renferment une phosphatase qui convertit N A D P H en N A D H (WELLS et HAGEMAN, 1970). De ce fait, ils concluent que l'enzyme est N A D H dépendante.

JOLLY et Coll., (1976) et CAMPBELL (1976a) séparent, chez le soja, la N A D H nitrate réductase et la N A D P H nitrate réductase, cette dernière étant libre d'activité phosphatase. CAMPBELL (1976b) isole du scutellum de maïs 2 nitrate réductases, l'une ayant son maximum d'activité avec N A D P H et l'autre avec N A D H. Ces deux enzymes, nommées N A D H : nitrate oxydoréductase (E.C.1.6.6.1.) et N A D (P) H : nitrate oxydoréductase (E.C.1.6.6.2.) sont partiellement séparées chez des plantules de riz (SHEN et Coll., 1976). La 2e enzyme, qui utilise directement N A D P H, peut être induite par le chloramphénicol (SHEN, 1972 ; SHEN et Coll., 1976). Chez l'épinard et le maïs, PANEQUE et LOSADA (1966), SCHRADER et Coll. (1968) n'obtiennent l'activité nitrate réductase avec N A D P H que si F M N et N A D P réductase sont ajoutés au milieu d'incubation.

Enfin, chez les algues Dunaliella tertiolecta (LE CLAIRE et GRANT, 1972) et parva (HEIMER, 1976), Ankistrodesmus braunii (AHMED et SPILLER, 1976) et Chlorella variegata (HIPKIN et Coll., 1979) N A D H et N A D P H sont tous deux effectifs.

## 2) Les autres donneurs d'électrons

F M N H<sub>2</sub> et, dans certains cas, F A D H<sub>2</sub> sont des donneurs d'électrons pour l'enzyme extraite des plantes supérieures (PANEQUE et Coll., 1965 ; SCHRADER et Coll., 1968 ; WRAY et FILNER, 1970 ; OJI et IZAWA, 1969a ; KLEPPER et HAGEMAN, 1969 ; JOLLY et Coll., 1976 et CAMPBELL, 1976a). De même, F A D H<sub>2</sub> peut fournir des électrons à l'enzyme de Neurospora (GARRETT et NASON, 1969) et F M N H<sub>2</sub> à celle de Chlorella (ZUMFT et Coll., 1969).

Les activités nitrate réductase, en présence de méthyl viologène ou de benzyl viologène réduits sont mesurées chez les plantes supérieures (HAGEMAN et Coll., 1962 ; OJI et IZAWA, 1969a ; SCHRADER et Coll., 1968 ; PANEQUE et Coll., 1965 ; JOLLY et Coll., 1976 et CAMPBELL, 1976a) les champignons (GARRETT et NASON, 1967 et 1969 ; DOWNEY, 1971) et les algues (ZUMFT et Coll., 1969 ; AMY et GARETT, 1974 ; AHMED et SPILLER, 1976 ; ITO et SUZUKI, 1978 ; HIPKIN et Coll., 1979).

Chez l'orge, deux systèmes permettent de métaboliser les nitrates dans des extraits de racines : un composant soluble utilisant N A D H (COUPE et Coll., 1967 ; MIFLIN, 1967) et une fraction particulaire utilisant le succinate plus facilement que le N A D H (MIFLIN, 1967). Une réduction des nitrates stimulée par le succinate, dans des fractions particulières de différents organes de tomate, est aussi signalée (SANDERSON et COCKING, 1964b).

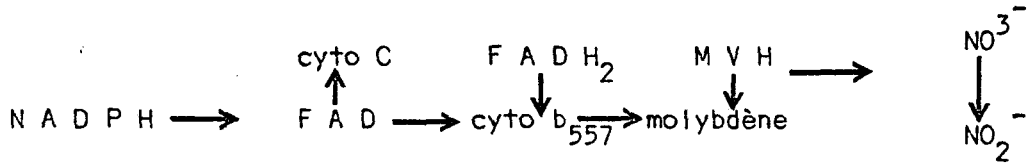
Toutes ces informations peuvent être réunies dans un schéma général du mécanisme de réduction des nitrates où figurent donneurs, accepteurs et transporteurs d'électrons. De tels schémas sont reproduits dans le paragraphe suivant.

#### E) FONCTIONS, MODELES STRUCTURAUX et MECANISME D'ACTION DE LA NITRATE REDUCTASE

##### 1) Chez les champignons :

Depuis les premiers travaux de NASON et EVANS (1953), l'enzyme de Neurospora crassa a été l'objet de nombreuses études. SORGER (1965) émet l'hypothèse que celle-ci est un agrégat de deux polypeptides. L'un transporte des électrons à partir du T P N H au F A D et de là, au cytochrome C ; l'autre accepte des électrons du F A D réduit du 1er polypeptide, les transmet au molybdène, puis au nitrate. Ultérieurement, GARRETT et NASON (1967) montrent l'association d'un cytochrome de type b à l'enzyme. Ainsi la N A D P H nitrate réductase de Neurospora (E C 1.6.6.2.) est caractérisée comme une sulfo-molybdoflavoprotéine soluble, contenant le cytochrome  $b_{557}$ , de poids moléculaire de l'ordre de 230 000. Elle présente 4 types d'activité d'ailleurs associées les unes aux autres ; celle de la N A D P H nitrate réductase, qui représente l'activité enzymatique globale ( $N A D P H \rightarrow NO_3^-$ ) et semble être physiologiquement la plus importante. Les 3 autres correspondent à des maillons différents de la chaîne de transport des électrons en présence de donneurs et d'accepteurs naturels ou artificiels, ce sont : l'activité N A D P H - cytochrome C réductase F A D dépendante ( $N A D P H \rightarrow cyto. C$ ) ; l'activité (F A D H<sub>2</sub>) nitrate réductase ( $F A D H_2 \rightarrow NO_3^-$ ) et l'activité

méthyl viologène réduit (M V H) nitrate réductase (M V H  $\rightarrow$   $\text{NO}_3^-$ ). (GARRETT et NASON, 1967 et 1969). Le diagramme suivant représente le transfert des électrons lors de la réduction des nitrates par l'enzyme de Neurospora.



Le groupement fonctionnel majeur de l'enzyme de Aspergillus nidulans est une flavoprotéine. L'enzyme purifiée, d'un poids moléculaire de 197 000, n'a pas la structure de type cytochrome qui a peut-être été perdue au cours des procédés de purification (DOWNEY, 1971).

## 2) Chez les algues

Chez les algues, l'exemple le plus étudié est celui de Chlorella. L'enzyme, hautement purifiée de Chlorella fusca, est décrite comme une protéine d'un poids moléculaire de 500 000 qui possède deux activités enzymatiques : une diaphorase N A D H spécifique et la nitrate réductase proprement dite (ZUMFT et Coll., 1969). Comme pour Neurospora, la présence d'un cytochrome est mise en évidence au niveau de l'enzyme de Chlorella pyrenoidosa (VENNESLAND et JETSCHMANN, 1971). Ce cytochrome est de type b chez la chlorelle "Berlin strain". L'enzyme, comme les autres nitrate réductases, révèle les deux activités signalées : cytochrome c réductase (diaphorase) et nitrate réductase proprement dite (SOLOMONSON et VENNESLAND, 1972). Les résultats de l'analyse des groupements prosthétiques de la nitrate réductase de Chlorella vulgaris, suggèrent que l'enzyme native contient un minimum de deux molécules de chacun des éléments : F A D et molybdène. De plus, celle-ci est composée d'au moins trois sous-unités (SOLOMONSON et Coll., 1975) et possède un poids moléculaire de 356 000. Il est à noter que les poids moléculaires dans le genre Chlorella et en général dans les algues sont très élevés par rapport à ceux signalés chez les champignons ou les plantes supérieures. Ainsi, l'enzyme purifiée de Dunaliella tertiolecta, est une molybdoflavoprotéine soluble, de poids moléculaire supérieur à 500 000 qui est capable de fonctionner comme cytochrome c réductase (LE CLAIRE et GRANT, 1972). Celle de la diatomée Thalassiosira pseudonana, possède un

poids moléculaire de 330 000 et fonctionne comme N A D H, F A D H<sub>2</sub> et M V H nitrate réductases et N A D H cytochrome c réductase (AMY et GARRETT, 1974). Chez Ankistrodesmus braunii, le poids moléculaire du complexe enzymatique est de 475 000 (AHMED et SPILLER, 1976). BAREA et Coll. (1976) proposent le schéma suivant du mécanisme de réduction des nitrates chez Chlamydomonas reinhardii.

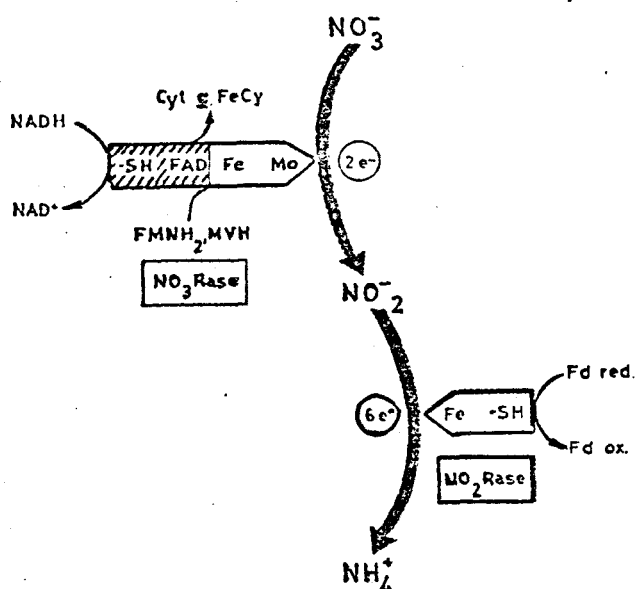


Schéma de la réduction enzymatique des nitrates en ammonium chez Chlamydomonas (selon J.L. BAREA et Coll., 1975).

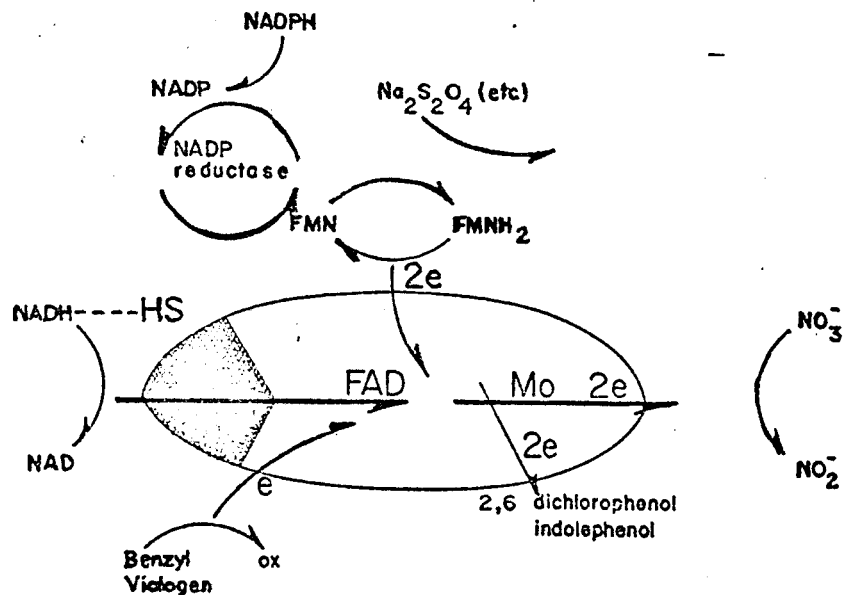
NO<sub>3</sub> Rase = nitrate réductase - NO<sub>2</sub> Rase = nitrite réductase  
Fd = Ferredoxine.

### 3) Chez les plantes supérieures

PANEQUE et Coll. (1965) montrent chez l'épinard que la N A D (P) H nitrate oxydoréductase (EC 1.6.6.2.) est en fait un mélange de deux protéines différentes ; N A D P réductase et nitrate réductase proprement dite, cette dernière étant classée comme F M N H<sub>2</sub> (F A D H<sub>2</sub>) nitrate oxydoréductase (une molybdoprotéine).

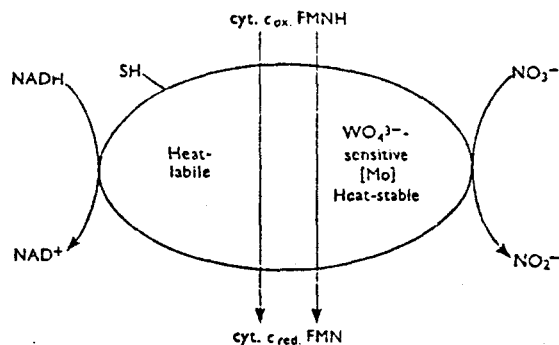
SCHRADER et Coll. (1968) suggèrent que l'enzyme, extraite de feuilles de maïs, de courge et d'épinard, est probablement composée de sous-unités capables d'utiliser aussi bien N A D H que F M N H<sub>2</sub>. Les auteurs pensent que la nitrate réductase, chez les plantes supérieures, doit être désignée : N A D H : nitrate réductase (E.C. 1.6.6.1). De même, ils proposent le schéma suivant représentant la nitrate réductase et les échanges

d'électrons à partir du N A D H.



Représentation schématique de la réduction de nitrates par la nitrate réductase selon L.E. SCHRADER et Coll., 1968. On montre le flux d'électrons à partir du NADH et du NADPH. Le FMN sert d'intermédiaire entre le NADPH ou les réducteurs chimiques et le FAD.

L'enzyme, issue des feuillés de fève, se présente comme deux sous-unités étroitement liées : diaphorase N A D H spécifique et F M N H<sub>2</sub> : nitrate réductase. La diaphorase peut former l'enzyme sulphydrylée qui s'interposerait dans le transfert d'électrons entre N A D H et nitrate (OJI et IZAWA, 1969a). Le nitrate induit les activités N A D H : nitrate réductase, F M N H<sub>2</sub> : nitrate réductase et N A D H : cytochrome c réductase chez l'orge (WRAY et FILNER, 1970). En fait, ces trois activités seraient celles d'un même complexe enzymatique comprenant deux composants de différentes stabilités et mesurables comme N A D H : cytochrome c réductase et F M N H<sub>2</sub> : nitrate réductase ; la réaction générale du complexe permettrait la réduction des nitrates en nitrites avec N A D H comme donneur d'électrons.



Structure du complexe enzymatique selon J.L. WRAY et P. FILNER, 1970. Ce complexe serait formé d'au moins deux composés ayant des stabilités différentes. L'un = NADH cytochrome c réductase, l'autre = FMNH<sub>2</sub> - nitrate réductase. La réaction globale a pour résultat la réduction des nitrates avec NADH comme donneur d'électrons.

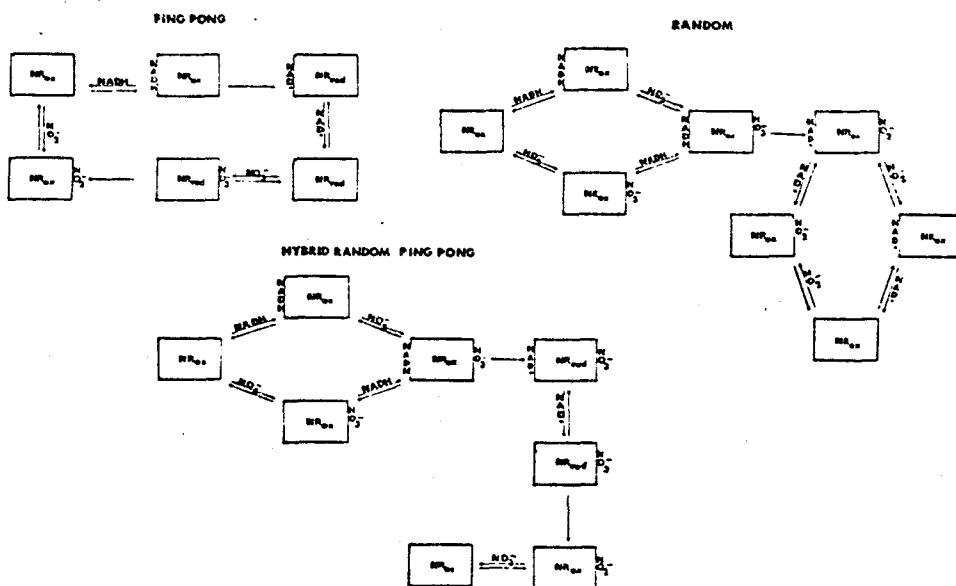
Le complexe enzymatique, chez le maïs, de poids moléculaire 270 000 fonctionne comme N A D H, F M N H<sub>2</sub>, viologènes réduits nitrate réductases, N A D H ferricyanide réductase et N A D H diaphorase (ROUSTAN et Coll., 1974). JOLLY et Coll. (1976) ont pu isoler, des feuilles de soja, les N A D P H et N A D H nitrate réductases de poids moléculaire 220 000 et 330 000 respectivement. Toutes deux présentent une activité cytochrome c réductase.

Plus récemment, NOTTON et Coll. (1977) signalent chez l'épinard la présence d'un cytochrome de type b qui s'engage dans la réduction des nitrates avec N A D H.

Selon HEWITT (1975), nous retiendrons que chez les eucaryotes, toute nitrate réductase présente trois fonctions :

- a) une réduction des nitrates N A D (P) H dépendante
- b) une N A D (P) H déhydrogénase avec cytochrome c, D C P I P, ferricyanure ou sels de tétrazolium comme accepteurs
- c) une activité nitrate réductase avec méthyl-viologène réduit, benzyl viologène réduit, F M N H<sub>2</sub>, F A D H<sub>2</sub> et rarement ferredoxine comme donneurs d'électrons.

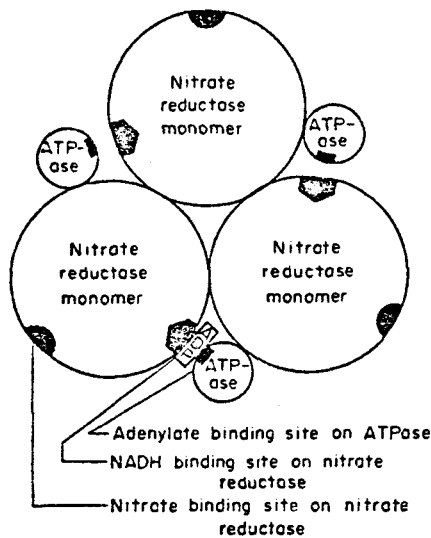
CAMPBELL et SMARRELLI (1978) ont étudié le mécanisme de cinétique enzymatique de la nitrate réductase des plantes supérieures. Ils proposent ainsi un mécanisme "ping pong" dans lequel la nitrate réductase réduite transferreraient les électrons à partir du site N A D H au site nitrate selon le schéma suivant :



Modèle cinétique proposé par W.H. CAMPBELL et J. Jr. SMARRELLI, 1978 pour expliquer la réduction des nitrates.

Des nombreux exemples tirés de la littérature, BUTZ et JACKSON (1977) proposent qu'une nitrate réductase membranaire formée de 4 monomères disposés en tétraédre assurerait le transport des ions nitrates. La réduction et le transport seraient accomplis par le même complexe enzymatique. Une A T Pase serait associée à l'enzyme tétramérique. Le tétramère serait apparemment orienté de telle façon qu'un monomère serait dirigé vers l'extérieur du plasmaleme tandis que les 3 autres seraient situés du côté cytoplasmique.

Cette orientation permettrait le mécanisme réactionnel où le transport et la réduction d'un ion nitrate serait accompagné par le transport de 2 ions nitrates supplémentaires.



Représentation schématique du complexe tétramérique nitrate-réductase - ATPase situé vers la face interne (côté cytoplasmique) de la cellule, selon R.G. BUTZ et W.A. JACKSON, 1977.

## 11) PURIFICATION DE LA NITRATE REDUCTASE

Les premières purifications de nitrate réductase ont été réalisées par EVANS et NASON (1953) à partir du Soja et de Neurospora crassa. Le procédé utilisé comprenant une adsorption sur gel phosphate de calcium et des précipitations par le sulfate d'ammonium, n'a fourni que des préparations enzymatiques partiellement purifiées (environ 70 fois) avec des bas rendements (de l'ordre de 10 %). L'introduction de nouvelles méthodes, telles que la gel filtration, la chromatographie sur hydroxylapatite ou sur D E A E cellulose, la précipitation par les sulfates de protamine et de streptomycine dans les procédés de purification n'ont permis que l'obtention de fractions faiblement purifiées, avec des rendements toujours faibles. C'est ainsi que l'enzyme fut purifiée 130 fois chez l'épinard (PANEQUE et Coll., 1965), 75 fois chez le maïs (ROUSTAN et Coll., 1974), 3 fois chez le soja (JOLLY et Coll., 1975), 487 fois chez Neurospora crassa (GARRETT et NASON, 1969), 250 fois chez Aspergillus nidulans (DOWNEY, 1971), 30 fois chez Dunaliella tertiolecta (LE CLAIRE et GRANT, 1972), 40 à 230 fois chez Chlorella pyrenoidosa (SCHLOEMER et GARRETT, 1973), 200 fois chez Thalassiosira pseudonana (AMY et GARRETT, 1974) et 30 fois chez Ankistrodesmus braunii (AHMED et SPILLER, 1976).



La difficulté majeure à purifier l'enzyme semble provenir d'une part de la nature très instable de l'enzyme et de la difficulté de trouver un procédé rapide et spécifique de purification (HAGEMAN et HUCKLESBY, 1971). Le problème fut résolu grâce aux applications de la chromatographie d'affinité. En effet, de nombreuses enzymes qui possèdent un site nucléotidique appelé "dinucleotide fold" peuvent être identifiées et isolées par passage sur bleu dextran Sépharose (THOMPSON et Coll., 1975).

De même, certaines enzymes à N A D H, N A D P et A T P se lient au bleu dextran Sépharose et peuvent être ensuite éluées spécifiquement par de faibles concentrations de leurs coenzymes nucléotidiques (WILSON, 1976). WILSON (1976) conclut que toutes les "enzymes à nucléotides" réagissent avec le bleu cibacron F<sub>3</sub>GA, identifié comme étant le chromophore du bleu dextran (BOHME et Coll., 1972 ; THOMPSON et Coll., 1976), ceci se produit probablement du fait de la similitude de structure qui existe entre le chromophore et les nucléotides.

Le complexe N A D H nitrate réductase de Chlorella vulgaris, déjà purifié 640 fois (SOLOMONSON et Coll., 1975) a pu ainsi être purifié 930 fois avec un rendement de 60 % (SOLOMONSON, 1975). Dans ce cas, l'enzyme, liée au bleu dextran sépharose, est éluée avec un gradient linéaire de 0 à 100  $\mu$ M de N A D H.

Employé comme seule étape de purification, le passage sur bleu dextran sépharose ou sur bleu sépharose a permis de purifier 325 fois l'enzyme à N A D (P) H du soja (CAMPBELL, 1976a), 150 fois celle de la courge (CAMPBELL et SMARRELLI, 1978) et 140 fois celle du scutellum de maïs (CAMPBELL, 1978) avec les rendements respectifs de 81, 50 et 20 %.

Utilisé comme étape finale, il a permis de purifier 2600 fois l'enzyme d'épinard (NOTTON et Coll., 1977) ; 630 fois celle de maïs (CAMPBELL et SMARRELLI, 1978) ; 224 et 182 fois celles de Chlorella variegata (HIPKIN et Coll., 1979).

Les enzymes extraites de Dunaliella parva sont purifiées respectivement 145 fois et 110 fois par passages sur N A D H - sépharose (HEIMER et Coll., 1976).

### III) NITRATE REDUCTASE ET SYSTEME D'INDUCTION. INFLUENCE DU SUBSTRAT

#### A) NATURE INDUCTIBLE DE L'ENZYME

La nature inductible de la nitrate réductase fut mise en évidence, par EVANS et NASON (1953), chez Neurospora crassa. En effet, ces auteurs constatent la présence de l'enzyme dans du mycélium cultivé sur nitrates ou nitrites mais non pas dans celui cultivé sur ammonium ou alanine. Des études similaires, chez le soja, n'ont toutefois pas abouti à la même conclusion (NASON et EVANS, 1953).

Chez le chou-fleur, la nature de la source azotée détermine l'apparition de l'activité enzymatique (CANDELA et Coll., 1957). Plus tard, AFRIDI et HEWITT (1964) confirment la nature inductible de l'enzyme. Cependant, la notion d'induction enzymatique, employée ici, signifie que l'augmentation d'activité observée résulte de la réponse spécifique à un stimulus inducteur tel que l'apport d'un substrat, d'un analogue ou encore d'un constituant prosthétique, ceci n'impliquant pas forcément la synthèse protéique.

L'apparition de l'activité nitrate réductase, associée à la synthèse de l'enzyme in vivo, fut admise grâce à l'emploi d'inhibiteurs de la synthèse protéique. De nombreux chercheurs ont pu montrer que des inhibiteurs de la transcription des mR N A telle la 6-méthyl puriné et l'actinomycine D, ou de la traduction des mR N A comme le chloramphénicol, la cycloheximide et la puromycine, inhibent aussi l'activité nitrate réductase chez différents végétaux (BEEVERS et Coll., 1965 ; SHEN, 1969 ; FERRARI et VARNER, 1969 ; SMITH et THOMPSON, 1971a et b ; OAKS et Coll., 1972 ; SUBRAMANIAN et SORGER, 1972b ; SLUITERS-SCHOLTEN, 1973 ; BUCZEK, 1976 ; SASAKAWA et YAMAMOTO, 1977).

INGLE (1968) étudie les synthèses d'acides nucléiques et de protéines durant l'induction de la nitrate réductase dans les cotylédons de radis. Ces résultats suggèrent l'éventuelle formation d'une protéine autre que l'enzyme lors de la synthèse protéique requise pour l'induction. Il pourrait s'agir d'un effecteur nécessaire à l'activité enzymatique. Seuls les travaux de ZIELKE et FILNER (1971) prouvent de manière probante que l'activité nitrate réductase, décelée chez le tabac, représente bien l'activité d'une protéine synthétisée de novo après l'addition des nitrates.

L'existence de mutants peut plaider en faveur de l'induction de la synthèse enzymatique. Ainsi, l'induction de la nitrate réductase et de la

T P N H cytochrome c réductase ne survient, chez les mutants de Neurospora crassa que, si ceux-ci sont cultivés en présence d'uracile, d'adénine, d'arginine ou d'histidine qui constituent leurs exigences respectives. Ces résultats indiquent que la synthèse protéique est nécessaire pour l'induction des deux enzymes (SORGER, 1965).

## B) REGULATION PAR LES NITRATES

### 1) Influence du substrat

L'apparition de l'activité de la nitrate réductase, après l'addition de son substrat nitrate, a été confirmée chez les végétaux supérieurs (CHAMPIGNY 1963 ; WALLACE et PATE, 1965 ; HAGEMAN et FLESCHER, 1960 ; BEEVERS et Coll., 1965 ; SHEN, 1969 ; JOY, 1969 ; BEHREND et MATELES, 1975 ; AMINDARI et Coll., 1978).

Dans une suspension cellulaire de tabac, l'induction nécessite une source exogène de nitrates (HEIMER et FILNER, 1971 ; FERRARI et Coll., 1973 ; FILNER, 1966). L'activité nitrate réductase chute rapidement lorsque son substrat est retiré du milieu d'induction chez le maïs (ASLAM et OAKS, 1975 ; OAKS et Coll., 1972), chez le tabac (HEIMER et FILNER, 1971) et chez Neurospora (SUBRAMANIAN et SORGER, 1972a). Toutes ces observations soulignent le rôle fondamental joué par les nitrates dans l'induction enzymatique.

Il faut toutefois signaler l'induction enzymatique par le chloramphénicol chez des plantules de riz (SHEN, 1972 ; SHEN et Coll., 1976). L'enzyme, ainsi induite, utilise préférentiellement N A D P H comme donneur d'électrons. Cependant, l'induction par les nitrites a été aussi signalée (CHROBOCZEK-KELKER et FILNER, 1971). Dans des racines isolées de pois incubées en présence de nitrites, certains nitrites sont oxydés en nitrates qui sont responsables de l'induction enzymatique (SAHULKA et LISA, 1978).

### 2) Nitrates et induction maximale

Si le nitrate est essentiel pour l'apparition de la nitrate réductase, sa concentration dans le milieu de culture est aussi un facteur déterminant pour obtenir l'induction maximale. Ainsi, le maximum d'induction est enregistré avec 3 mM de nitrates chez Chlorella vulgaris (SMITH et THOMPSON, 1971b), 10  $\mu$ M chez des racines isolées d'orge (SMITH et THOMPSON, 1971a), 10 mM dans les

pointes de racines de maïs (ASLAM et OAKS, 1975) et 100 mM chez des plantules de concombre (BUCZEK, 1976). La formation de l'enzyme de Neurospora est inhibée, par contre, avec des doses élevées de nitrates (KINSKY, 1961).

La forme, sous laquelle est fourni le nitrate, joue aussi un rôle important.  $\text{KNO}_3$  induit une absorption et une accumulation des nitrates, ainsi qu'une activité nitrate réductase plus élevées que  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  chez des plantules d'orge (BLEVINS et Coll., 1978a) et que  $\text{NaNO}_3$  dans les feuilles de plantules de blé (BLEVINS et Coll., 1978b). Les auteurs mettent l'accent sur le rôle critique tenu par les ions  $\text{K}^+$  dans l'absorption et le transport des nitrates, ce qui a été déjà précisé par BLEVINS et BARNETT (1975).

### 3) Existence d'une période de latence

En général, il existe une période de latence entre l'induction enzymatique et l'addition de nitrates dans le milieu de culture. Celle-ci varie en durée selon les espèces. Elle est de 45 minutes chez Neurospora (KINSKY, 1961), 30 minutes chez le radis (BEEVERS et Coll., 1965), 6 heures chez le tabac (FILNER, 1966), 8 minutes chez Aspergillus (COVE, 1966), 30 à 40 minutes chez le riz (SHEN, 1969), 30 à 60 minutes chez le maïs (OAKS et Coll., 1972), 3 heures chez le soja (OAKS, 1974), et 48 heures chez Paul's Scarlet Rose (MOHANTY et FLETCHER, 1976).

### 4) Absorption et réduction des nitrates-compartmentation intracellulaire

Dans les suspensions cellulaires d'érable (YOUNG, 1973), de Paul's Scarlet Rose (JONES et Coll., 1976) et de soja (HAHLBROCK et Coll., 1974), l'activité nitrate réductase et la consommation des nitrates évoluent en parfaite corrélation, la chute de l'activité enzymatique coïncidant avec l'épuisement total des nitrates. Ces résultats indiquent l'existence d'une relation directe entre l'absorption des nitrates et l'induction enzymatique. NEYRA et HAGEMAN (1975) démontrent, avec des racines isolées de maïs, que l'induction de l'enzyme est fonction du temps et qu'elle dépend de l'absorption des nitrates. Leurs résultats appuient le concept que le taux d'induction est régulé par l'absorption des nitrates et que l'augmentation de l'absorption entraîne l'augmentation des taux d'induction. Il reste à savoir néanmoins quelle relation existe entre nitrates absorbés, nitrates réduits et induction enzymatique.

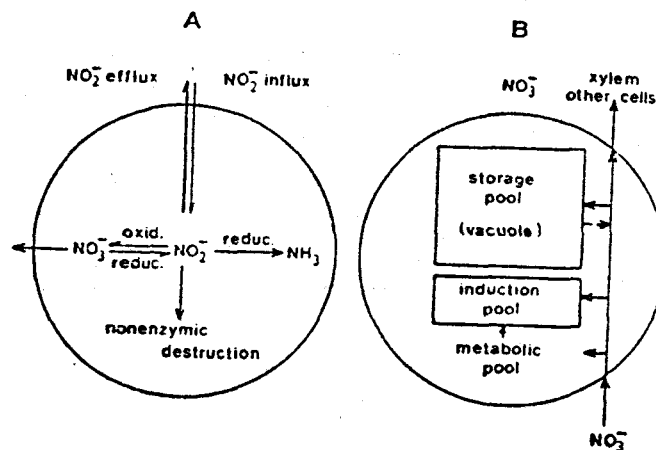
Dans des tissus de radis et de maïs, l'induction de l'enzyme est approximativement proportionnelle à la quantité de nitrates présente dans les tissus (BEEVERS et Coll., 1965). Tous les nitrates absorbés par des racines isolées d'orge ne sont pas réduits après différents temps d'incubation (SMITH et THOMPSON, 1971a). Une partie d'entre-eux s'accumule à l'intérieur des tissus. Après une période de latence de 25 minutes, l'activité nitrate réductase apparaît, augmente rapidement, atteint son maximum après 3 heures et demeure stationnaire chez Neurospora. SUBRAMANIAN et SORGER (1972a) estiment que la phase stationnaire ne résulte pas de la perte d'induction dans le milieu de culture car l'addition supplémentaire de nitrates durant cette phase ne provoque pas d'augmentation d'activité. De même, OAKS et Coll. (1972) pensent que la chute d'activité nitrate réductase, dans les pointes de racines de maïs, n'est pas due à une limitation en nitrates car 70 % de ceux-ci subsistent encore dans le milieu de culture. Le transfert des racines dans un milieu neuf ne modifie pas non plus la quantité d'enzyme.

X Lorsque des cellules de tabac totalement induites et renfermant beaucoup de nitrates, sont transférées sur un milieu dépourvu de nitrates, l'activité nitrate réductase diminue, bien que le contenu interne en nitrates soit toujours élevé. Ceux-ci sont progressivement assimilés. HEIMER et FILNER (1971) interprètent ces résultats en considérant que la plupart des nitrates accumulés dans les cellules sont disponibles comme substrat pour l'enzyme mais que seule, une faible quantité peut assurer la fonction d'inducteur. En d'autres termes, il existerait deux "pools" <sup>ou</sup> de compartiments de nitrates intracellulaires, l'un petit et de courte vie appelé "pool" inducteur, et l'autre grand et de longue vie nommé "pool" substrat. Les nitrates du "pool" substrat ne peuvent combler le pool inducteur. FERRARI et Coll. (1973) remarquent que des cellules de tabac, contenant des nitrates et parfaitement induites, cessent de produire des nitrites après une heure d'incubation sous condition anaérobie. Cet arrêt de production des nitrites n'est pas attribué à une inactivation du système réducteur des nitrates, ni même à la sortie des nitrates des cellules. Les auteurs proposent, comme HEIMER et FILNER (1971), l'existence d'un petit "pool" métabolique et un grand "pool" de stockage des nitrates à l'intérieur des cellules. La production des nitrites s'arrête lorsque le "pool" métabolique est totalement dépourvu de nitrates. FERRARI et Coll. (1973) généralisent, chez les plantes supérieures, cette présence des deux "pools", dont les propriétés varient selon les espèces et

leurs conditions physiologiques propres. Le "pool" métabolique, accessible au système réducteur dans lequel le nitrate est converti en nitrite sous conditions anaérobies, serait cytoplasmique tandis que le "pool" de stockage, inaccessible au système réducteur, serait vacuolaire.

Le dosage des nitrites, formés sous conditions anaérobies, permet de mesurer le contenu du "pool" métabolique (ASLAM et OAKS, 1975). ASLAM et OAKS (1976) mettent en évidence une relation linéaire entre l'activité nitrate réductase et le contenu du "pool" métabolique.

SAHULKA (1978) distingue en plus des deux "pools" précédemment définis, un "pool" inducteur spécial chez les cellules des plantes. SAHULKA et LISA (1978) proposent le diagramme suivant de la compartimentation des nitrates chez des cellules de pois :



A.- Facteurs qui influencent le contenu en nitrates et nitrites de cellules de racines de pois exposés à des nitrites exogènes.

B.- Diagramme représentant les compartiments cellulaires des nitrates dans les cellules de racines de pois.

Selon J. SAHULKA et L. LISA, 1975

### 5) Absorption et transport des nitrates-perméases

Chez des plantules d'orge, l'absorption des nitrates se déroule en deux phases : une phase initiale de latence et une phase accélérée (RAO et RAINS, 1976). L'ATP ou d'autres intermédiaires à haut contenu énergétique seraient les sources d'énergie pour l'absorption des nitrates.

Les deux phases de l'absorption sont observées avec des racines isolées de maïs (NEYRA et HAGEMAN, 1975), des plantules de maïs (JACKSON et Coll., 1973), des cellules de tabac (HEIMER et FILNER, 1971), des plantules de riz (SASAKAWA et YAMAMOTO, 1978). Le déroulement de la phase accélérée dépend de la synthèse protéique continue (JACKSON et Coll., 1973). L'hypothèse que la synthèse d'une protéine spécifique transporteur des nitrates doit intervenir, est ainsi proposée sans toutefois écarter que l'induction de la nitrate réductase soit nécessaire à cette phase. Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par NEYRA et HAGEMAN (1975). L'induction d'une perméase favorisant l'entrée des nitrates, est révélée chez les cellules de tabac et d'érable, chez les champignons Penicillium chrysogenum, Aspergillus nidulans, et Neurospora crassa (pour références, voir HEWITT, 1975).

Selon BUTZ et JACKSON (1977), le même complexe nitrate réductase assurerait le transport et la réduction des nitrates. Le transport des nitrates, des racines aux feuilles joue un rôle régulateur beaucoup plus grand que la teneur en nitrates des feuilles, dans le contrôle de l'activité nitrate réductase chez le maïs (SHANER et BOYER, 1976). L'assimilation des nitrates, dans les feuilles de maïs, nécessite un apport continu de ceux-ci à travers le xylème (JACKSON et Coll., 1973 ; SHANER et BOYER, 1976). Ceci confirme l'importance du transfert de la racine à la partie aérienne où la réduction des nitrates a lieu.

BEN ZIONI et Coll. (1970 ; 1971) ont conçu un mécanisme pour expliquer comment la réduction des nitrates dans les plantules peut influencer l'absorption des nitrates par les racines. Lorsque la quantité de nitrates est réduite dans la pousse, une quantité équivalente de malate est produite. Une partie du malate synthétisé migre vers le système racinaire sous forme de malate de potassium ; elle est ensuite oxydée en carbonate de potassium qui s'échange avec les nitrates du milieu d'incubation. Ainsi, la réduction des nitrates dans la pousse contrôle l'absorption par la racine.

#### IV) NITRATE REDUCTASE ET NUTRITION AZOTEE - REGULATION METABOLIQUE

##### A) ROLE DE L'ENZYME DANS LA NUTRITION AZOTEE

Il est admis, depuis les premiers travaux de EVANS et NASON (1953) sur les plantes supérieures et NASON et EVANS (1953) sur Neurospora crassa, que la nitrate réductase est la première enzyme qui intervient dans l'assimi-

lation des nitrates et catalyse leur réduction en nitrites. L'enzyme responsable de la réduction ultérieure des nitrites, la nitrite réductase, a été obtenue à partir de champignons, d'algues et de plantes supérieures (KESSLER, 1964). Si les nitrites ont pu être caractérisés in vivo dans la séquence de la réduction des nitrates en ions ammonium, l'existence d'autres intermédiaires est très contestée (CRESSWELL et Coll., 1965 ; BEEVERS et HAGEMAN, 1969 ; KESSLER, 1964), notamment l'hydroxylamine. Selon les travaux évoqués par SANDERSON et COCKING (1964a), les nitrates sont assimilés pour être transformés en ions ammonium (utilisation de composés marqués à l'azote  $^{15}\text{N}$ ). Les nitrates et l'ammonium ont le même effet sur la production d'acides aminés libres et de protéines. L'ammonium serait incorporé directement à l'intérieur des substances organiques azotées par le glutamate et la glutamine. La glutamate déshydrogénase est signalée être une enzyme clé dans l'incorporation de l'ammonium sous forme organique et sa distribution aux autres acides aminés ferait intervenir des aminotransférases (JOY, 1969). La glutamine synthétase ou la glutamate déshydrogénase par l'incorporation d'ammonium permettent la production de glutamine ou du glutamate (MIFLIN et LEA, 1976).

## B) REGULATION DE LA NITRATE REDUCTASE

### 1) Régulation par l'ammonium et autres substances azotées

#### a) l'ammonium

Les données fournies par la littérature, se rapportant à l'étude des effets de l'ammonium sur la formation et l'activité de la nitrate réductase, apparaissent contradictoires. Chez les algues Chlorella vulgaris (SMITH et THOMPSON, 1971b), Chlorella fusca (LOSADA et Coll., 1970), Chlamydomonas reinhardi (HERRERA et Coll., 1972) et Thalassiosira pseudonana (AMY et GARRETT, 1974) l'ammonium réprime la formation de la nitrate réductase. Dans la plupart des cas, il inactive l'enzyme préexistante induite par les nitrates. L'inactivation est rendue réversible après le retrait de l'ammonium du milieu de culture. LOSADA et Coll. (1970) concluent que l'ammonium est le répresseur nutritionnel du système entier de la réduction des nitrates chez Chlorella fusca. Celui-ci n'a toutefois aucun effet sur l'activité de la nitrate réductase in vitro (SMITH et THOMPSON, 1971b ; AMY et GARRETT, 1974).



Chez les champignons Neurospora crassa (KINSKY, 1961 ; SUBRAMANIAN et SORGER, 1972a, SORGER et DAVIES, 1973 ; DANTZIG et Coll., 1978), Aspergillus nidulans (COVE, 1966) et Rhodotorula glutinis (ITO et SUZUKI, 1978), il réprime la synthèse de l'enzyme. Chez Neurospora crassa, l'enzyme complètement induite est rapidement inactivée en présence d'ammonium (SUBRAMANIAN et SORGER, 1972b).

Ainsi, si l'ammonium est à la fois un répresseur et un inactivateur de l'enzyme chez les algues et les champignons, il en est tout autrement chez les plantes supérieures où le problème demeure obscur.

L'ammonium ou un produit de son métabolisme peut exercer un effet direct sur la synthèse de la nitrate réductase dans des racines isolées d'Orge (SMITH et THOMPSON, 1971a). Toutefois, l'inhibition observée n'est que partielle. La répression de la formation de l'enzyme est montrée chez Lemna minor (JOY, 1969) et dans une suspension cellulaire de tabac (BEHREND et MATELES, 1975). L'induction enzymatique, dans une suspension cellulaire de soja, est inhibée par une dose de 20 mM de sulfate d'ammonium alors que celle-ci n'est pas retardée par une dose de 2 mM (OAKS, 1974).

Le phénomène de "feedback" ou rétroinhibition par l'ammonium est signalé par SHEN (1969) chez le riz. Par contre, dans des racines de maïs, l'ammonium ne provoque pas l'inhibition de l'induction de l'enzyme, et n'affecte pas sa stabilité in vivo (OAKS et Coll., 1977). De même, dans une suspension cellulaire d'Ipomoea, son apport à des cellules induites ne supprime pas la synthèse ultérieure de l'enzyme. La quantité de nitrate réductase détectée dans des cellules cultivées en présence d'ammonium représente près de 25 % de celle des cellules induites au maximum (ZINK et VELIKY, 1977).

Dans les suspensions cellulaires de soja (BAYLEY et Coll., 1972), de Paul's Scarlet Rose (MOHANTY et FLETCHER, 1976) et les apex des parties aériennes du pois (SIHAG et Coll., 1978), l'activité nitrate réductase est plus élevée en présence d'ammonium dans le milieu de culture. Selon MOHANTY et FLETCHER (1976), ce composé stimulerait la synthèse de l'enzyme. Selon SIHAG et Coll. (1978), il augmenterait l'activité enzymatique en réduisant la dégradation de l'enzyme et en améliorant sa stabilité in vivo. De plus, ces auteurs suggèrent qu'une ou des protéines induites par l'ammonium joueraient un rôle de régulation dans le contrôle du contenu enzymatique.

Selon SAHULKA (1977), il est possible d'obtenir les différents effets de l'ammonium dans les racines isolées du pois en modifiant les conditions expérimentales.

b) les acides aminés, leurs analogues et leurs dérivés

Les cellules de tabac, cultivées en présence d'hydrolysate de caséine comme seule source d'azote, ne synthétisent pas la nitrate réductase. L'alanine, l'asparagine, la glycine, la méthionine, la proline, la thréonine, la valine, l'aspartate, le glutamate, l'histidine et la leucine sont des répresseurs de la formation de l'enzyme dans ces cellules. Par contre, l'arginine et la lysine agissent comme dérèpresseurs. La cystéine et l'isoleucine sont également des dérèpresseurs excepté en présence de méthionine ou d'alanine (FILNER, 1966).

L'activité nitrate réductase, d'une suspension cellulaire de soja, est plus importante lorsque la L-glutamine, la L-alanine ou la putrescine sont présentes dans le milieu de culture (BAYLEY et Coll., 1972). Chez Chlorella vulgaris, l'urée, l'aspartate, le glutamate, la leucine, l'histidine, l'arginine, la citrulline, l'ornithine et la lysine inhibent l'augmentation d'activité enzymatique induite in vivo par les nitrates, alors que leurs effets sont nuls sur l'activité enzymatique in vitro (SMITH et THOMPSON, 1971b). Les auteurs pensent que les inhibitions dues à la leucine et à l'histidine résultent d'effets secondaires sur la croissance. Celles provoquées par l'urée, l'arginine et la citrulline proviennent de leur conversion en ammonium. Un mélange d'acides aminés de composition voisine de celle de l'endosperme de maïs, inhibe partiellement l'induction de la nitrate réductase dans les racines. L'inhibition devient plus sévère lorsque la glutamine et l'asparagine figurent dans ce mélange. OAKS et Coll. (1977) proposent que tous ces acides aminés interviennent au niveau de l'une des phases des procédés d'induction, c'est-à-dire sur l'absorption ou la distribution des nitrates ou plus directement sur la synthèse même de l'enzyme, sans affecter le "turnover" de l'enzyme.

Certains acides aminés, comme la thréonine, empêchent l'activité enzymatique alors que d'autres, dont l'arginine, abolissent l'action inhibitrice des précédents (BEHREND et MATELES, 1975). RADIN (1976) conclut que la régulation de l'activité nitrate réductase, chez le coton, est un processus complexe engageant des interactions entre acides aminés.

La L canavanine, analogue de l'arginine, inhibe l'apparition de la nitrate réductase dans des racines de maïs. L'inhibition devient réversible en présence d'arginine. ASLAM et Coll. (1978) considèrent que la canavanine s'incorpore dans la protéine enzymatique ce qui entraîne la formation d'une protéine inactive.

## 2) Régulation par la lumière et les sources carbonées - Schémas possibles de régulation métabolique

Des extraits de plantes maintenues à l'obscurité, renferment peu de nitrate réductase. EVANS et NASON (1953) concluent qu'une teneur limitée de D P N réduit photosynthétiquement, diminue la réduction des nitrates. HAGEMAN et FLESHER (1960) constatent que les extraits de plantes vertes réduisent d'autant moins les nitrates qu'ils sont soumis à des périodes d'obscurité prolongées. Les plants de tomate, renferment des quantités de nitrate réductase qui varient en fonction de l'éclairement reçu (SANDERSON et COCKING, 1964a).

L'induction de la nitrate réductase ne se produit pas à l'obscurité dans des feuilles d'orge (ASLAM et Coll., 1973 ; ASLAM et Coll., 1976) et dans des plantules de riz dont l'endosperme a été enlevé (SASAKAWA et YAMAMOTO, 1977). Le glucose ou le saccharose peuvent remplacer la lumière. Le glucose permet aussi l'induction de l'enzyme dans des feuilles épuisées en sucres (ASLAM et Coll., 1973). L'addition au milieu d'essai in vivo de glucose, de fructose 1-6 diphosphate ou de certains intermédiaires du cycle de Krebs augmente visiblement l'activité enzymatique de feuilles de soja placées pendant des périodes prolongées à l'obscurité et à température élevée (NICHOLAS et Coll., 1976a).

L'induction de l'enzyme est plus importante dans des racines isolées du pois alimentées en saccharose (SAHULKA et LISA, 1978). D'après ces résultats, il apparaît que la lumière et les sucres ou les produits de leur métabolisme influent sur l'induction de la nitrate réductase. Comment s'exerce cette action ? Chez le radis et le maïs, la lumière provoque l'induction enzymatique indirectement en augmentant la perméabilité des tissus, ce qui accroît l'absorption des nitrates (BEEVERS et Coll., 1965).

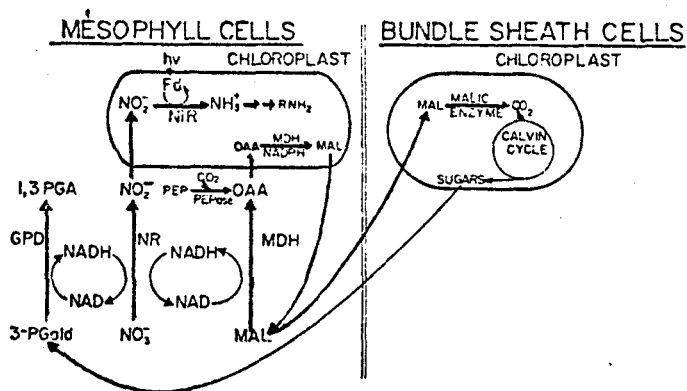
Dans les feuilles de maïs, la lumière stimule le développement des polyribosomes, en même temps qu'elle augmente la nitrate réductase (TRAVIS et Coll., 1970), ce qui suggère que la lumière intervient en modifiant la synthèse protéique.

TRAVIS et KEY (1971) confirment ce résultat et montrent que la lumière active aussi la synthèse protéique dans les feuilles âgées. La lumière peut modifier l'induction de l'enzyme par l'intervention d'un phytochrome (JONES et SHEARD, 1975 ; JOHNSON, 1976). Outre ces effets plus ou moins directs sur la formation de l'enzyme, la lumière peut agir aussi par la photosynthèse conduisant à la formation des sucres. Ces sucres et leurs dérivés métaboliques peuvent ensuite contrôler l'induction de l'enzyme de différentes manières. Selon les suggestions de SASAKAWA et YAMAMOTO (1977) et de SAHULKA et LISA (1978) ils peuvent fournir l'énergie pour la synthèse protéique ou le transport actif des nitrates dans les cellules, procurer des squelettes carbonés pour la molécule enzymatique ou encore élaborer le pouvoir réducteur pour l'activité enzymatique in vivo.

Des intermédiaires du cycle de Krebs ou du cycle glycolytique par la formation de N A D H apporte l'énergie nécessaire à l'activité de la nitrate réductase (NICHOLAS et Coll., 1976a) . De même, SASAKAWA et YAMAMOTO (1977) suggèrent que l'un des effets de la lumière (ou du saccharose qui peut la remplacer) est de fournir l'énergie et le pouvoir réducteur par la photosynthèse.

Selon ASLAM et Coll. (1973) l'un des principaux effets de la lumière serait l'apport de composés photosynthétiques favorisant la respiration, puis les procédés d'induction.

Le rôle tenu par la photosynthèse dans l'élaboration du pouvoir réducteur et de l'énergie est aussi proposé par BEEVERS et HAGEMAN (1969), TRAVIS et Coll. (1970) et KLEPPER et Coll. (1971). Selon KLEPPER et Coll. (1971) les sucres, migrant des chloroplastes vers le cytoplasme, pourraient être la source première d'énergie et l'oxydation du glycéraldéhyde -3- phosphate, la source de N A D H in vivo. Selon NEYRA et HAGEMAN (1976), l'oxydation du malate serait l'une des sources principales de N A D H pour la réduction des nitrates, in situ, dans des feuilles de maïs. Ils proposent le schéma suivant pour expliquer l'assimilation des nitrates dans les feuilles de maïs (NEYRA et HAGEMAN, 1978) :

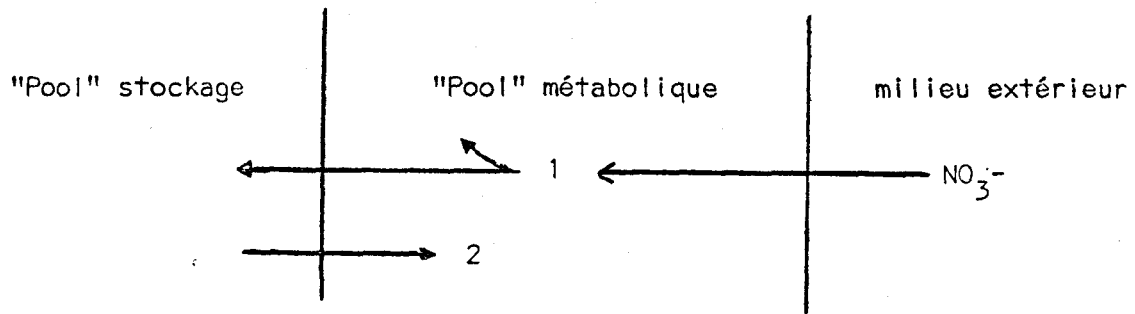


Assimilation des nitrates dans les feuilles de maïs selon C.A. NEYRA et R.H. HAGEMAN, 1975.

La lumière, l'ATP et la respiration constituent ensemble un mécanisme de régulation pour la réduction des nitrates en nitrites dans les feuilles vertes (SAWHNEY et Coll., 1971a et b). La lumière affecterait la réduction des nitrates en augmentant l'ATP cytoplasmique par la deshydrogénation des phosphates formés dans les chloroplastes durant la photosynthèse et transportés dans le cytoplasme. L'adénylate ainsi formé dans le cytoplasme serait transféré aux mitochondries. Dans ces conditions, le NADH devient disponible pour la réduction des nitrates.

Dans les tissus ne réalisant pas la photosynthèse, le fait que le nitrate modifie la consommation d'oxygène, laisse supposer que le métabolisme respiratoire fournit les donneurs d'électrons pour la réduction des nitrates (BEEVERS et HAGEMAN, 1969).

Le glucose peut être un facteur important dans le contrôle de la stabilité in vivo de l'enzyme ou de son taux de synthèse, en modifiant la distribution des nitrates à l'intérieur des fragments de racine de maïs (ASLAM et OAKS, 1975). ASLAM et Coll. (1976) proposent deux mécanismes intervenant dans la régulation du "pool" métabolique des nitrates ; un transfert à partir du "pool" stockage qui requiert la lumière et un transfert à partir du milieu extérieur nécessitant la lumière ou le glucose. Ils présentent le schéma suivant de la distribution des nitrates dans les feuilles d'orge



1 : nécessite la lumière ou le glucose

2 : nécessite la lumière

SAHULKA et LISA (1978) indiquent que les sucres, en plus des nombreux effets indirects qu'ils exercent sur l'induction de l'enzyme, peuvent aussi influencer directement la synthèse de la nitrate réductase comme conducteurs ou dérépresseurs de cette synthèse.

### 3) Influence de la nutrition minérale

La déficience en calcium diminue l'activité de la nitrate réductase, apparemment par répression de la synthèse de l'enzyme due à l'accumulation des nitrites dans les plantules de blé. PAULSEN et HARPER (1968) indiquent que le calcium intervient dans le transport des nitrites à l'intérieur des cellules et non sur l'induction ou l'activité des enzymes nitrate et nitrite réductases.

OJI et IZAWA (1969b) montrent que les cations univalents sont activateurs de la formation des nitrate et nitrite réductases chez le riz.  $K^+$  est plus efficace que  $Na^+$  ou  $Rb^+$ .

De même, PFLUGER et WIEDEMANN (1977) montrent que l'induction de la nitrate réductase par les nitrates, dépend de la présence de certains cations, et que dans les conditions naturelles  $K^+$  est absolument nécessaire.

## M A T E R I E L   E T   M E T H O D E S

### 1) LA SUSPENSION CELLULAIRE

#### A) LE MATERIEL BIOLOGIQUE

La suspension cellulaire utilisée est celle de Silene alba (MILLER) E.H.L. Krause, isolée par DUBOIS et BOURIQUET (1974). Elle est cultivée dans des fioles d'attaque à fond plat de 500 ml (DUBOIS, 1975) renfermant 200 ml de milieu. Ces fioles sontensemencées par des cellules âgées de 14 jours à la concentration initiale de 15 mg/ml, puis placées, inclinées à 45° sur un agitateur rotatif tournant à la vitesse de 70 tours/mn. La suspension cellulaire est cultivée à la température de 25°C et en lumière continue (environ 500 lux).

Ces conditions ont été modifiées pour l'obtention du matériel cellulaire en vue de la purification d'enzyme.

Environ 20 grammes de cellules sont alorsensemencées par fioles de 1 litre renfermant 500 ml de milieu. Ces fioles sont placées sur une table d'agitation dans les conditions habituelles de lumière et de température.

#### B) LE MILIEU NUTRITIF

Le milieu de base employé est celui préconisé par LESCURE (1969), il contient les éléments suivants :

##### 1) minéraux

. macroéléments :  $\text{Ca} (\text{NO}_3)_2, 4 \text{H}_2\text{O}$  : 290 mg/l ;  $\text{KNO}_3$  : 1960 mg/l ;  $\text{KCl}$  : 65 mg/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 500 mg/l ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$  : 97 mg/l ;  $\text{Mg SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 360 mg/l.

. microéléments :  $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 2,80 mg/l ;  $\text{Na}_2 \text{EDTA}$  : 3,72 mg/l ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  : 1,5 mg/l ;  $\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$  : 4,5 mg/l ;  $\text{Zn SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 1,5 mg/l ;  $\text{KI}$  : 0,75 mg/l.

## 2) Organiques

- . Saccharose :  $20 \cdot 10^3$  mg/l
- . Substances de croissance : Thiamine, HCl (B<sub>1</sub>) 1 mg/l et acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) 1mg/l.

Le milieu est ajusté à pH 5,8 et autoclavé 25 minutes à 120°C.

Dans certains cas, nous avons été amenés à modifier ce milieu de base :

a) les nitrates ont été fournis uniquement sous forme de  $\text{KNO}_3$  et le calcium est alors introduit sous forme de  $\text{CaCl}_2$  (BRASSART, 1976).

b) lorsque les nitrates ont été employés à des concentrations inférieures à celles du milieu de base ( $\text{KNO}_3$ ), celui-ci a été rééquilibré par un apport de KCl (BRASSART, 1976).

c) le milieu a été parfois complété avec du molybdène, sous forme  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

## C) MESURE DE LA CROISSANCE

### 1) Poids de matière fraîche (M F)

Les cellules sont pesées, après filtration sous vide de la suspension sur un entonnoir Büchner garni d'un papier filtre. Le résultat est alors exprimé en grammes pour l'ensemble de la suspension.

### 2) Poids de matière sèche (M S)

Il est déterminé après dessiccation dans une étuve à 100°C pendant 48 heures d'une partie aliquote de la suspension. La croissance est alors exprimée en grammes de matière sèche pour l'ensemble de la culture.



## 11) DOSAGE DE L'AZOTE NITRIQUE

On utilise la méthode au salicylate de sodium (RODIER, 1971) : les nitrates donnent, en présence de salicylate de sodium, du paranitrosalicylate de sodium, coloré en jaune et dosable par colorimétrie.

On établit la gamme étalon suivante :  
dans une série de tubes, on introduit successivement :

|   | Témoin | I   | II | III | IV |
|---|--------|-----|----|-----|----|
| solution étalon<br>d'azote nitrique<br>( $\text{KNO}_3$ à 0,05 g/l) | 0 ml   | 1   | 2  | 5   | 10 |
| $\text{H}_2\text{O}$ distillée                                      | 10     | 9   | 8  | 5   | 0  |
| correspondance en mg/l<br>d'azote nitrique                          | 0      | 0,5 | 1  | 2,5 | 5  |
| solution de salicylate<br>de sodium à 0,5 %                         | 1      | 1   | 1  | 1   | 1  |

On évapore au sec au bain marie, on laisse refroidir. Le résidu est repris par 2 ml ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), après 10 minutes on ajoute 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  distillée, puis 15 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium et de tartrate double de sodium et de potassium (400 g de KOH + 60 g de tartrate de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{K}^+$  dans  $\text{H}_2\text{O}$  distillée qsp 1000 ml) qui développe la coloration jaune. On effectue les lectures à 420 nm et on établit la courbe étalon.

Pour les échantillons, on introduit dans un tube 10 ml de milieu à doser dilué au 1/400ème. On alcalinise faiblement avec la solution d'hydroxyde de sodium, puis on ajoute 1 ml de solution de salicylate de sodium et on poursuit comme précédemment. On effectue les lectures au photolorimètre et l'on se reporte à la courbe étalon.

### III) EMPLOI DES INHIBITEURS

#### A) LA CYCLOHEXIMIDE

Est dissoute dans du milieu de culture dont le pH est ajusté à 3 avec HCl. La solution est ainsi autoclavée (le pH 3 stabilise la cycloheximide) à 120°C pendant 25 minutes. Elle est ajoutée aseptiquement aux fioles lors de l'ensemencement des cellules.

#### B) LA 6-METHYLPURINE

Est dissoute dans du milieu nutritif normal, autoclavée et ajoutée aseptiquement aux fioles de cultures.

#### C) LE CHLORAMPHENICOL

Est introduit directement dans les fioles avant l'autoclavage. Il est employé à l'obscurité, la lumière pouvant occasionner sa dégradation (HOXMARK et NORDBY, 1977).

### IV) ESSAIS DE REINDUCTION

Nitrate, molybdène sont apportés aseptiquement au cours de la croissance de la suspension, à partir de solutions aqueuses préalablement autoclavées.

Les concentrations utilisées ont été : 250 µg/l pour le molybdène ; 2195 mg/l pour le nitrate (soit 306 mg d'azote/l).

### V) MESURE DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE IN VITRO

#### A) PREPARATION DE L'EXTRAIT BRUT ENZYMATIQUE

Après filtration sous vide dans un entonnoir Büchner garni d'un papier filtre, les cellules sont recueillies puis rincées avec une solution de

saccharose à 2 %.

Pour les extractions, 2 grammes de cellules sont prélevés, congelés dans de l'azote liquide et placés à  $-18^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de l'extraction. Une étude de l'effet de la congélation sur le matériel cellulaire a permis d'observer que l'enzyme ne perdait pas son activité après plusieurs semaines de conservation au froid ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).

Les cellules, à nouveau congelées dans de l'azote liquide, sont broyées dans un mortier froid jusqu'à obtention d'une poudre très fine.

Le tampon d'extraction utilisé est celui de HAGEMAN et FLESHER (1960) légèrement modifié. Sa composition est la suivante

- Tris (hydroxyméthyl) aminométhane : 0,1 M
- chlorure de cystéine : 0,001 M

Le pH final est ajusté à 7,5 avec HCl 2 N.

Le tampon froid est ajouté dans le tube à centrifugation contenant le broyat cellulaire à raison de 2 ml par gramme de matière fraîche. Après décongélation, l'homogénat est maintenu 30 minutes au froid. Il est ensuite centrifugé à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 20 minutes à  $\times 19000$  g. Le surnageant est utilisé immédiatement comme source brute d'enzyme.

#### B) MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE IN VITRO

Le principe de la mesure de l'activité nitrate réductase consiste à doser les nitrites formés après réduction des nitrates fournis au début de la réaction enzymatique.

##### 1) Avec N A D H comme donneur d'électrons

0,2 ml d'extrait brut enzymatique est ajouté au mélange d'incubation de HAGEMAN et FLESHER (1960) légèrement modifié qui comprend :

- 0,2 ml d'une solution  $\text{KNO}_3$  0,1 M (soit 20  $\mu\text{moles}$ )
- 1 ml d'un tampon  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M pH 7,5 (soit 100  $\mu\text{moles}$ )
- 0,3 ml d'une solution N A D H (1 mg/ml de tampon phosphate 0,1 M) (soit 0,420  $\mu\text{mole}$ ).

Après 30 minutes d'incubation à 30°C et à l'obscurité, la réaction est bloquée par addition de 0,2 ml d'une solution molaire d'acétate de zinc, puis de 6,1 ml d'éthanol 95° distillé portant ainsi le volume final à 8 ml. Cette opération permet d'éliminer en partie la source d'erreur causée par la réaction qui a lieu entre N A D H et l'un des réactifs de révélation des nitrites (HEWITT et NICHOLAS, 1964). Après centrifugation à x 1500 g durant 5 minutes, 2 ml du surnageant sont prélevés auxquels on ajoute successivement 1 ml de sulfanilamide à 0,2 % dans HCl 6 N et 1 ml de chlorhydrate de N-(1-naphtyl)éthylène-diamine en solution aqueuse (0,582 g/100 ml). Une coloration rouge, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des nitrites formés se développe. Après 30 minutes de stabilisation, la densité optique est lue au photolorimètre à 540 nm. La quantité de nitrites est ensuite déterminée par comparaison avec une gamme étalon. Le contenu en nitrites des extraits cellulaires, avant la réaction enzymatique, est calculé sur un témoin de réaction où N A D H est remplacé par 0,3 ml de tampon phosphate 0,1 M. L'activité nitrate réductase est exprimée en  $\mu$ moles de nitrites formées par heure et par gramme de matière fraîche.

### 2) Avec F M N H<sub>2</sub> comme donneur d'électrons

Le milieu d'incubation reste le même que précédemment, mais le N A D H est remplacé par 0,3 ml d'une solution F M N (1 mg/ml de tampon phosphate 0,1 M). La réaction enzymatique est initiée par l'addition de 0,05 ml de dithionite de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) (10 mg/ml d'une solution  $\text{NaHCO}_3$  0,095 M) (selon la méthode modifiée de PANEQUE et Coll., 1965). Le milieu d'incubation est alors agité très doucement pour permettre la réduction du F M N en F M N H<sub>2</sub> ce qui se traduit par une coloration jaune pâle. Après 30 minutes d'incubation à 30°C et à l'obscurité, le mélange est agité vigoureusement afin d'oxyder le F M N H<sub>2</sub> restant en F M N qui stoppe alors la réaction. La coloration obtenue est alors jaune franc. Le volume est ensuite complété à 2 ml avec H<sub>2</sub>O distillée. Après addition de 1 ml de chacun des réactifs de révélation des nitrites, la densité optique est lue à 540 nm.

### 3) Avec méthyl viologène réduit comme donneur d'électrons

Le procédé est le même que celui de l'essai avec F M N H<sub>2</sub> si ce n'est que ce dernier est remplacé par 0,1 ml d'une solution méthyl viologène (12,8 mg/100 ml de tampon phosphate 0,1 M) (selon la méthode modifiée de GARRETT et NASON, 1969). Le méthyl viologène réduit donne une coloration bleue tandis que sa forme oxydée est incolore.

#### VI ) MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE IN VIVO

Le principe de la mesure de l'activité nitrate réductase in vivo, consiste à doser les nitrites formés après la réduction des nitrates par les cellules incubées sous conditions anaérobies (FERRARI et VARNER, 1971 ; JAWORSKI , 1971). 40 mg de cellules, préalablement lavées et filtrées, sont mises en suspension dans 2 ml du mélange d'incubation suivant :

- tampon phosphate  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  0,1 M pH 7,5 : 30 ml
- solution  $KNO_3$  0,2 M : 50 ml
- n- propanol : 1 ml

Le mélange est ensuite traversé par un faible courant d'azote pendant 30 secondes et le tube est bouché. Après 30 minutes d'incubation à 30°C et à l'obscurité, la réaction est stoppée par passage du tube dans un bain marie bouillant pendant 2 minutes. 1 ml de chacun des réactifs de révélation des nitrites est alors ajouté. Après décantation des cellules, le surnageant est prélevé soigneusement pour la lecture au photolorimètre à 540 nm.

#### VII ) MODIFICATIONS APORTEES LORS DE LA PURIFICATION D'ENZYME

Lors de la purification de l'enzyme, quelques modifications ont été apportées au tampon d'extraction et aux mesures d'activité nitrate réductase.

D'une part, le tampon d'extraction utilisé est un tampon phosphate  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  0,1 M. Ceci nous a permis de maintenir une constance des tampons phosphate au cours de la purification et d'éviter les variations de pH du tampon tris parfois observées avec les changements de température et les temps de conservation. La cystéine, qui a peu d'effet sur l'activité enzymatique, a été supprimée.

D'autre part, le milieu d'incubation comprend 0,1 ml d'extrait enzymatique, 1 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,5, 0,2 ml d'une solution  $KNO_3$  0,1 M et 0,1 ml d'une solution N A D H (1 mg/ml). La réaction est arrêtée après 15 minutes d'incubation par l'addition des réactifs de révélation des nitrites et les volumes sont ajustés à 4 ml avec  $H_2O$  distillée.

Ces dernières modifications nous ont permis de détecter rapidement l'activité enzymatique au cours des procédés de purification tout en réduisant la source d'erreur causée par l'interférence du N A D H avec la coloration des nitrites.

#### VIII) DOSAGE DES PROTEINES

Le dosage des protéines des extraits enzymatiques est réalisé selon la méthode de LOWRY (1951).

#### IX) MARQUAGE DES PROTEINES PAR LA LEUCINE $^3\text{H}$

Après différents temps de culture, les cellules sont recueillies et filtrées aseptiquement dans un entonnoir Büchner. Elles sont ensuite placées dans un tube stérilisé renfermant 1,5 ml du milieu de culture dont elles proviennent. On ajoute alors 0,5 ml d'une solution de Leucine  $^3\text{H}$  de telle sorte que la radioactivité finale soit de 5  $\mu\text{Ci}/\text{tube}$  (2,5  $\mu$  Curies/ml de milieu). Les tubes sont placés sur un agitateur rotatif pendant 1 heure. Les cellules sont ensuite recueillies selon la méthode habituelle et congelées dans de l'azote liquide.

La mesure de l'incorporation de la leucine  $^3\text{H}$  par les cellules est effectuée à partir d'extraits cellulaires obtenus dans les conditions de l'extraction de l'enzyme en absence de cystéine. Les comptages de radioactivité sont effectués sur les fractions protéiques solubles et insolubles dans l'acide trichloracétique à 10 %. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un compteur à scintillation.

#### X) COUPLAGE DU BLEU CIBACRON $\text{F}_3\text{G A}$ AU SEPHADEX $\text{G}_{200}$

Le couplage du bleu Cibacron  $\text{F}_3\text{G A}$  au Séphadex  $\text{G}_{200}$  est obtenu directement selon la méthode décrite par BOHME et COLL. (1972).

#### XI) ANALYSES EN ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Les fractions enzymatiques purifiées ont été analysées en électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La méthode utilisée est celle décrite par INGLE (1968) légèrement modifiée. Elle emploie des gels à 5 % d'acrylamide.

et un tampon (gel et cuve) Tris 0,05 M - Glycine 0,05 M pH 8,9. Après le dépôt des échantillons, les gels sont parcourus par un courant de 1 mA/tube pendant 30 minutes puis de 2 mA/tube pendant toute la durée de l'électrophorèse. Lorsque le bleu de bromophénol atteint le bas du gel, le courant est coupé et le gel est retiré du tube. Il est alors incubé dans les conditions de la mesure de l'activité enzymatique avec N A D H (0,1 ml d'une solution à 1 mg/ml) ou avec méthyl viologène réduit. Après 30 minutes d'incubation, le gel est prélevé, lavé avec de l'eau distillée et placé dans un tube contenant les réactifs de coloration des nitrites. Une coloration rose dans le gel révèle la position de l'enzyme.

Les fractions purifiées ont également été analysées en électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5 % en présence de S D S en vue d'une détermination de poids moléculaires.

Les gels sont préparés dans un tampon Tris 0,375 M. HCl pH 8,8 contenant 0,1 % de S D S. Le tampon d'électrophorèse a la composition suivante : Tris 0,025 M, glycine 0,192 M pH 8,3 ; S D S 0,1 %.

Les tubes d'électrophorèse ont une longueur de 7,6 cm pour un diamètre de 0,5 cm. On réalise une préélectrophorèse en appliquant 2 mA par tube pendant 1 h 45, puis on effectue l'électrophorèse dans ces mêmes conditions.

Puis les protéines sont colorées par le bleu de coomassie et les gels décolorés dans un mélange eau-méthanol acide acétique. Les poids moléculaires sont déterminés en comparant la distance de migration des bandes à celle des chaînes polypeptidiques suivantes qui servent de témoins :

$\beta$  galactosidase (133000 daltons) ; serum albumine (68000) catalase (60000) ; pyruvate kinase (57000) ovalbumine (45000) pepsine (35000) ; trypsine (24000) ribonucléase (13700). La précision de la méthode est de 5 à 10 % (WEBER et OSBORN, 1969).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1) QUELQUES CONDITIONS DE L'EXTRACTION ET DE L'INCUBATION DE LA NITRATE

#### REDUCTASE DE SILENE ALBA

Nous n'avons pas effectué une étude systématique et complète pour déterminer les conditions optimales d'extraction et d'incubation de l'enzyme.

Pour choisir le tampon d'extraction et son pH, nous nous sommes référé aux nombreux travaux sur l'enzyme. Dans la plupart des cas, le tampon employé est soit le tris (hydroxyméthyl-aminométhane) 0,1 M, soit le phosphate 0,1 M dont le pH est le plus souvent ajusté à 7,5. Pour notre part, nous avons utilisé le tampon tris 0,1 M ajusté à pH 7,5 avec HCl pour toutes les études autres que celles concernant la purification de l'enzyme. Dans ce dernier cas, nous avons employé le tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5 pour les raisons indiquées au chapitre des méthodes.

De même, en se référant aux travaux antérieurs, le tampon d'incubation choisi est un tampon phosphate 0,1 M. Notre attention s'est plus spécialement portée, d'une part, sur la nécessité d'inclure au tampon d'extraction des agents protecteurs tels qu'un antioxydant à groupement thiol ou un chélateur des métaux lourds et, d'autre part, sur la nature et les conditions d'utilisation des donneurs d'électrons, le pH d'incubation et finalement la stabilité de l'enzyme extraite et placée au froid (0°C).

#### A) INFLUENCE DE LA CYSTEINE

La cystéine, ajoutée au tampon d'extraction, exerce une action sur l'activité enzymatique qui varie en fonction de sa concentration (Fig. 1). En effet, employée à  $10^{-2}$  M et  $10^{-1}$  M, elle inhibe l'activité nitrate réductase, l'inhibition étant plus importante à  $10^{-1}$  M.

Lorsqu'elle est présente à  $10^{-3}$  M, dose exerçant généralement une protection optimale, elle ne modifie que très faiblement l'activité enzymatique. Pour cette raison, nous l'avons conservée à cette dose dans notre milieu d'extraction.



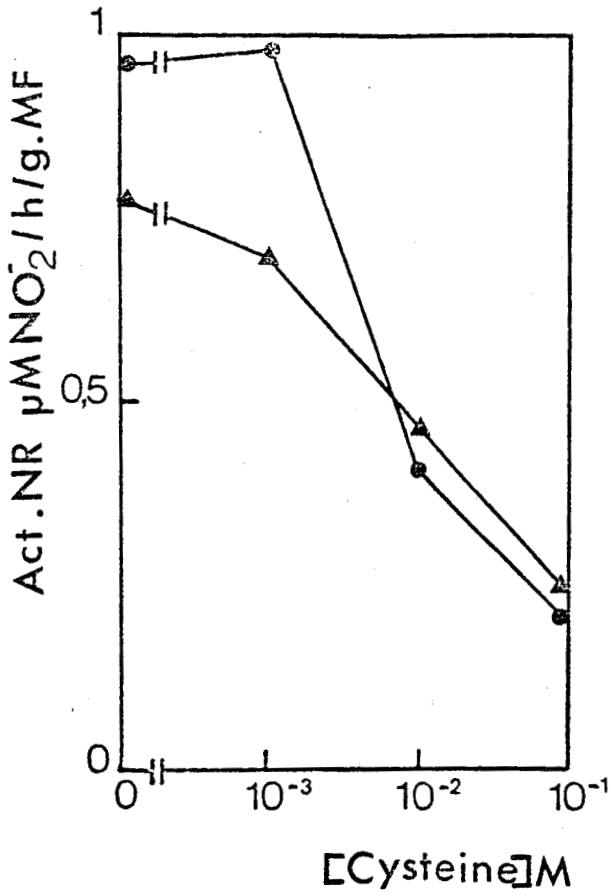
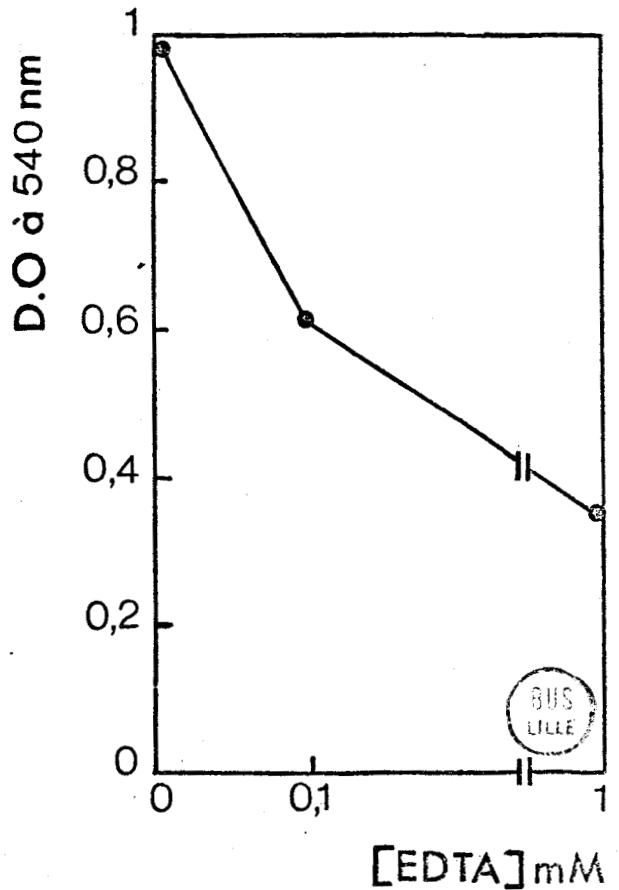


Fig.1 : Effet de la cystéine sur l'activité nitrate réductase (N.R.) des cellules de Silène. (les divers symboles correspondent à des extraits différents).

Fig. 2 : Effet de l'EDTA sur l'activité N.R. des cellules de Silène.



Ces observations indiquent cependant qu'en absence de cystéine exogène, l'enzyme de Silène est suffisamment protégée dans les extraits bruts contre l'oxydation des groupements thiols. L'emploi de la cystéine comme protecteur de l'enzyme, dépend très souvent de l'espèce étudiée. Ainsi, SANDERSON et COCKING (1964a) constatent que celle-ci employée à  $10^{-3}$ M, stimule fortement l'activité nitrate réductase chez la tomate. Il en est de même chez six espèces de graminées pour des doses supérieures à 5 mM (DUSKY et GALITZ, 1977). L'activité enzymatique est 12 fois plus élevée lorsque l'enzyme des feuilles du maïs est extraite en présence de 7,5 mM de cystéine (ROBIN, 1979). Toutefois, la cystéine, utilisée à  $10^{-3}$ M, est particulièrement inhibitrice de l'enzyme extraite du pois (JONES et SHEARD, 1973 ; WALLACE et PATE, 1965).

#### B) INFLUENCE DE L'E D T A (éthylène diamine tétracétique)

On emploie souvent l'E D T A pour empêcher l'inactivation de l'enzyme par les métaux lourds. Lorsque l'enzyme de Silène est extraite en présence de 3 mM d'E D T A, son activité est fortement inhibée. Les résultats de la figure 2 indiquent que l'E D T A inactive l'enzyme même à très faible concentration ( $10^{-4}$ M). L'effet inhibiteur est toujours observé lorsque l'E D T A est testé à 1 mM en présence de molybdène (100  $\mu$ M). Ceci peut exclure une action possible du chélateur sur le métal de l'enzyme. Pour ces raisons, l'E D T A ne figure pas dans la composition de notre milieu d'extraction.

Nous ne pouvons pas actuellement expliquer cet effet inhibiteur de l'E D T A. Toutefois, une des hypothèses possibles serait que les extraits de Silène renferment un inhibiteur de nature inconnue dont la stabilité serait augmentée en présence d'E D T A.

#### C) NATURE ET CONDITIONS D'UTILISATION DES DONNEURS D'ELECTRONS

##### 1) Le N A D H

Les activités enzymatiques, mesurées in vitro, avec différentes concentrations de N A D H sont comparées lorsque les réactions enzymatiques sont arrêtées ou non, par une précipitation à l'acétate de zinc molaire selon la méthode proposée par SANDERSON et COCKING (1964a) (fig. 3). Les résultats obtenus montrent que le N A D H interfère fortement avec la coloration des nitrites comme l'ont signalé HEWITT et NICHOLAS (1964). Cette interférence devient stable pour des volumes supérieurs à 0,3 ml d'une solution de N A D H à 1 mg/ml.

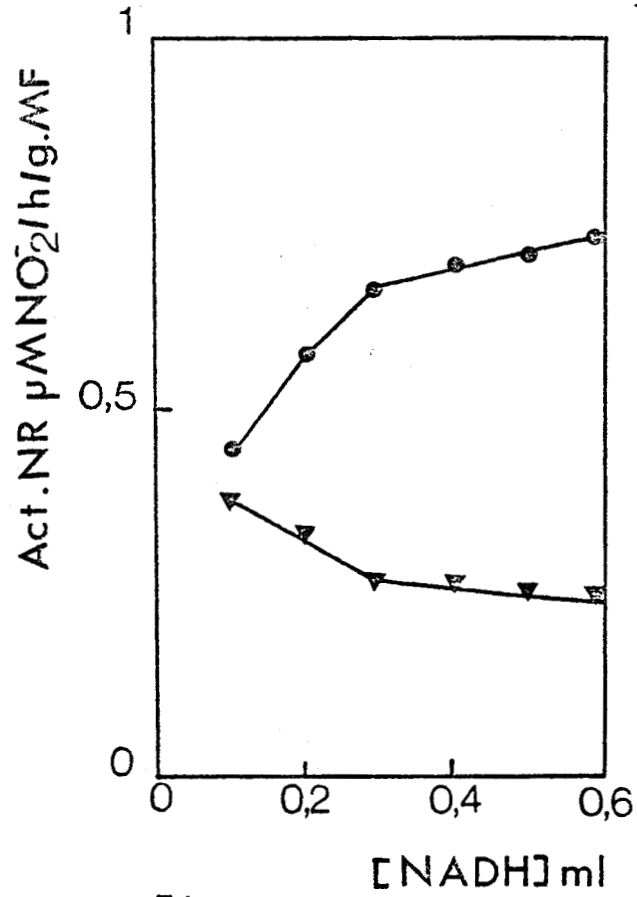


Fig 3

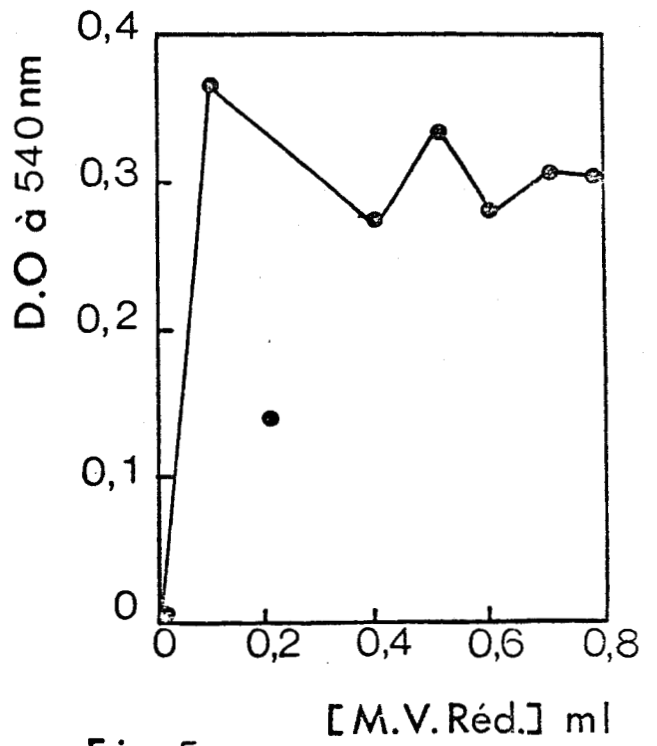


Fig 5

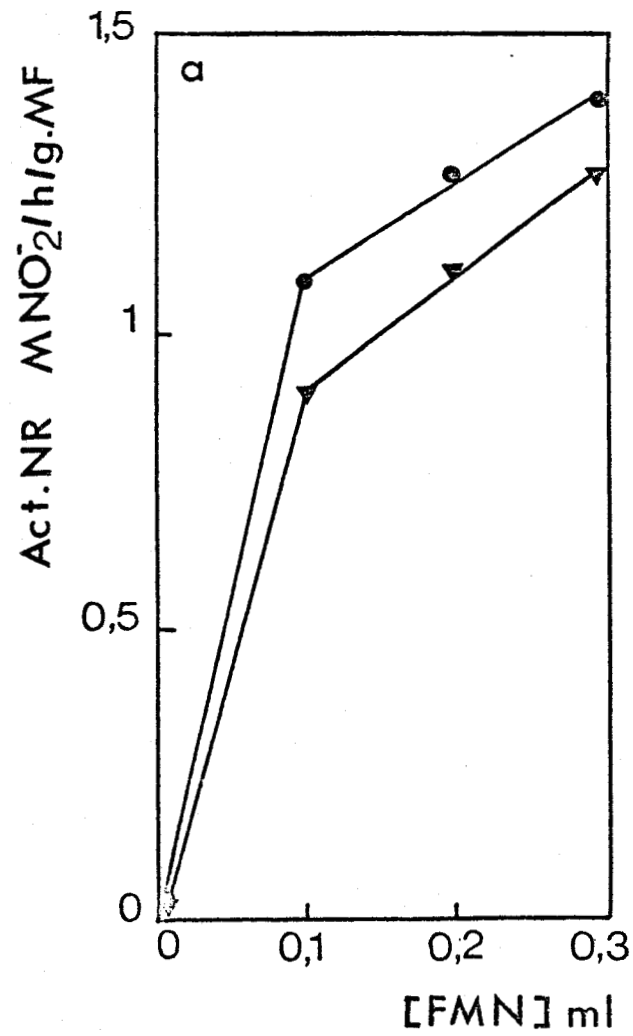
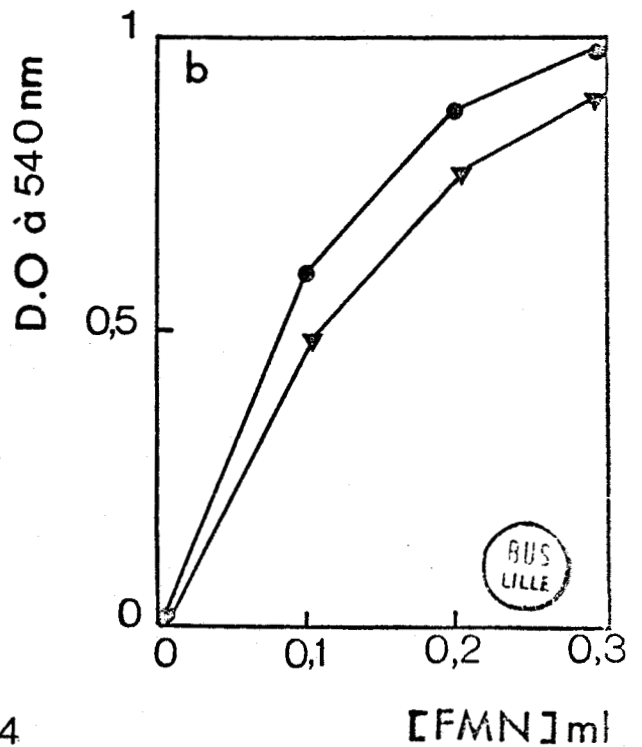


Fig 4



[FMN] ml

Nous avons donc adopté la méthode de précipitation par l'acétate de zinc-éthanol pour mesurer l'activité enzymatique avec N A D H dont la concentration a été fixée à 0,3 ml d'une solution à 1 mg/ml (soit 0,420  $\mu$ moles).

## 2) Le N A D P H

Lorsque le N A D H est remplacé par une quantité équivalente de N A D P H, les activités nitrate réductase obtenues représentent entre 9 à 20 % de celles mesurées avec N A D H (POULLE, 1977).

## 3) Le F M N H<sub>2</sub>

La mesure de l'activité enzymatique avec F M N H<sub>2</sub> est réalisée avec différentes doses de F M N en conditions aérobies (PANEQUE et Coll., 1965) et anaérobies (WRAY et FILNER, 1970).

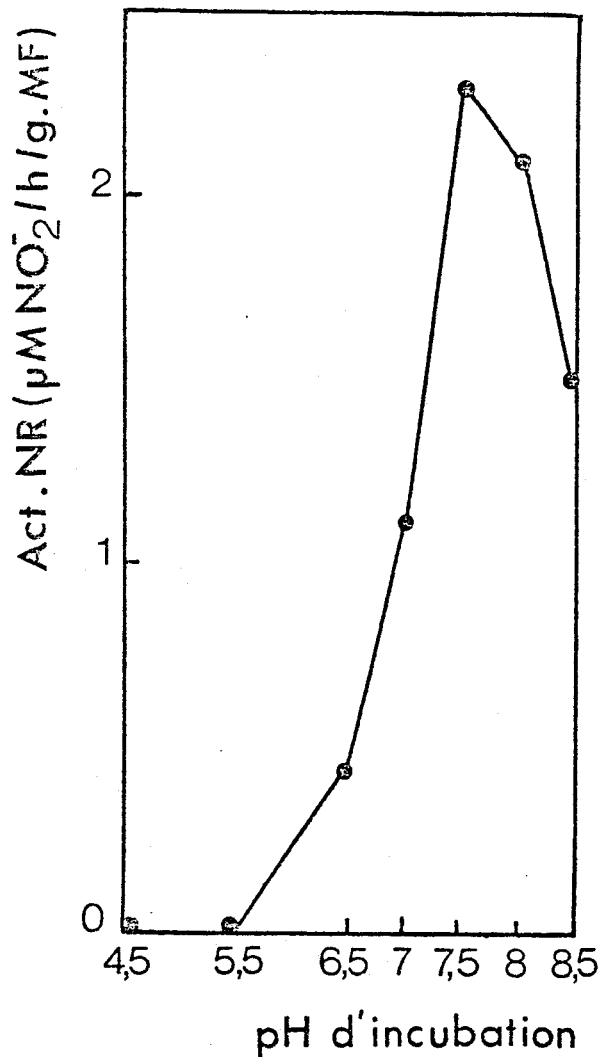
L'anaérobiose est créée soit par le passage d'un faible courant d'azote dans le milieu réactionnel avant l'addition du dithionite (fig. 4a), soit par le déroulement de la réaction enzymatique sous vide (fig. 4b). L'activité enzymatique avec F M N H<sub>2</sub> est maximale en conditions aérobies et en présence de 0,3 ml d'une solution de F M N à 1 mg/ml (soit 0,528  $\mu$ moles).

## 4) Le méthyl viologène réduit

En présence de méthyl viologène réduit, la réaction enzymatique se déroule en conditions anaérobies par passage d'un faible courant d'azote dans le milieu d'incubation avant l'addition du dithionite puis en bouchant le tube où a lieu la réaction. L'activité enzymatique est alors maximale avec 0,1 ml d'une solution de méthyl viologène à 12,8 mg/100 ml (soit 0,05  $\mu$ moles). La variabilité des résultats obtenus en fonction de la dose de méthyl viologène (fig. 5) est probablement due à une oxydation rapide du méthyl viologène. Celle-ci peut résulter soit de mauvaises conditions d'anaérobiose, soit de la présence d'une nitrite réductase active qui réduit les nitrites ainsi formés étant donné que les conditions de la réaction ressemblent à celles définies par WRAY et FILNER (1970) pour l'essai de la nitrite réductase de l'orge.

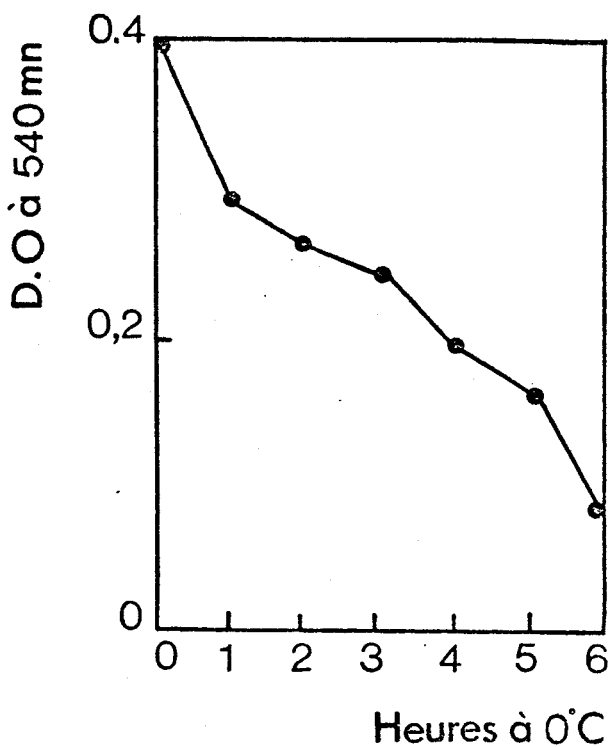
## 5) Conclusion

Par sa capacité d'utilisation du N A D H, du F M N H<sub>2</sub> et du méthyl viologène réduit comme donneurs d'électrons, l'enzyme de Silène s'apparente



*Fig. 6 : Activité N.R. en fonction du pH.*

*Fig. 7 : Mesure de la stabilité de l'enzyme de Silène laissée à 0°C, en fonction du temps.*



à celle de nombreux végétaux supérieurs. En accord avec SCHRADER et Coll. (1963), l'enzyme de Silène est considérée comme N A D H nitrate réductase (E.C. 1.6.6.1.).

Les faibles activités enzymatiques obtenues avec N A D P H comme donneur d'électrons suggèrent que l'enzyme de Silène est N A D H spécifique comme le sont d'ailleurs la plupart de celles des plantes supérieures. Nous avons donc conservé comme test majeur de mesure de l'activité nitrate réductase in vitro celui effectué en présence de N A D H.

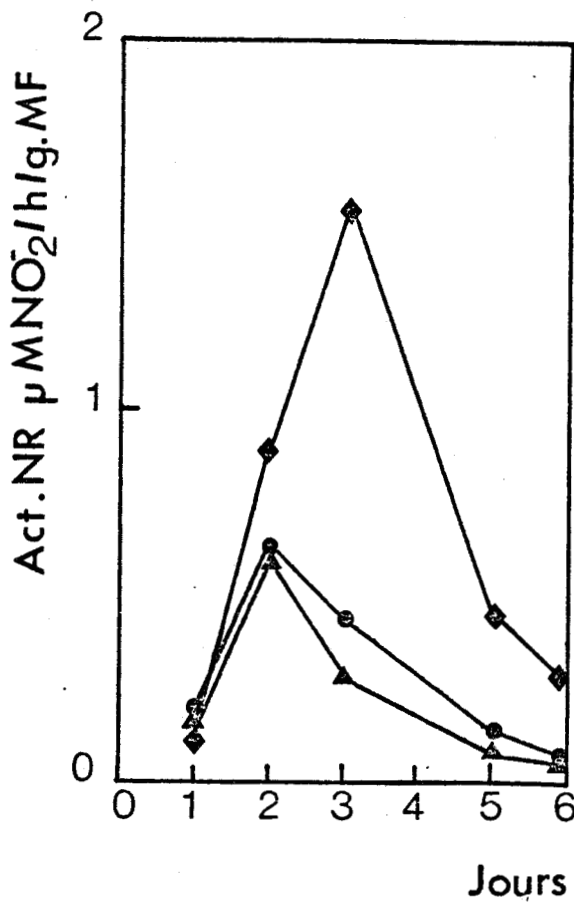
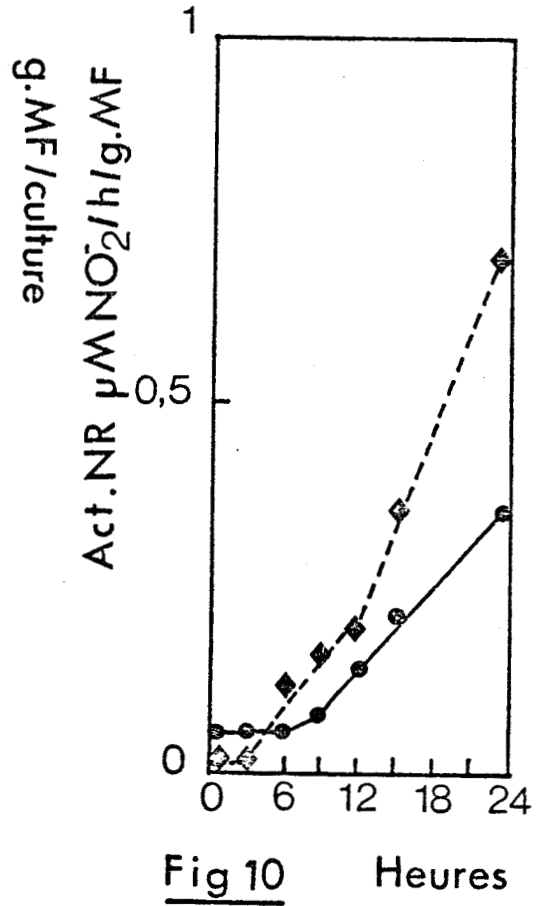
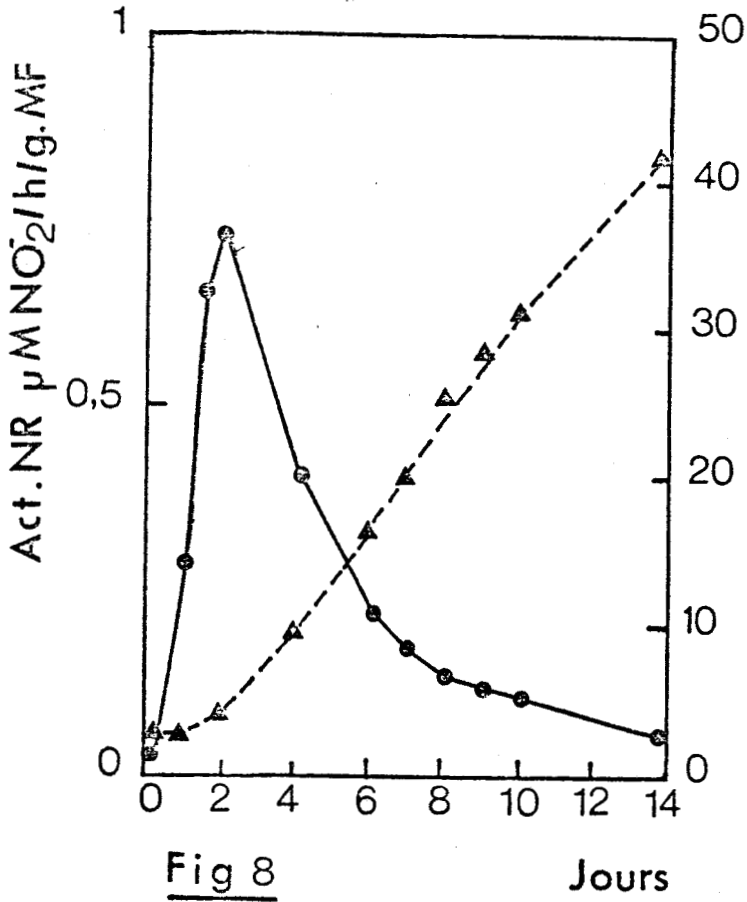
La difficulté d'obtenir des résultats homogènes avec l'emploi du méthyl viologène fait que nous l'avons uniquement éprouvé sur des préparations d'enzyme purifiée.

#### D) DETERMINATION DU pH OPTIMAL D'INCUBATION

L'enzyme de Silene alba présente une activité maximale, avec N A D H comme donneur d'électrons, lorsque le tampon d'incubation est ajusté à un pH de 7,5 (fig. 6). Cette valeur de pH est souvent optimale pour l'activité de la nitrate réductase de nombreuses espèces végétales. Lorsque le pH est inférieur ou égal à 5,5, l'addition de l'extrait enzymatique provoque un trouble résultant de la précipitation d'un certain nombre de protéines. Dans ce cas, l'activité enzymatique est nulle.

#### E) STABILITE DE L'ENZYME

L'enzyme de Silène, extraite dans les conditions précédemment définies, se révèle être extrêmement instable lorsque celle-ci est conservée à 0°C (fig. 7). En effet, l'activité enzymatique devient très faible après 6 heures de conservation au froid. Une étude similaire a pu montrer que la perte d'activité était considérable seulement après 2 heures de conservation à 0°C (environ 80 %). Nous avons donc été amenés à mesurer les activités enzymatiques immédiatement après l'extraction de l'enzyme.



## 11) CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE ET ACTIVITE NITRATE REDUCTASE

### A) VARIATIONS DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE AU COURS DU CYCLE DE CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE

La croissance de la suspension cellulaire du Silene alba a été bien étudiée (DUBOIS et BOURIQUET, 1974 ; DUBOIS, 1975 ; DUBOIS et Coll., 1976). Elle passe successivement par quatre phases principales : latence, croissance exponentielle puis ralentie et déclin. L'évolution de l'activité nitrate réductase a été suivie durant les quatorze premiers jours de la culture, ce qui correspond aux trois premières phases définies précédemment.

L'activité enzymatique, mesurée in vitro avec N A D H comme donneur d'électrons, apparaît rapidement après le transfert des cellules âgées de 14 jours dans un milieu neuf (fig. 8). Elle atteint généralement son maximum après 48 heures de culture puis décroît fortement jusqu'au 8ème jour où elle devient alors très faible.

La figure 9 présente les variations de l'activité nitrate réductase durant les 6 premiers jours de culture lorsque celles-ci sont mesurées, d'une part, in vivo et, d'autre part, in vitro avec N A D H et F M N H<sub>2</sub> comme donneurs d'électrons. Les résultats obtenus montrent, quel que soit le principe de mesure de l'activité enzymatique, que la réduction des nitrates s'effectue surtout pendant la phase exponentielle de la croissance des cellules.

Ceci est également observé chez des suspensions cellulaires de tabac (CHROBOCZEK-KELKER et FILNER, 1971 ; BEHREND et MATELES, 1975), de soja (HAHLBROCK et Coll., 1974 ; OAKS, 1974), de tomate (BEHREND et MATELES, 1975), de riz (YAMAYA et OHIRA, 1976) et de Paul's Scarlet Rose (JONES et Coll., 1976 ).

Mesurée in vivo, l'activité enzymatique est toujours plus élevée que celle mesurée in vitro avec N A D H et F M N H<sub>2</sub>, ces deux dernières étant sensiblement voisines.

### B) EXISTENCE D'UNE PERIODE DE LATENCE

Après le transfert des cellules dans un milieu neuf, il existe une période de latence d'une durée de 6 à 9 heures selon le procédé de mesure (fig. 10). Les différences de durée constatées entre l'essai in vivo et l'essai in vitro peuvent résulter des différentes sensibilités des deux procédés de mesure utilisés.



### C) DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent que le transfert des cellules (ou repiquage) dans un milieu neuf provoque une brusque élévation de l'activité nitrate réductase très tôt après la mise en culture des cellules. Cet événement précoce suggère que l'enzyme est soit synthétisée, soit activée lors du transfert des cellules. L'évolution de l'activité enzymatique chez Silene alba se rapproche de celle du soja (OAKS, 1974) et du riz (YAMAYA et OHIRA, 1976) par le fait que le maximum d'activité est atteint dans les 3 premiers jours. Par contre, elle diffère de celle du tabac (FILNER, 1966 ; BEHREND et MATELES, 1975) et de Paul's Scarlet Rose (JONES et Coll., 1976) où l'optimum de l'activité apparaît plus tardivement après le transfert des cellules. La période de latence de 6 à 9 heures chez Silene alba, coïncide assez bien avec celle de 3 heures chez le soja (OAKS, 1974), d'une heure chez la tomate (BEHREND et MATELES, 1975), de 6 heures chez le tabac (FILNER, 1966) et de moins d'une heure chez le riz (YAMAYA et OHIRA, 1976). Par contre, chez Paul's Scarlet Rose, celle-ci dure environ 24 heures (MOHANTY et FLETCHER, 1976). Mesurée in vivo, l'activité enzymatique chez Silene alba apparaît toujours plus élevée que celle mesurée in vitro. Il en est de même chez Paul's Scarlet Rose (JONES et Coll., 1976, 1978). Ce n'est pas le cas dans les feuilles de soja (NICHOLAS et Coll., 1976a) et des plantules de blé (BRUNETTI et HAGEMAN, 1976) où l'activité mesurée in vitro est supérieure. Il est probable que les extraits de Silene alba renferment, comme ceux de Paul's Scarlet Rose (JONES et Coll., 1976) un ou des inhibiteurs libérés qui agissent rapidement entre l'extraction de l'enzyme et sa mise en incubation. De ce fait, l'essai in vivo est vraisemblablement plus représentatif de la quantité d'enzyme présente dans les cellules. Toutefois, les deux procédés de mesure de l'activité enzymatique nous paraissent satisfaisants quant à l'observation et à l'interprétation des phénomènes étudiés. Dans une même étude, les valeurs obtenues avec les deux procédés et leur comparaison peuvent nous permettre de valider le résultat final de cette étude.

Par ces nombreux avantages, l'essai in vivo nous paraît plus approprié lorsqu'une étude, nécessitant de nombreux dosages d'activité enzymatique, est envisagée. En effet, celui-ci permet, d'une part, d'effectuer les dosages pendant le déroulement même de l'étude entreprise et, d'autre part, de réaliser les mesures à partir d'une même fiole de culture ce que n'autorise pas l'essai in vitro. De plus, les conditions expérimentales sont rendues plus aisément reproductibles avec l'essai in vivo qu'avec l'essai in vitro qui, dans une telle étude, exigerait plusieurs séries de broyages.

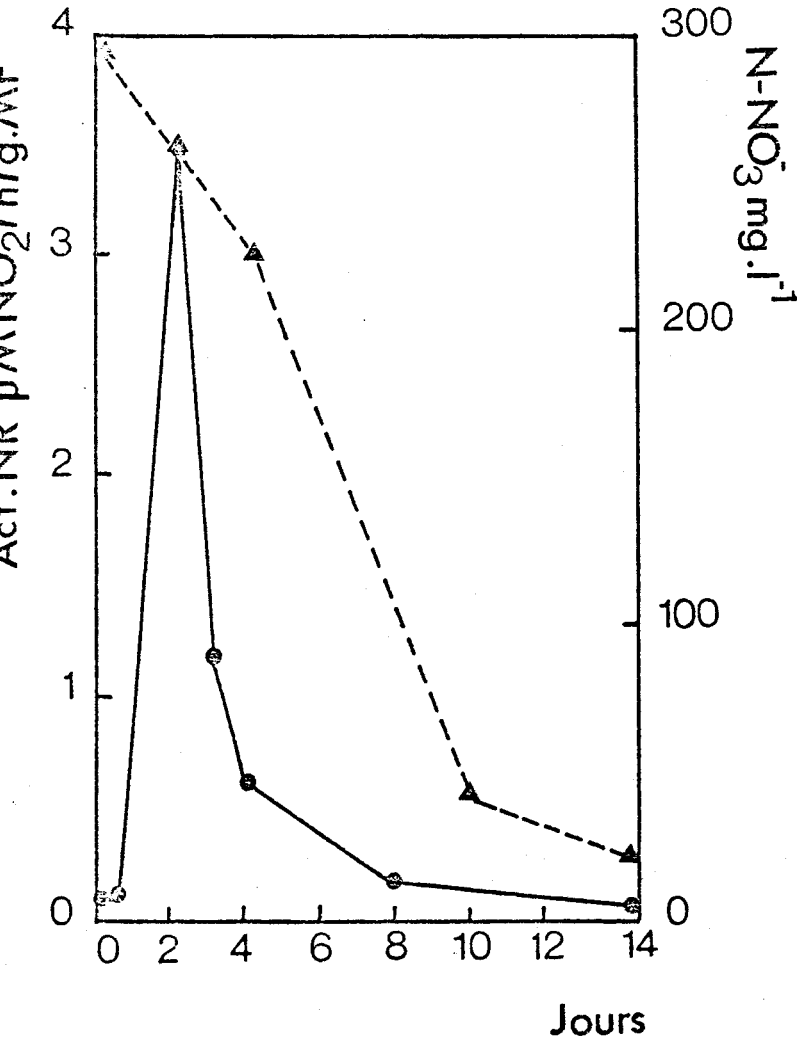
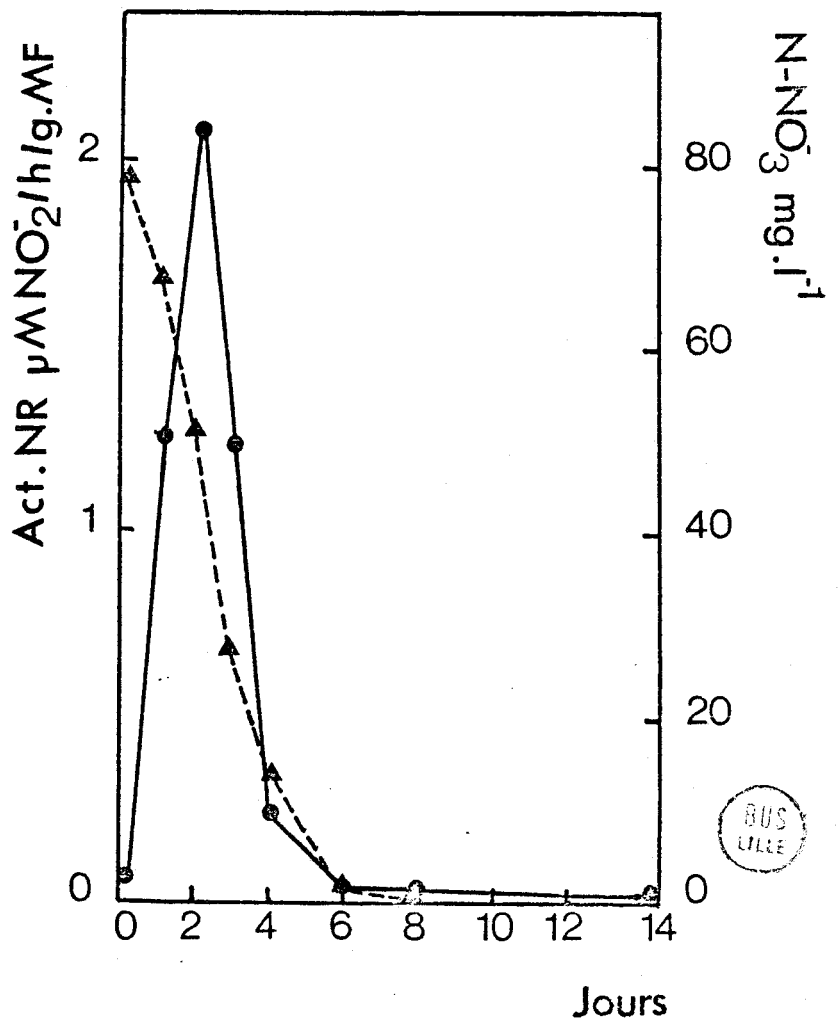


Fig. 11 : Variations de l'activité N.R. (●—●) et de l'absorption des nitrates (▲—▲) au cours de la croissance. ( $\text{N-NO}_3^-$  : 300 mg/l).  
L'activité N.R. est mesurée in vitro

Fig. 12 : Variations de l'activité N.R. (●—●) et de l'absorption des nitrates (▲—▲) au cours de la croissance. ( $\text{N-NO}_3^-$  : 75 mg/l).  
L'activité N.R. est mesurée in vitro



Les activités enzymatiques mesurées in vitro avec N A D H sont légèrement supérieures à celles mesurées avec F M N H<sub>2</sub> mais toutes deux évoluent de la même façon. Ceci est également observé chez l'Orge (WRAY et FILNER, 1970) et le maïs (SCHRADER et Coll., 1968) où les activités F M N H<sub>2</sub> sont sensiblement plus élevées.

### III) ACTIVITE NITRATE REDUCTASE ET ABSORPTION DES NITRATES

Les variations de l'activité nitrate réductase, mesurée in vitro avec N A D H, en fonction de l'absorption des nitrates sont représentées dans la figure 11. Les nitrates sont absorbés faiblement pendant les 4 premiers jours, puis la consommation s'accélère jusqu'au 10ème jour et se poursuit jusqu'au 14ème jour où il subsiste environ 8 % de la concentration initiale (BRASSART et Coll., 1978 ; fig. 11). Bien que la chute de l'activité enzymatique semble accompagner l'épuisement des nitrates du milieu de culture, il est surprenant de constater que l'activité enzymatique est très faible pendant la phase accélérée de l'absorption des nitrates. Ainsi, chez Silene alba, les fortes activités nitrate réductase sont associées à une faible consommation des nitrates alors qu'à une forte consommation correspondent des activités faibles. Cela diffère profondément de ce qui est observé chez le tabac (FILNER, 1966), chez l'érable (YOUNG, 1973) et chez Paul's Scarlet Rose" (JONES et Coll., 1976) où l'activité nitrate réductase et absorption des nitrates par les cellules évoluent en parfaite corrélation. Ainsi chez Paul's Scarlet Rose, l'activité maximale se situe au 4e jour et les cellules ont déjà consommé plus de 80 % de la concentration initiale en nitrates. Le milieu de culture des cellules de Silène renferme les nitrates à la dose de 21,71 mM ce qui paraît élevé comparé à celles de 2,5 mM et de 10 mM reportées pour le tabac (FILNER, 1966) et Paul's Scarlet Rose (JONES et Coll., 1976) respectivement. Nous avons donc étudié l'évolution de l'activité nitrate réductase lorsque le milieu contient le quart de la concentration habituelle en nitrates, soit 5,42 mM. Il apparaît alors que l'évolution de l'activité nitrate réductase suit parfaitement celle de la disparition des nitrates du milieu de culture (figure 12). Face à ces observations, il est vraisemblable que la concentration habituelle en nitrates (21,71 mM) est excessive et que la plupart des nitrates sont stockés à l'intérieur des cellules alors qu'une partie plus faible est réduite.

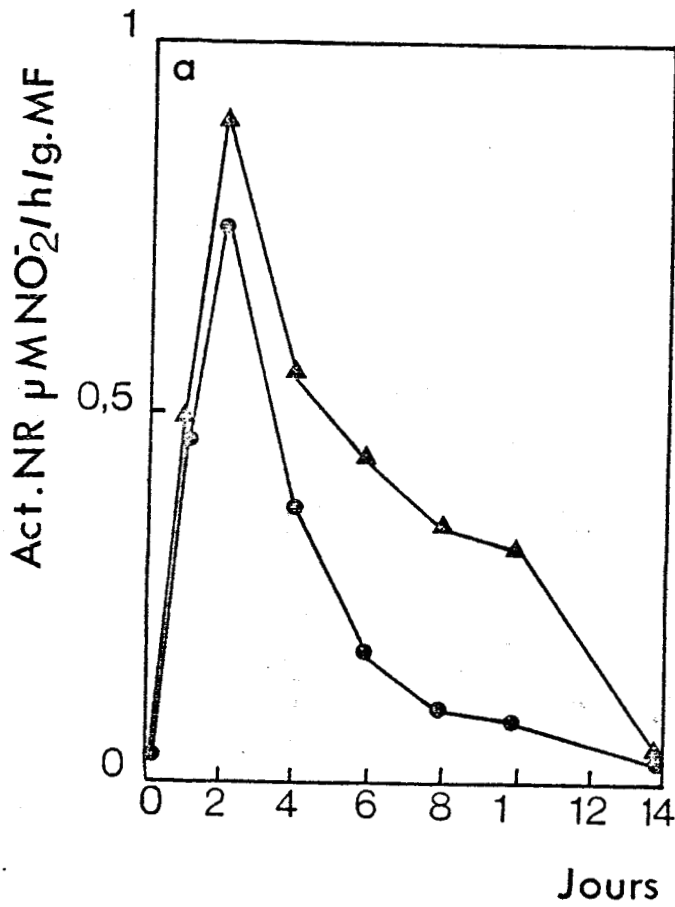
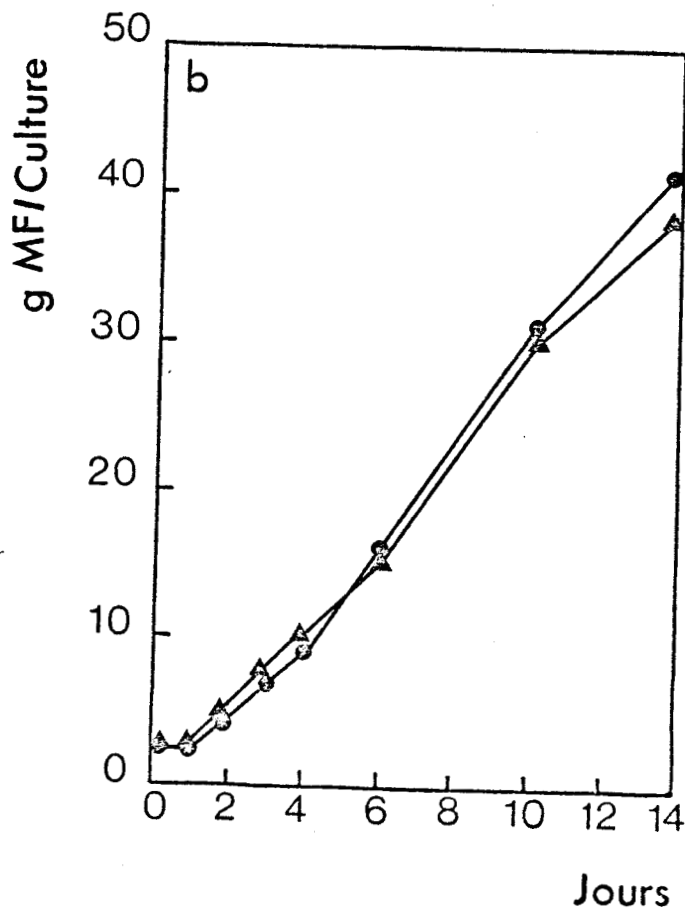


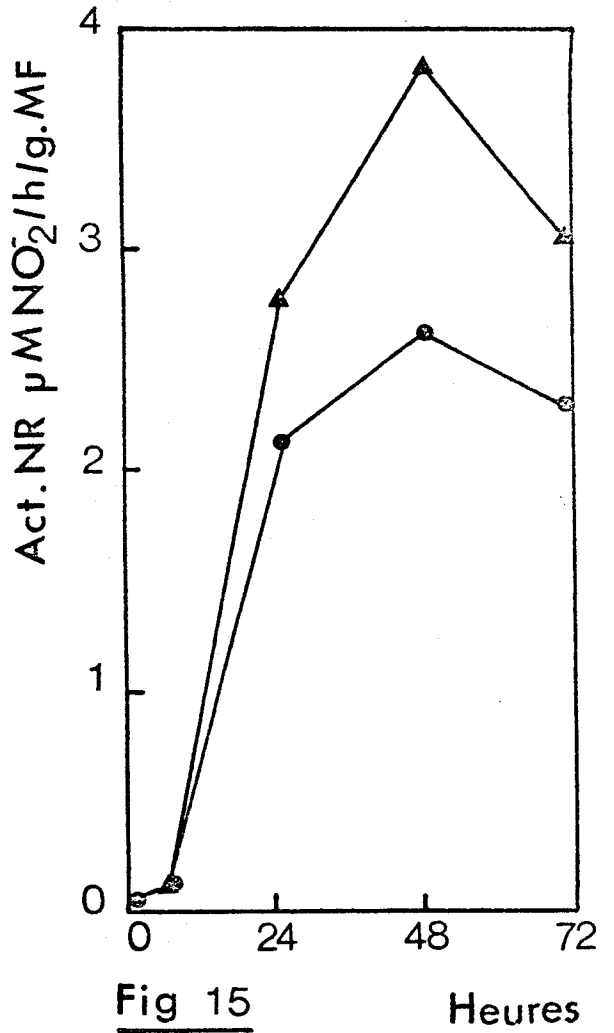
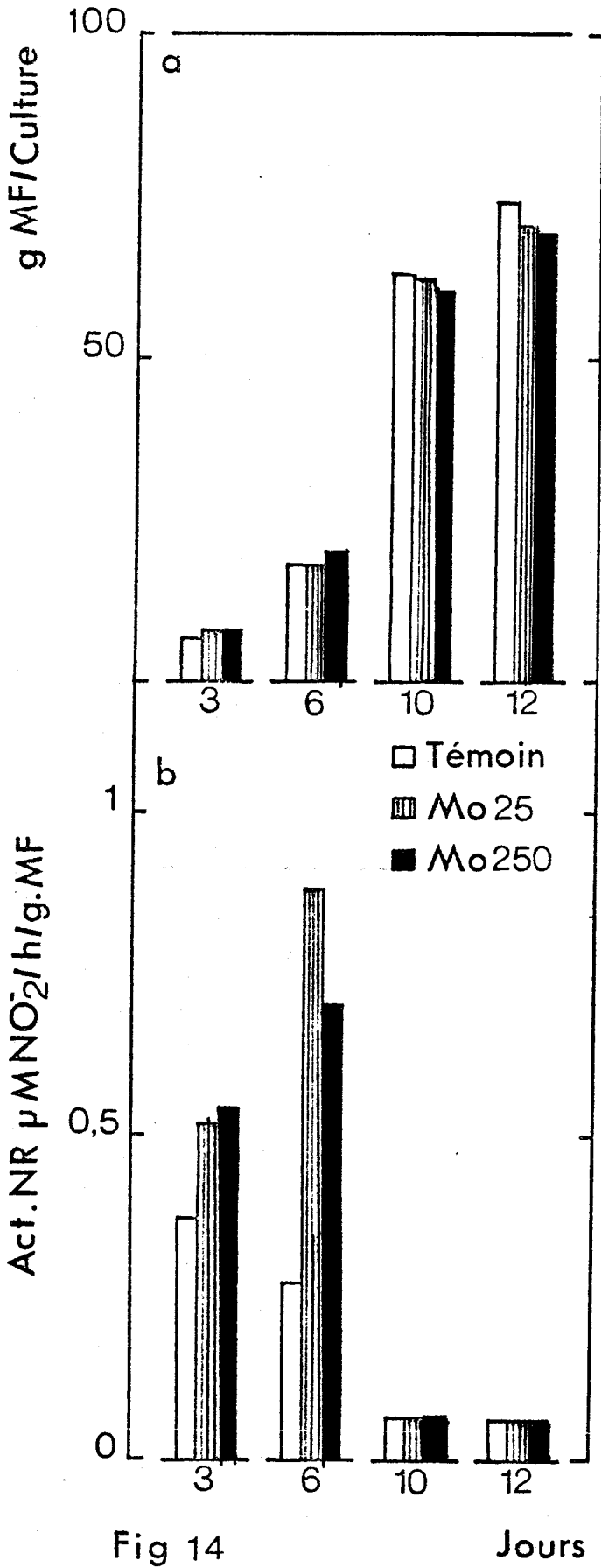
Fig. 13 : Influence du Mo (250 µg/ml) sur l'évolution de :

a) l'activité N.R. mesurée in vitro

b) la croissance de la suspension cellulaire, exprimée en poids de matière fraîche/culture.

(●—●) sans Mo  
(▲—▲) avec Mo





Ce résultat est d'ailleurs appuyé par l'existence des deux pools nitriques distincts chez les plantes supérieures (FERRARI et Coll., 1973 ; HEIMER et FILNER, 1971).

#### IV) INFLUENCE DU MOLYBDÈNE

Les nitrate réductases sont des métalloprotéines contenant du molybdène (NICHOLAS et NASON, 1954b, 1955) ; VEGA et Coll., 1971 ; NOTTON et HEWITT, 1971a). Le molybdène n'entre pas dans la composition de notre milieu de culture. Comme nous l'avons vu précédemment, l'activité enzymatique chute bien avant l'épuisement total des nitrates du milieu. Afin de savoir si ce phénomène n'était pas dû au manque de molybdène dans le milieu de culture, nous avons fourni aux cellules le métal sous la forme de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  à raison de 250 microgrammes par litre de milieu.

Le molybdène stimule l'activité nitrate réductase pendant toute la durée du cycle de croissance des cellules (fig. 13a). Elle se situe à une valeur élevée jusqu'au 10ème jour de culture puis chute rapidement. Le métal réduit sensiblement la croissance des cellules (fig. 13b). Afin de nous assurer que la dose n'est pas toxique, nous avons fourni aux cellules le métal à une concentration dix fois plus faible (soit 25 µg/litre de milieu). Bien que la croissance des cellules soit encore légèrement réduite, nous constatons une stimulation plus importante de l'activité enzymatique vers le 6ème jour (fig. 14a et b). De même, mesurée in vivo durant les 3 premiers jours, l'activité enzymatique est plus élevée dans les cellules cultivées en présence de 25 µg de molybdène (fig. 15). Ces résultats suggèrent que le molybdène est un facteur limitant de l'activité nitrate réductase durant le cycle de la croissance de la suspension cellulaire dans nos conditions de culture.

L'addition du métal au milieu de culture nous paraît donc nécessaire. Bien que l'activité nitrate réductase soit stimulée par la présence du molybdène, sa chute apparaît toujours antérieure à la phase accélérée de l'absorption des nitrates (fig. 12, 13a et 14a). Il semble donc que le manque de molybdène dans le milieu de culture soit une des conséquences de la chute précoce de l'activité nitrate réductase dans les conditions habituelles de culture mais que néanmoins la concentration en nitrates demeure légèrement excessive bien que permettant une très bonne croissance des cellules (BRASSART, 1976). II

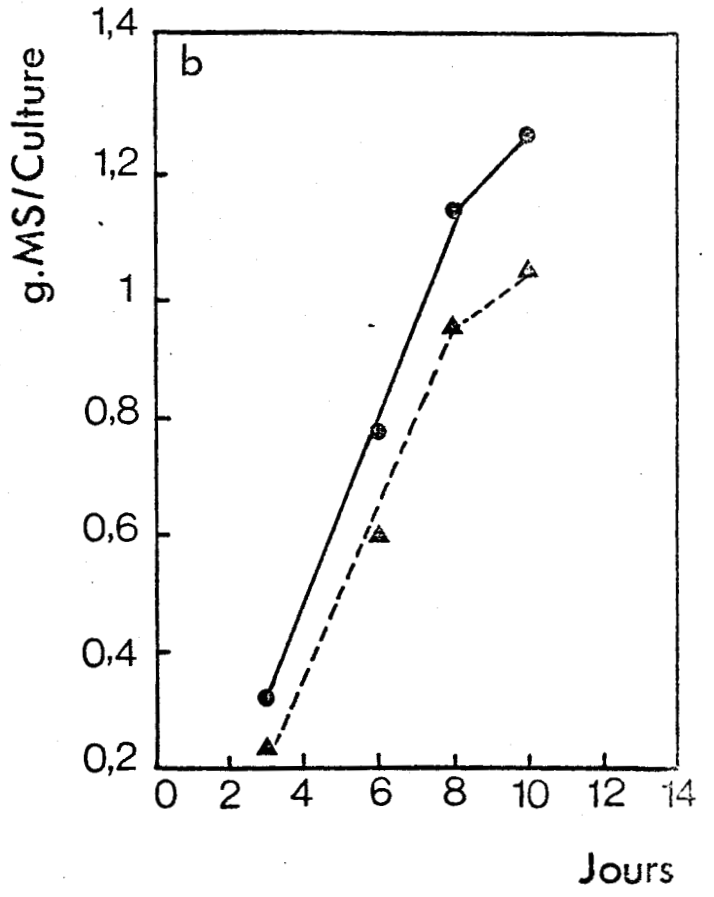
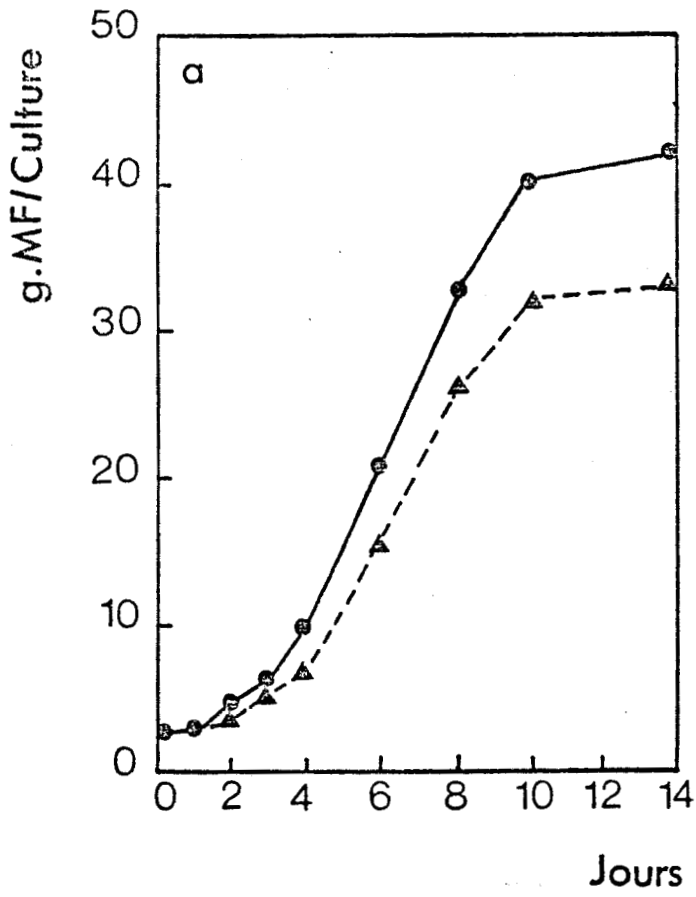
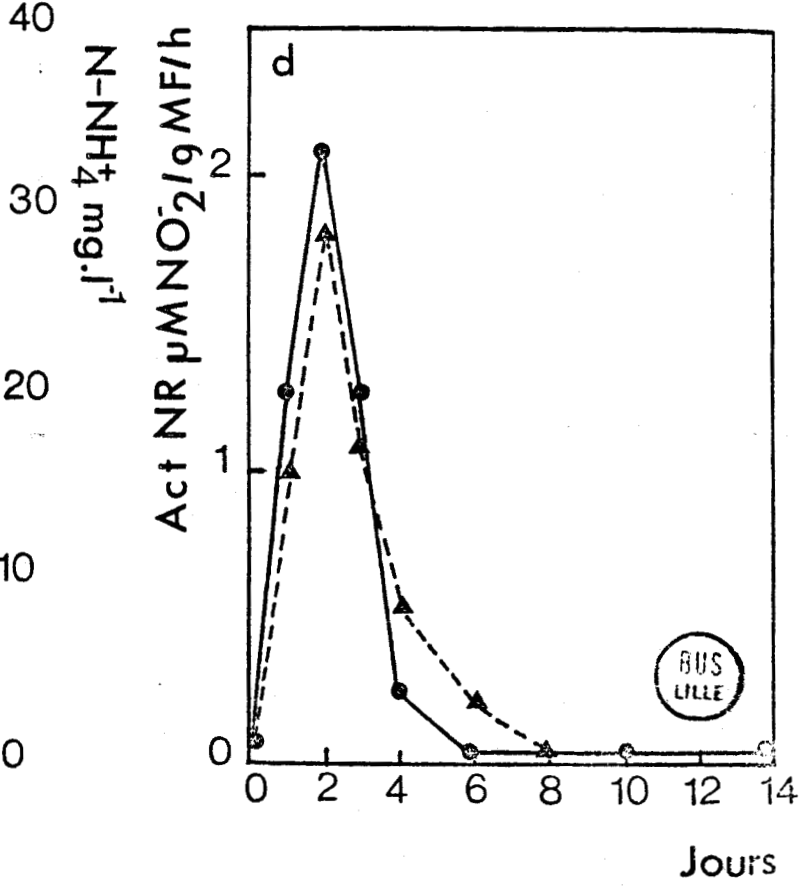
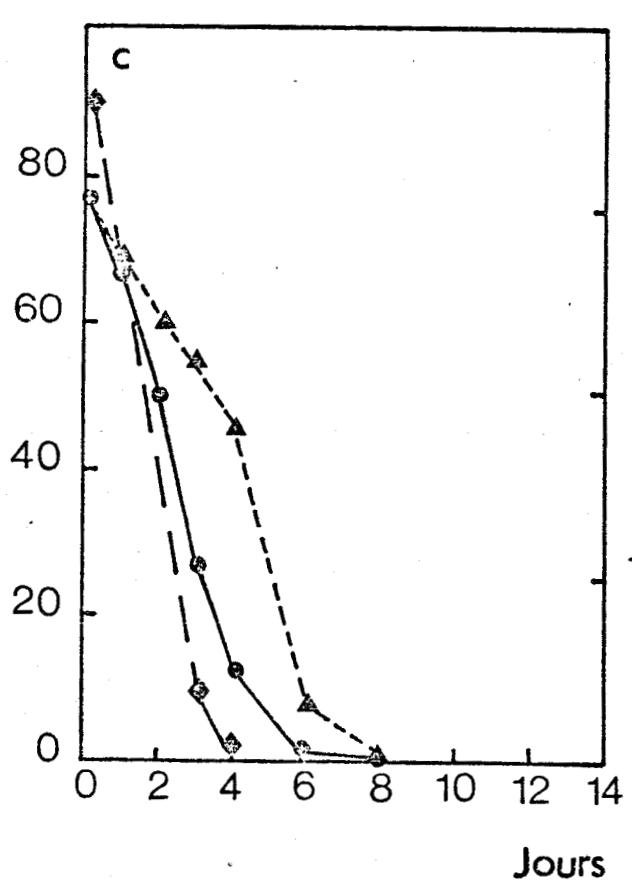


Fig 16



serait intéressant à ce sujet, d'étudier le devenir des nitrates à l'intérieur des cellules par la mesure des quantités réduites et stockées en fonction de l'absorption de ceux-ci.

Le besoin en molybdène, de Silene alba, pour l'activité enzymatique n'a pu être montré sans doute parce que les produits qui composent notre milieu de culture ne sont pas purs. Le molybdène qui agit à dose oligodynamique, est probablement présent sous forme de traces suffisantes à l'apparition de l'activité nitrate réductase durant les premiers jours du cycle de croissance. Au cours de la prolifération, l'absorption par les cellules appauvrit le milieu en molybdène qui devient ainsi facteur limitant.

#### A) EFFET D'UNE FAIBLE DOSE D'AMMONIUM (2 mM)

Lorsque l'ammonium est fourni en faibles quantités (2 mM) en présence de 5 mM de nitrate, la consommation d'azote nitrique est ralentie et la croissance des cellules diminuée (fig. 16 a, b et c). Ces résultats confirment ceux obtenus par BRASSART et Coll. (1978) et montrent que les cellules de Silène utilisent préférentiellement l'azote nitrique comme source d'azote.

L'ammonium est rapidement absorbé par les cellules durant les quatre premiers jours (fig. 16 c). Dans ces conditions, l'activité nitrate réductase se développe de la même façon qu'en absence d'ammonium mais sa disparition est plus tardive puisqu'elle s'annule seulement vers le 8ème jour (fig. 16 d). Comme par ailleurs les nitrates sont totalement épuisés au 8ème jour de culture lorsque le milieu contient des ions  $\text{NH}_4^+$ , on peut conclure que l'activité enzymatique évolue en fonction de la consommation d'azote nitrique.

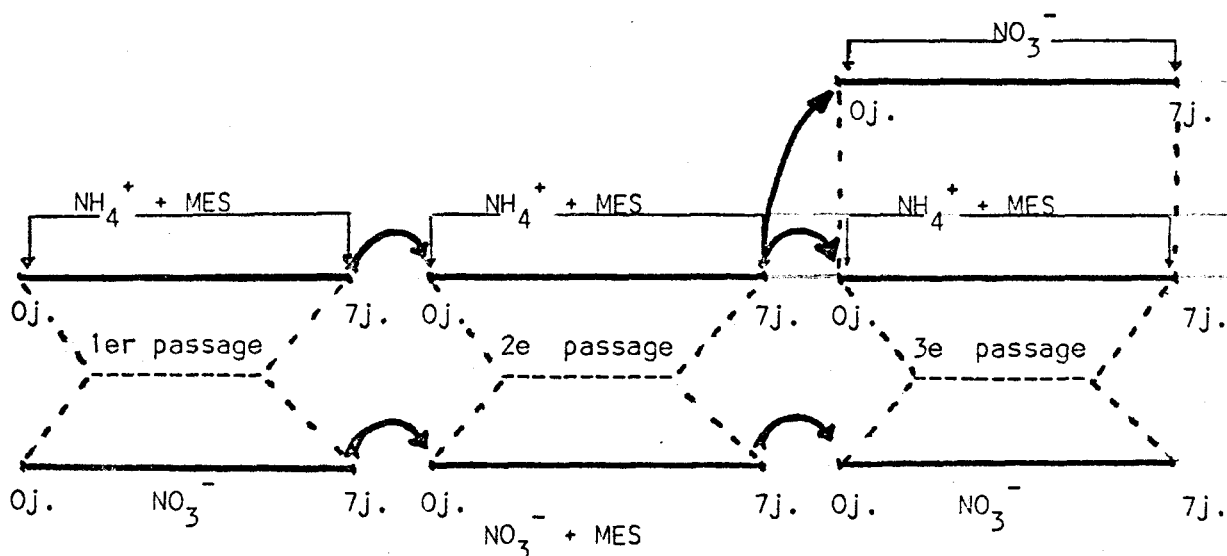
Cependant, les ions  $\text{NH}_4^+$  ne modifient pas l'activité nitrate réductase puisqu'en effet les quantités de nitrites, formés par heure et par gramme de matière fraîche, sont sensiblement identiques en présence et en absence d'ammonium (fig. 16 d). La courbe de variation de l'activité enzymatique est simplement décalée dans le temps lorsque l'ammonium est ajouté (fig. 16 d). On peut donc penser qu'en présence d'ammonium et de nitrates, les cellules utilisent plus rapidement l'ammonium que les nitrates en début de culture. L'absorption des nitrates étant alors ralentie ou modifiée, entraîne l'apparition plus tardive de l'activité nitrate réductase qui, évoluant en fonction de la consommation des nitrates, se trouve ainsi prolongée et s'annule au 8ème jour quand les nitrates du milieu sont totalement épuisés.



Ceci rejoint les observations concernant une suspension cellulaire de Soja où l'activité nitrate réductase demeure faible pendant l'absorption rapide de l'ammonium en début de culture. Elle augmente très vite dès que les ions  $\text{NH}_4^+$  du milieu sont complètement épuisés (BAYLEY et Coll., 1972). Comme dans le cas de suspensions cellulaires de blé (BARLEY et Coll., 1972), l'ammonium, utilisé à faible dose, ne semble exercer aucun effet régulateur sur l'activité nitrate réductase des cellules de Silène. Ce résultat diffère donc de celui obtenu dans une suspension de Paul's Scarlet Rose où au contraire les ions  $\text{NH}_4^+$  stimulent la croissance et l'activité nitrate réductase des cellules (MOHANTY et FLETCHER, 1976). Enfin, la diminution de croissance de la suspension de Silène ne résulte pas d'une inhibition de l'absorption ou de la réduction des nitrates mais semble liée à une modification de pH du milieu de culture causée par l'ammonium (BRASSART et Coll., 1978).

### B) INFLUENCE D'UNE DOSE ELEVEE D'AMMONIUM (5 mM)

Nous avons cultivé les cellules de Silène en présence d'une source azotée unique, soit nitrique, soit ammoniacale, à la concentration de 5 mM. Comme la présence des ions  $\text{NH}_4^+$  provoque une modification du pH du milieu de culture (BRASSART et Coll., 1978), celui-ci est tamponné par le M.E.S. (acide 2 (N-morpholino) éthane sulfonique) pH 5,9 à la concentration de 50 mM. Etant donné que les nitrates, fournis à la concentration de 5 mM, sont absorbés durant les 6 ou 7 premiers jours de culture (fig.12), le protocole expérimental suivant est adopté : les cellules sont cultivées en présence de la source azotée pendant 7 jours après quoi elles sont transférées dans un milieu neuf renfermant la même source d'azote. Après 7 jours de culture, elles sont à nouveau transférées dans un milieu identique. Le schéma suivant résume les différentes étapes :



Afin d'étudier l'action éventuelle du M.E.S. sur l'activité nitrate réductase, celui-ci est ajouté également au milieu contenant des nitrates au cours du 2ème passage.

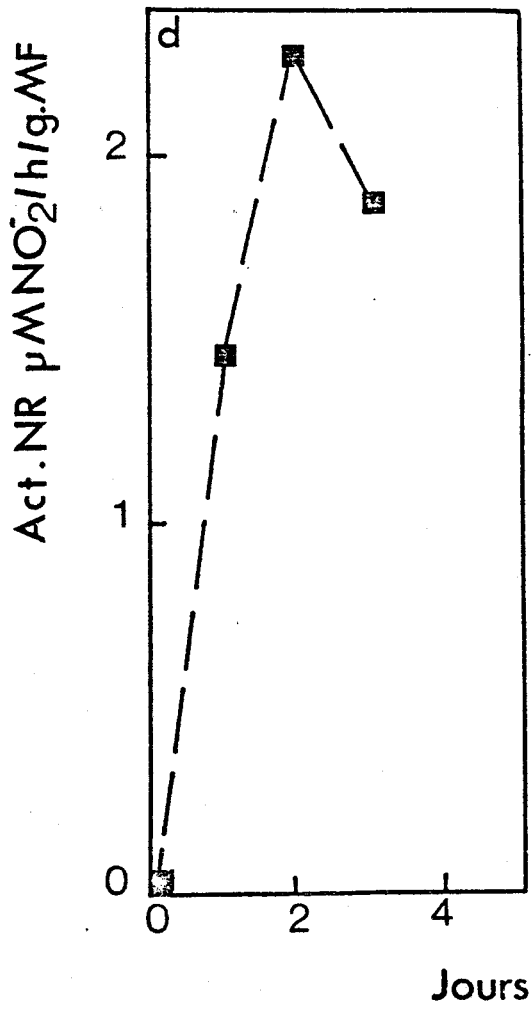
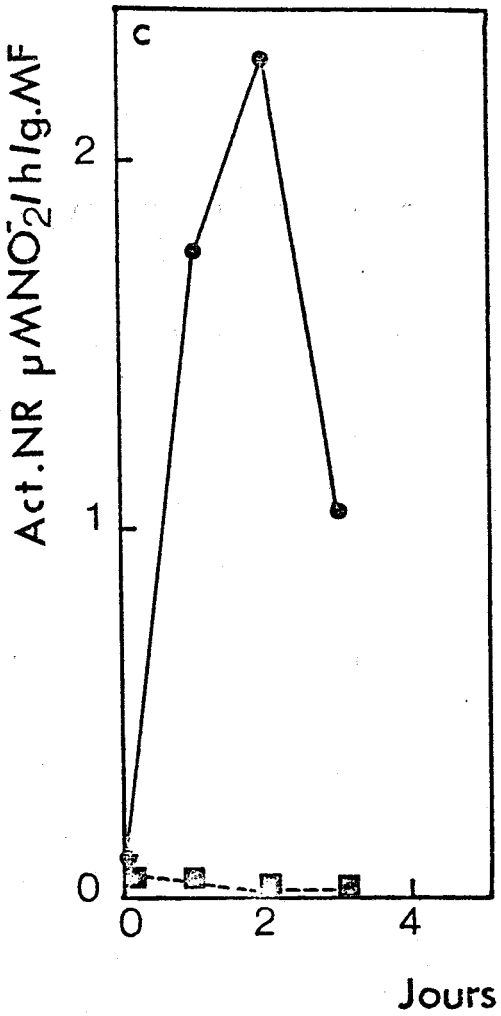
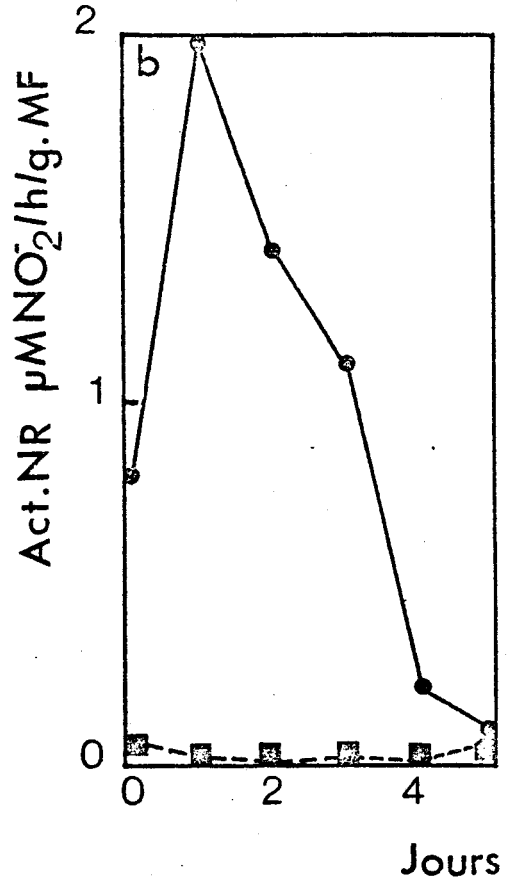
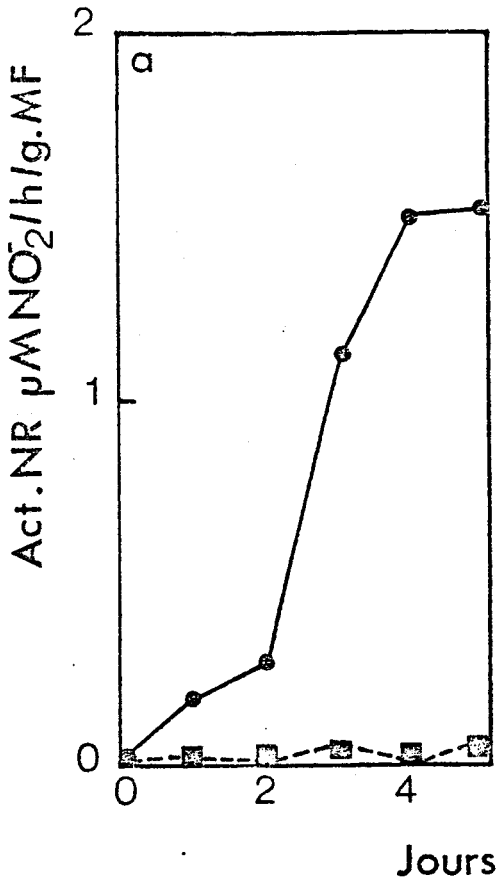


Fig 17

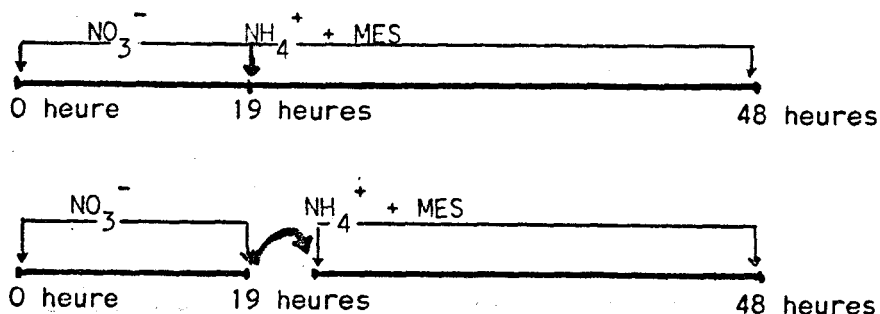


Les résultats obtenus (fig. 17, a b et c) montrent que : 1) l'activité nitrate réductase est nulle dans les cellules cultivées en présence d'ammonium 2) le M.E.S. ne modifie pas l'activité enzymatique (fig. 17 b) 3) lorsque les cellules sont cultivées pendant 14 jours en présence d'ammonium seul et qu'elles sont ensuite transférées sur un milieu ne contenant que des nitrates, elles présentent à nouveau les variations habituelles de l'activité nitrate réductase (fig. 17 d).

Nos observations confirment celles faites par OAKS (1974) chez le Soja mais sont en contradiction avec celles faites par ZINK et VELIKY (1977) dans les cellules d'Ipomoea qui possèdent en présence d'ammonium seul, une activité enzymatique égale à 25 % de celle des cellules cultivées sur le milieu habituel.

L'ammonium n'a pas d'effet toxique sur les cellules de Silène cultivées en milieu tamponné puisque leur croissance n'est que légèrement réduite et que leur transfert dans un milieu nitrique permet l'apparition d'une activité nitrate réductase identique à celle obtenue dans les conditions habituelles (fig. 17 d).

Afin de déterminer le mode d'action de l'ammonium (5 mM) sur l'activité nitrate réductase, nous avons cultivé : les cellules pendant 19 heures dans un milieu ne contenant que des nitrates (5 mM). L'ammonium et le M.E.S. sont ajoutés au milieu au cours de la culture. Parallèlement, des cellules âgées de 19 heures sont transférées dans un milieu tamponné par le M.E.S. et ne renfermant que des ions  $\text{NH}_4^+$ . Le procédé expérimental peut être schématisé comme suit :



Dans les deux conditions expérimentales, les ions  $\text{NH}_4^+$  entraînent une diminution immédiate de l'activité nitrate réductase dans les cellules (fig. 18 a et b). Le fait que la chute de l'activité enzymatique survienne rapidement, moins de 2 heures après l'introduction de l'ammonium que le milieu renferme (fig. 18a) ou non (fig. 18b) des nitrates, suggère que l'ion  $\text{NH}_4^+$

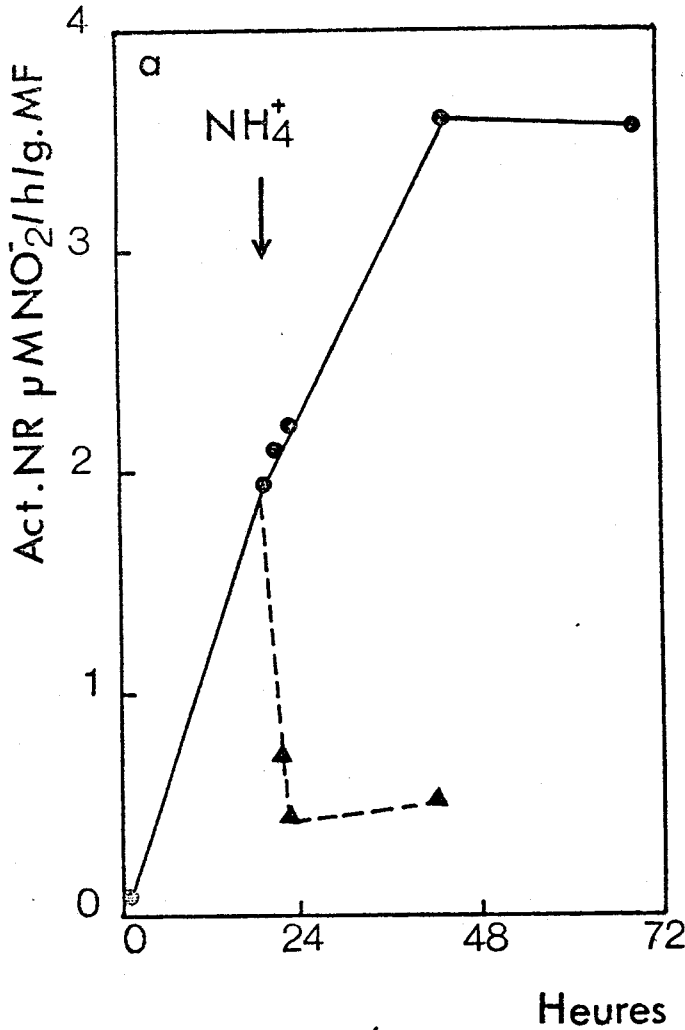
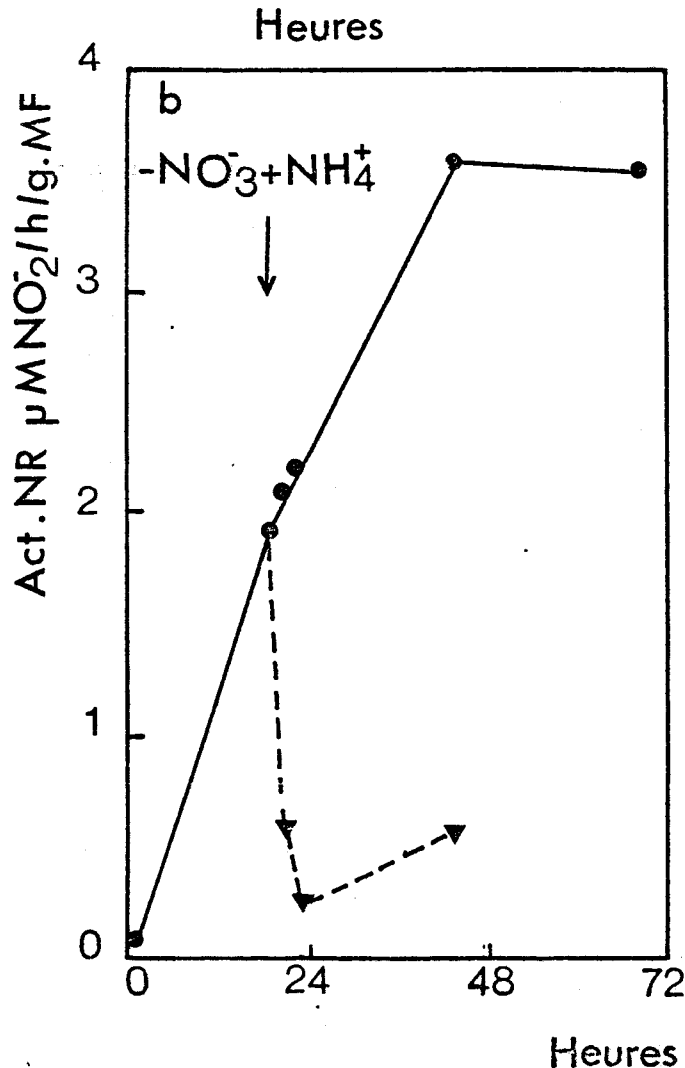


Fig. 18 : Action de l'ammonium (5 mM.l<sup>-1</sup>) et du MES (50 mM.l<sup>-1</sup>) introduits au cours de la culture sur l'activité N.R. mesurée in vivo.

a) on mesure l'activité N.R. de cellules cultivées dans un milieu renfermant 5 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (●—●) après 19 h, on ajoute NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et le MES aseptiquement et l'on suit l'évolution de l'activité enzymatique (▲---▲).

b) les cellules sont cultivées en présence de 5 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Après 19 h, elles sont transférées dans un milieu ne contenant que du MES et du NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

(les symboles utilisés sont les mêmes que ceux employés en a)



affecte directement l'enzyme. Ces observations diffèrent de celles de ZINK et VELIKY (1977) qui constatent que l'addition d'ammonium effectuée 3 jours après le transfert des cellules d'Ipomoea ne provoque pas une baisse de leur activité nitrate réductase. De même, elles s'opposent à celles de KINSKY (1961) qui montre que le composé ne stoppe, ni ne réduit la synthèse de l'enzyme de Neurospora crassa lorsqu'elle est déjà commencée.

Chez Silene alba, l'ammonium peut modifier la structure de l'enzyme et la rendre inactive comme ceci a été montré chez la chlorelle (LOSADA et Coll., 1970). Il peut aussi intervenir par un processus de rétroinhibition comme chez le riz (SHEN, 1969). D'autre part, certains travaux ont démontré que l'ammonium peut inhiber la synthèse de l'enzyme (KINSKY, 1961 ; COVE, 1966 ; BEHREND et MATELES, 1975). La rapidité avec laquelle se manifeste l'action de l'ion  $\text{NH}_4^+$  sur l'activité enzymatique des cellules de Silène, semble exclure cette dernière éventualité d'autant plus que la durée de vie de la protéine enzymatique peut être de plusieurs heures.

### C) CONCLUSION

L'ammonium, employé à faible dose (2 mM) en présence de nitrates, réduit la croissance des cellules de Silène mais n'affecte pas leur capacité d'utiliser les nitrates.

A dose élevée (5 mM) et en absence de nitrates, l'ammonium permet la croissance des cellules mais elles sont alors dépourvues d'activité nitrate réductase. Lorsque les cellules présentent une activité enzymatique élevée, l'addition d'ammonium (5 mM) diminue rapidement celle-ci. Dans ces conditions, le produit final de la réduction des nitrates, exerce un effet régulateur sur la nitrate réductase. Les résultats obtenus sont toutefois trop peu nombreux pour permettre d'expliquer à quel niveau se produit la régulation de l'enzyme.

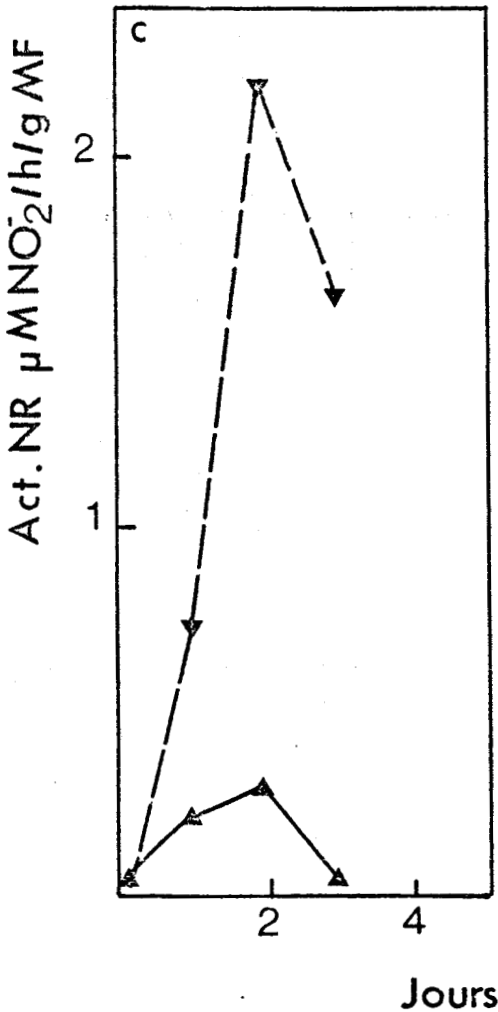
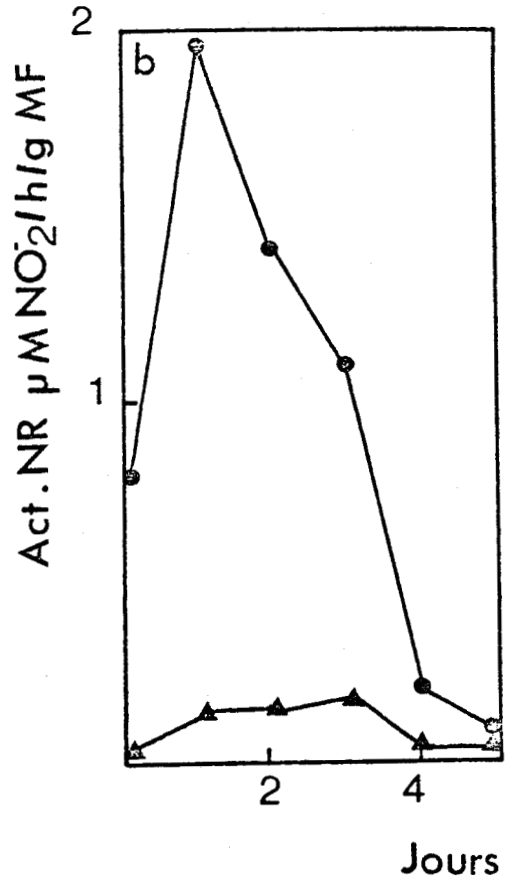
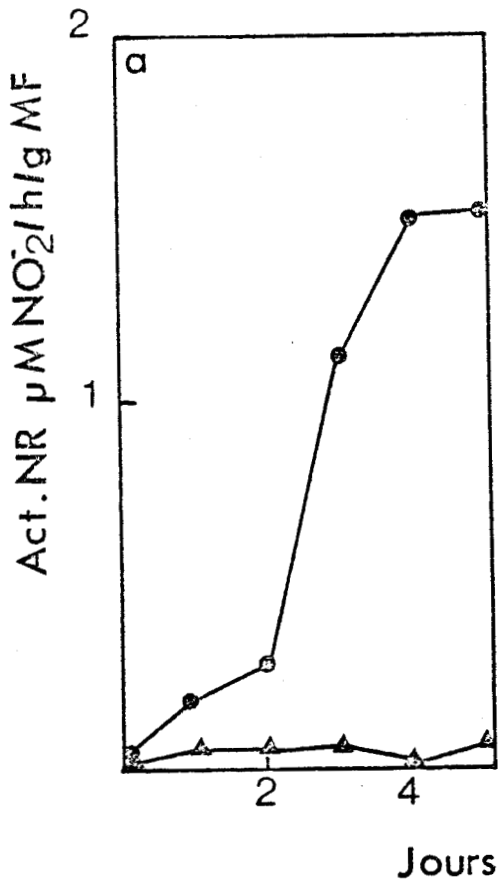


Fig. 19 : Action du glutamate ( $5 \text{ mM.l}^{-1}$ ) sur l'activité N.R. mesurée *in vivo*.

Pendant des périodes de 7 jours on suit l'évolution de l'activité N.R. de cellules cultivées soit en présence de nitrates (●—●) soit en présence de glutamate (▲—▲)

a) premier passage

b) second passage

c) troisième passage (▲—▲)

les cellules ont été cultivées pendant deux périodes de 7 jours en présence de glutamate puis elles sont transférées sur un milieu contenant des nitrates (▼—▼).

#### V) ETUDE DE L'INDUCTION DE L'ENZYME

Nous avons montré précédemment que si l'azote est introduit dans le milieu de culture sous forme ammoniacale, l'activité nitrate réductase n'apparaît pas (fig. 17, a, b, c). La présence d'ions nitriques permet au contraire de voir se développer très rapidement l'activité enzymatique (fig. 17 d).

L'importance de l'azote nitrique dans l'apparition de l'activité enzymatique est confirmée par l'expérience suivante : les cellules de Silène sont cultivées pendant 14 jours dans un milieu contenant 5 mM de glutamate. L'activité nitrate réductase mesurée à des intervalles réguliers est alors très faible (fig. 19, b). Le transfert dans un milieu renfermant des nitrates provoque une brusque élévation de l'activité enzymatique (fig. 19 c).

Par ailleurs, nous avons vu que la quantité de nitrates dans le milieu de culture de base est vraisemblablement trop élevée et que l'évolution de l'activité enzymatique ne suit pas l'absorption des ions. Si, par contre, nous n'introduisons dans le milieu de culture que le quart de la concentration habituelle en nitrates soit 5,42 mM, nous observons une bonne corrélation entre l'absorption de l'azote nitrique et l'activité enzymatique.

Nous nous sommes donc proposés d'étudier les mécanismes de contrôle de la réduction des nitrates. On peut en effet se demander si l'apparition puis la disparition de l'activité enzymatique est liée à la variation de la concentration en substrat ou en co-substrat (coenzyme contenant le molybdène) ou à une diminution de la synthèse protéique.

Or, on a montré que chez certains végétaux supérieurs, l'enzyme était inductible (voir historique), d'autre part, nous avons vu que la modification de la concentration en nitrates ne modifiait pas sensiblement la durée du pic d'activité de l'enzyme dans notre matériel.

Il apparaît donc que chez le Silène, l'enzyme est vraisemblablement induite. Aussi, avons-nous voulu vérifier cette hypothèse soit par des essais de réinduction de l'enzyme soit par l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription et de la synthèse protéique. Enfin, nous avons étudié la nature de l'inducteur.

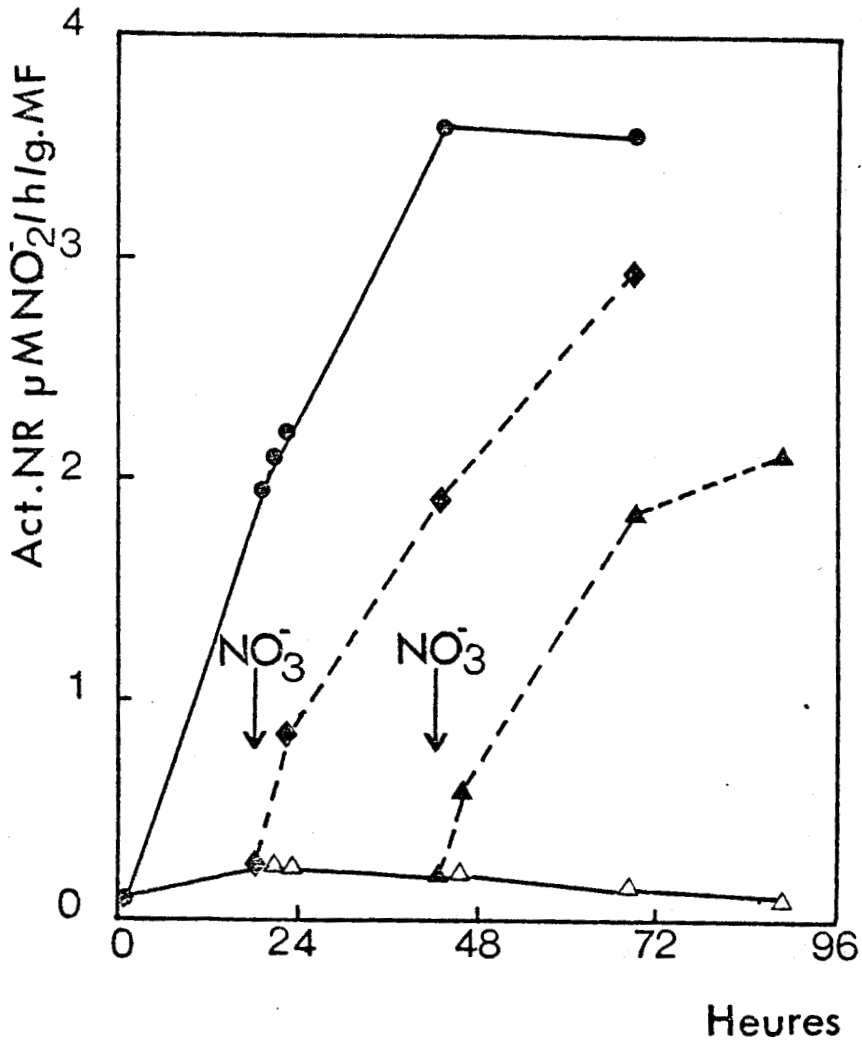


Fig. 20 : Induction de la nitrate réductase par des nitrates introduits à différents moments de la culture ( ↓ ).

Les cellules sont cultivées dans un milieu contenant  $25 \mu\text{g.l}^{-1}$  de molybdène puis on mesure l'activité N.R. in vivo à différents temps de culture.

L'addition de  $\text{NO}_3^-$  se fait soit dès le début de la culture

(●—●) soit après 19 h (◆—◆) soit après 43 h (▲—▲)

(△—△) : le milieu est carencé en azote.



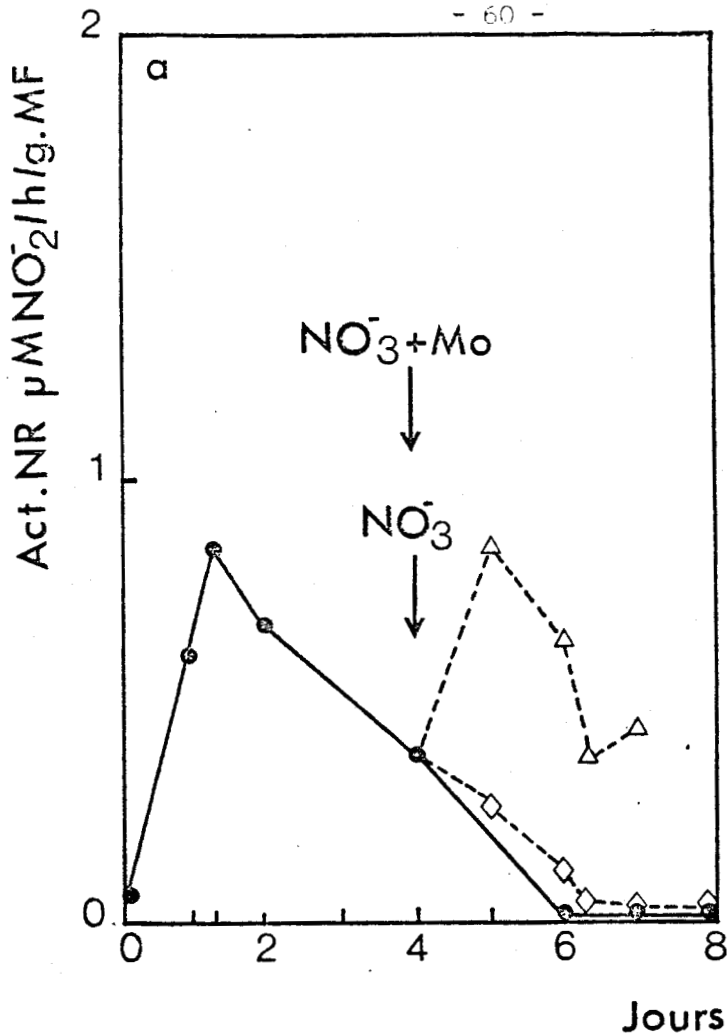
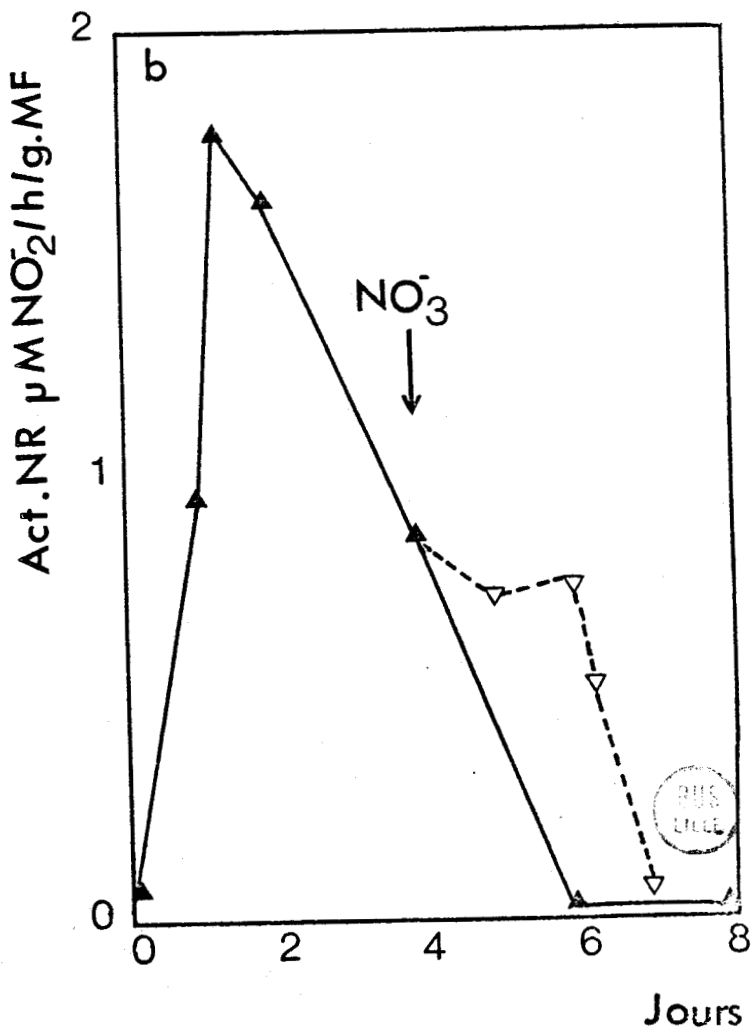


Fig. 21 : Action de  $\text{NO}_3^-$  seul ou associé à Mo sur la réinduction de la nitrate réductase.

Les activités N.R. sont mesurées in vitro.

a) les cellules sont cultivées dans un milieu contenant  $\text{NO}_3^-$  mais carencé en Mo (●—●) puis on ajoute soit  $\text{NO}_3^-$  (◇---◇) soit  $\text{NO}_3^- + \text{Mo}$  (△---△)

b) les cellules sont cultivées en présence de  $\text{NO}_3^- + \text{Mo}$  (▲—▲) puis on introduit  $\text{NO}_3^-$  au 4e jour de culture (▽---▽)



PLUS TARD

#### A) EXPERIENCES DE REINDUCTION DE L'ENZYME

Afin de simplifier l'interprétation de nos résultats, nous avons utilisé un milieu ne contenant que 5,4 mM de nitrates. Dans ce cas, il est vraisemblable que les phénomènes de transfert de l'ion d'un "pool" de stockage dans un "pool" métabolique sont réduits et ne masquent pas les modifications de l'activité enzymatique.

Dans une première série expérimentale, les cellules sont cultivées en présence de nitrates et de molybdène. Nous voyons alors (fig. 20), que l'activité nitrate réductase apparaît très vite et atteint une valeur maximale vers la 40e heure. Si par contre, l'introduction des nitrates est retardée de 24 ou 48 heures, l'activité enzymatique est elle-même retardée ; les pentes des courbes d'activité sont alors pratiquement identiques à celles de la courbe témoin.

Dans une seconde série d'expériences, les éléments minéraux sont ajoutés plus tardivement alors que l'activité enzymatique décroît.

Deux types de manipulation ont été effectués. Dans un cas, le milieu de culture initial ne contient pas de molybdène. L'activité enzymatique se développe normalement mais la hauteur du pic reste faible. L'introduction de nitrates seuls prolonge légèrement la durée de l'activité, par contre, si on leur associe du molybdène, il apparaît un second pic d'activité enzymatique (fig. 21 a).

Dans un second cas, le milieu de culture initial contient du molybdène, on s'aperçoit alors que l'activité enzymatique est importante puis décroît. L'addition de nitrates le 4e jour de culture provoque l'apparition d'un second pic d'activité plus faible que le premier (fig. 21 b).

Au vu de ces expériences, on peut donc penser à une induction de la synthèse enzymatique par les nitrates.

Nous avons voulu confirmer cette hypothèse par l'emploi d'inhibiteurs métaboliques tels que la 6-méthylpurine et la cycloheximide.

B) UTILISATION D'INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTION ET DE LA TRADUCTION

Nous avons utilisé d'une part la 6-méthylpurine: qui a été utilisée avec succès dans l'inhibition de l'ARN messager de l'isocitrate lyase chez Chlorella pyrenoidosa. Son action est immédiate au niveau de la transcription et progressive sur la synthèse protéique (MAC CULLOUGH et JOHN, 1972). Des expériences préliminaires nous ont permis de déterminer que la dose efficace dans notre matériel est de  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  concentration qui s'est révélée ne pas être toxique pour les cellules pendant la durée de l'expérimentation.

Lorsque l'inhibiteur est ajouté dès le début de l'expérience, l'activité enzymatique mesurée après 24 heures de culture est réduite de 92 % (fig. 22). L'apparition de la nitrate réductase dépend donc de la transcription d'ARN messagers nitrate réductase et exclut la possibilité de traduction d'ARN messagers à longue durée de vie, mis en évidence chez les végétaux (IHLE et DURE, 1969).

Nous avons par ailleurs utilisé des inhibiteurs de la traduction tels que la cycloheximide qui bloque l'initiation des chaînes peptidiques en inhibant la progression du mRNA le long des ribosomes (JAVILLIER et coll. 1972). La dose efficace de cycloheximide non toxique pour les cellules de Silène est de  $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Lorsqu'elle est introduite dès le début de la culture, l'inhibition de l'activité enzymatique atteint 80 % après 24 heures (fig. 22)

TABLEAU I : Action de la cycloheximide sur l'activité N.R. des cellules de Silène.

|                | ACTIVITE N.R. EXPRIMEE<br>EN $\mu\text{M}$ DE $\text{NO}_2^-$ FORME |                                  |
|----------------|---|----------------------------------|
|                | par h. et par g.M.F   | par h. et par mg.<br>de protéine |
| TEMOIN         | 3,718   | 0,102                            |
| inhibition (%) | 0   | 81,5                             |
| CYCLOHEXIMIDE  | 0,689   | 0,024                            |
| inhibition (%) | 0   | 77,8                             |

*La cycloheximide ( $4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) est ajoutée dès le début de la culture, les activités N.R. sont mesurées 24 h plus tard (in vitro)*

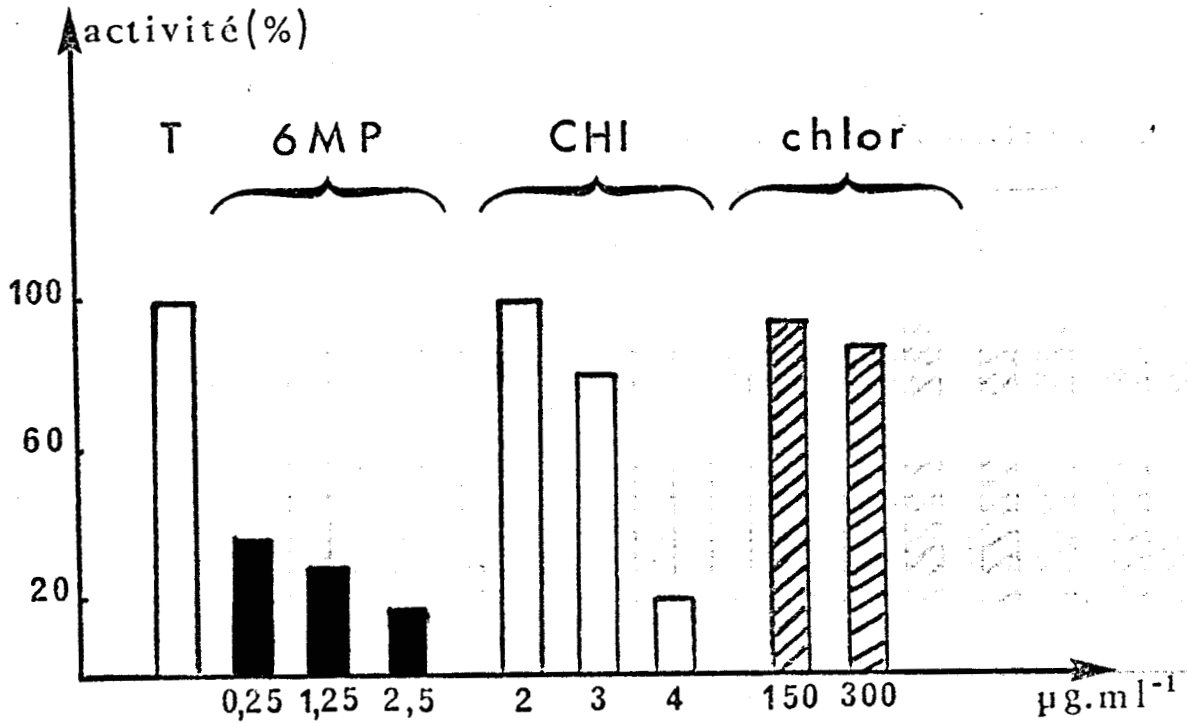


Fig. 22 : Action de divers inhibiteurs sur l'activité N.R.

Les inhibiteurs sont ajoutés dès le début de la culture,

les activités mesurées après 24 h. Une activité de

100 % correspond à la formation de  $0,82 \mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  de matière fraîche.

T = témoin ; 6 M P = 6-méthyl purine

C H I = cycloheximide ; chlor = chloramphénicol



Comme il a été montré que la cycloheximide n'est pas un inhibiteur spécifique de la synthèse protéique in vivo (Mc MAHON, 1971) et que ses effets varient selon la concentration à laquelle elle est utilisée (DELSENY, 1977), nous avons voulu savoir si dans nos conditions expérimentales, elle était inhibitrice de la synthèse protéique. Nous l'avons donc introduite dans le milieu dès le transfert des cellules et nous avons procédé à un marquage de protéines synthétisées lors des 24 premières heures de la culture, en fournissant pendant une heure, à intervalles réguliers, de la leucine tritiée ( $2,5 \mu\text{Ci} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Les cellules sont ensuite recueillies, lavées, broyées et traitées par une solution à 5 % d'acide trichloracétique à 4°C pendant une nuit. La radioactivité des fractions acidosolubles et acidoprécipitables est mesurée. Les résultats sont reportés dans le tableau II.

Il apparaît que dans une culture témoin, l'absorption de la  $^3\text{H}$  Leucine et son incorporation dans la fraction protéique acidoprécipitable s'effectuent rapidement après le transfert des cellules.

L'apport de cycloheximide provoque toujours un accroissement de la radioactivité intracellulaire et une inhibition de l'incorporation de l'acide aminé dans la fraction précipitée par l'acide.

L'absorption de la leucine par les cellules traitées est donc multipliée environ par deux, quelle que soit l'heure du prélèvement. Que l'inhibition puisse modifier l'absorption d'acides aminés a déjà été signalé chez Chlamydomonas reinhardi Dangeard (Mc MAHON, 1975).

Il nous a donc paru indispensable de rendre compte de cette modification de l'absorption de la leucine marquée dans l'estimation des variations de la synthèse protéique. Le calcul du rapport radioactivité incorporée/ quantité de c.p.m incorporés + quantité de c.p.m de la fraction acidosoluble permet de relier le marquage de la fraction protéique à la fréquence du marquage du pool métabolique lors de la synthèse, quelles que soient les conditions expérimentales.

Il apparaît donc que le cycloheximide inhibe fortement la synthèse protéique pendant au moins 18 heures et que son inhibition reste importante après 24 heures.

Parmi d'autres substances inhibitrices de la traduction, nous avons utilisé le chloramphénicol qui inhibe la synthèse protéique dans les organites cellulaires en se liant aux ribosomes 70 S (BOTTOMLEY et coll., 1976). La

lumière le dégrade et le rend toxique (HOXMARK et NORDBY, 1977). Nous avons donc été amenés à l'utiliser à l'obscurité et à effectuer quelques études préliminaires.

La lecture du Tableau III montre que l'obscurité ne modifie guère la croissance de la suspension ce qui concorde avec les travaux de DUBOIS et MORVAN (1971). Quant aux activités nitrate réductase, elles ne sont que légèrement diminuées (Tableau IV)

TABLEAU III : Influence de la lumière sur la croissance (poids de matière fraîche) des cellules de Silène.

| Age de la culture<br>(jours) | Poids de matière fraîche/<br>culture (g) |           |
|------------------------------|--|-----------|
|                              | Lumière (500 lux)                        | Obscurité |
| 1                            | 3,000                                    | 3,000     |
| 2                            | 3,260                                    | 3,720     |
| 3                            | 4,780                                    | 6,280     |
| 4                            | 7,120                                    | 8,240     |
| 10                           | 38,300                                   | 42,040    |

TABLEAU IV : Influence de la lumière sur l'activité nitrate réductase.

| Age de la culture<br>(jours) | Activité nitrate réductase<br>( $\mu\text{M NO}_2$ formées/h/g.MF) |           |
|------------------------------|--|-----------|
|                              | Lumière (500 lux)  | Obscurité |
| 1                            | 0,507  | 0,424     |
| 3                            | 0,202  | 0,169     |

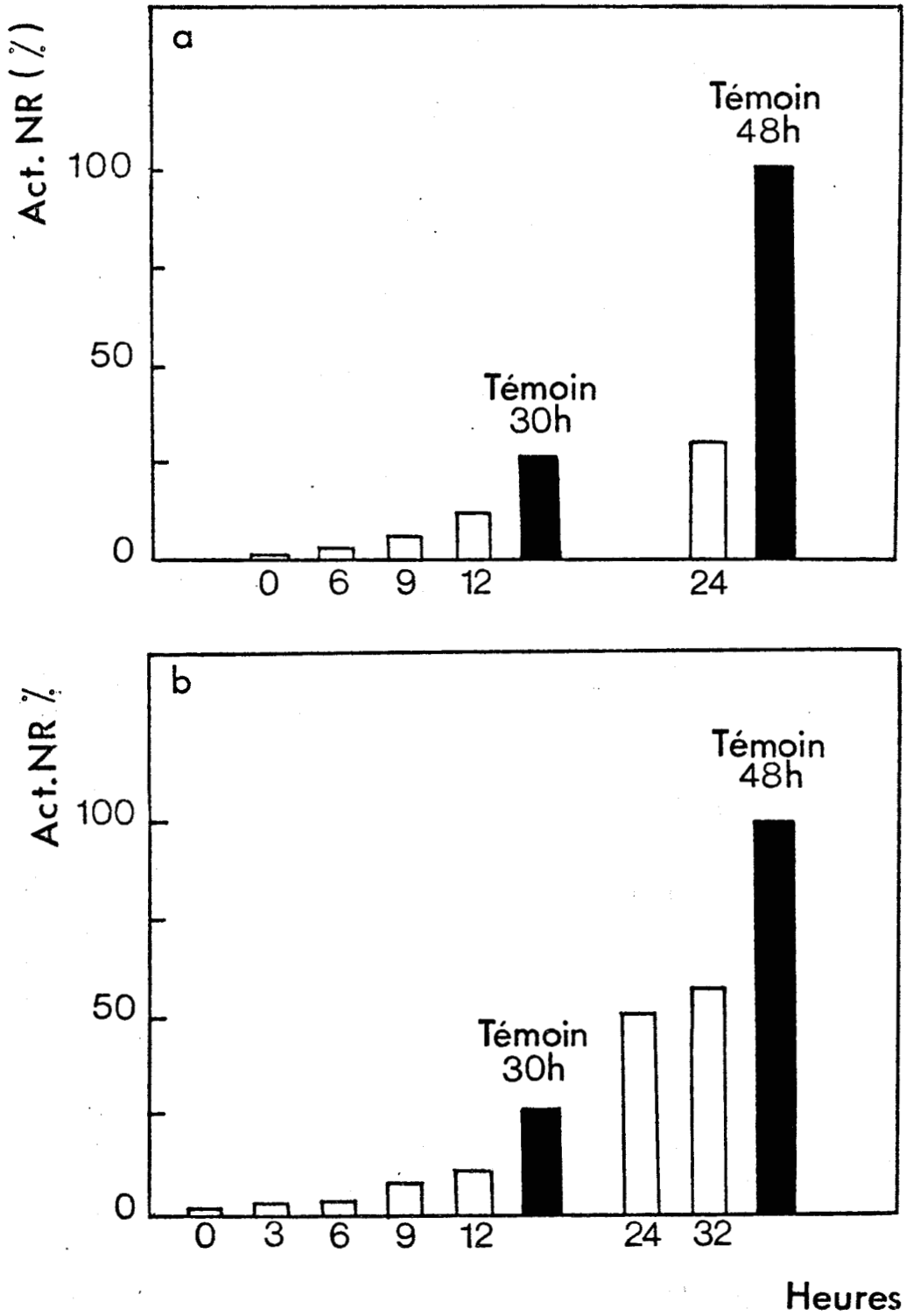


Fig 23



Déjà BEEVERS et HAGEMAN (1969) avaient signalé que la lumière n'intervenait pas dans l'induction enzymatique dans les tissus non chlorophylliens.

Lorsque le chloramphénicol est introduit dans le milieu de culture initial et que l'activité enzymatique est mesurée 24 heures plus tard, on n'observe (fig. 22) qu'une très faible inhibition.

La synthèse enzymatique s'effectue donc au niveau du cytoplasme et non dans les organites qui dans notre matériel, sont constitués presque exclusivement par des mitochondries et quelques proplastides.

Certains auteurs (SLUITERS-SCHOLTEN, 1973) ont obtenu l'inhibition de la synthèse de la nitrate réductase avec de très fortes doses de chloramphénicol. Ils attribuent ce résultat à des effets secondaires pouvant influencer la phosphorylation oxydative.

Dans le cas de cotylédons de radis ou de plantules de maïs, il faut utiliser des doses de 1600 à 3200  $\mu\text{g}$  d'inhibiteur pour supprimer l'induction enzymatique (BEEVERS et coll., 1965). Enfin, on a pu montrer que si la nitrate réductase est bien synthétisée au niveau du cytoplasme, la nitrite réductase l'est dans le chloroplaste (SCHRADER et coll., 1967).

### C) ACTION SEQUENTIELLE DE LA 6-METHYLPURINE ET DE LA CYCLOHEXIMIDE

Ayant montré que la synthèse de la nitrate réductase est induite et qu'elle s'effectue essentiellement au niveau du cytoplasme, nous avons voulu déterminer à quel moment de la culture s'effectuaient la transcription et la traduction.

#### 1) Action de la 6-méthylpurine

Elle est introduite à la dose de 2,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  à différents stades du cycle de croissance. Les activités enzymatiques sont alors mesurées après 30 heures de culture.

Lorsque l'inhibiteur est introduit plus tardivement, la mesure est effectuée après 48 heures.

Les résultats obtenus (fig. 23 b) montrent que l'activité est toujours inhibée mais qu'elle l'est d'autant plus que l'inhibiteur a été ajouté plus tôt. On voit en effet que l'activité est nulle ou très faible si l'addition est effectuée au moment du repiquage ou après 3 heures de culture.



La transcription des gènes codant pour l'enzyme débute donc dans les premières heures qui suivent le transfert des cellules.

## 2) Action de la cycloheximide

Lorsque la cycloheximide est introduite à divers moments de la culture on voit (fig. 23 a) que l'activité enzymatique est inhibée d'autant plus fortement que la substance a été ajoutée plus précocement.

Donc, ici encore la traduction a lieu dans les premières heures qui suivent le transfert et suit de très peu la transcription.

## D) REINDUCTION APRES 5 JOURS DE CULTURE

La nitrate réductase des cellules de Silene alba est donc une enzyme inductible, du moins pendant les premières heures qui suivent le transfert cellulaire dans un milieu neuf. De plus, l'évolution de l'activité enzymatique en fonction du temps de culture présente un pic relativement étroit puisque le maximum se situe vers la 48e heure et qu'elle s'annule vers le 6e jour alors que le milieu de culture de base renferme encore une quantité importante de nitrates. La question se pose donc de savoir comment s'effectue la régulation de la synthèse enzymatique. Nous avons voulu voir s'il était possible de réinduire l'enzyme à un stade plus avancé de la culture, nous avons alors ajouté des nitrates et du molybdène après 5 ou 7 jours de culture.

Les cellules sont cultivées dans un milieu contenant 5 mM de nitrates. Après 5 ou 7 jours, on introduit à la fois des nitrates et du molybdène, puis on mesure les activités enzymatiques à intervalles réguliers. On voit apparaître un nouveau pic d'activité nitrate réductase.

Si on n'introduit que du molybdène, l'activité enzymatique n'est pas réinduite (fig. 24 a).

L'ajout simultané de molybdène, de nitrates et de 6 méthylpurine permet l'apparition d'une très faible activité enzymatique qui chute rapidement. Si l'inhibiteur n'est ajouté qu'au 6e jour, alors que les substances minérales l'ont été au 5e jour de culture, la chute de l'activité enzymatique intervient rapidement (moins de 6 heures après l'application de l'inhibiteur) (fig. 24 b).

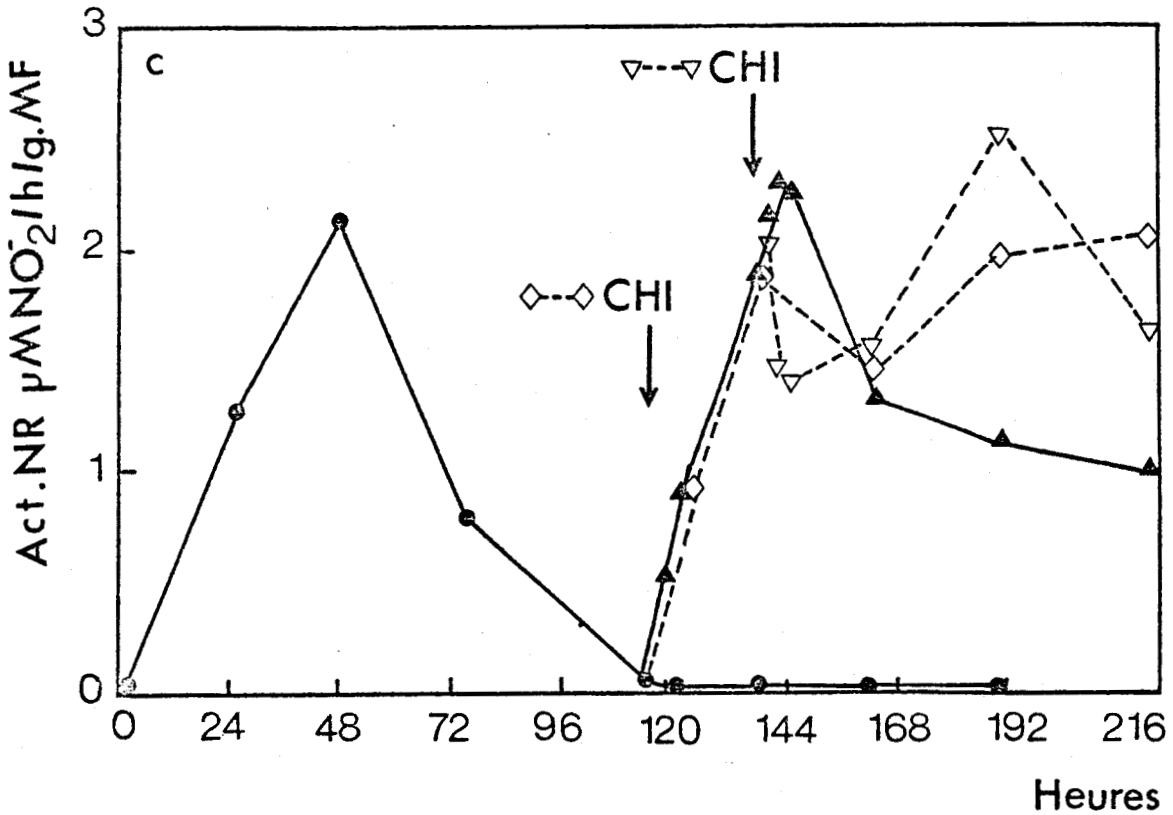


Fig. 24 : Réinduction de la nitrate-réductase.

Les activités N.R sont mesurées *in vivo*. Les cellules sont cultivées en présence de 75 mg/l d'azote nitrique. ●—●

a) au 5e jour de culture, on introduit soit du molybdène (25 μg/ml) (▲---▲), soit des nitrates (5 mM/l) + Mo (▲---▲) (◆—◆) introduction de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + Mo après 7 jours de culture.

b) après 5 jours de culture, on introduit NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + Mo + 6 M P (2,5 μg/ml) (◆--◆) ou bien on ajoute NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + Mo au 5e jour et la 6 M P 24 h plus tard (▽---▽). La courbe (▲—▲) représente l'activité observée lorsqu'on a introduit NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + Mo.

c) au 5e jour de culture, on ajoute la cycloheximide (CHI) (4 μg/ml) + NO<sub>3</sub> + Mo (◆---◆) ou bien on n'introduit la cycloheximide que 24 h après avoir fourni NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + Mo (▽---▽).



Une expérience semblable menée avec la cycloheximide conduit aux résultats reportés dans la figure 24 c). L'activité enzymatique chute pendant un temps très court avant d'augmenter à nouveau, que l'inhibiteur ait été ajouté en même temps que les sels minéraux ou 24 heures plus tard.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'enzyme est bien inductible et que l'inducteur est l'ion nitrate.

Le molybdène n'interviendrait pas comme inducteur et ne provoquerait donc pas une synthèse d'unités protéiques constitutives de l'enzyme, mais sa présence serait nécessaire en tant que cofacteur et permettrait le transport des électrons lors de la réduction (VEGA et coll., 1971, NICHOLAS et NASON 1954 a - 1955). Récemment, JONES et Coll. (1978) ont d'ailleurs suggéré que le métal active rapidement l'enzyme indépendamment de toute synthèse protéique.

Le molybdène serait un facteur limitant de l'activité enzymatique et son absence empêcherait tout fonctionnement de l'enzyme alors que les unités protéiques seraient présentes. Cette hypothèse ne pourra être confirmée que par l'étude de la structure de l'enzyme.

Les résultats obtenus lors de l'emploi de la cycloheximide peuvent surprendre dans la mesure où l'inhibition de l'activité enzymatique n'est pas totale lorsqu'elle est ajoutée après 5 ou 7 jours de culture. Il est probable qu'on assiste dans ce cas, à un effet de dilution de l'inhibiteur : à ce stade de la culture, la quantité de cellules s'est accrue et la dose de cycloheximide par cellule est donc plus faible que lorsqu'elle est ajoutée au début du cycle de croissance. L'inhibition de la synthèse protéique est alors réduite et transitoire.

#### E) CONCLUSIONS

Nous avons donc montré que la nitrate réductase des cellules de Silene alba cultivées en suspension cellulaire est inductible et que l'inducteur est l'azote nitrique, le molybdène, quant à lui agirait plutôt comme activateur de l'enzyme. L'enzyme peut être réinduite lors du cycle de croissance comme c'est le cas dans les racines de maïs (OAKS et Coll., 1972).

Dans les conditions expérimentales utilisées la diminution rapide de l'activité enzymatique au cours du cycle de croissance est étroitement liée à l'absorption des nitrates. Le problème cependant devient plus complexe, lorsque le milieu de culture en contient 4 fois plus. Dans ce cas,

en effet, le pic d'activité enzymatique est plus élevé mais il n'est pas plus large. Ainsi, malgré la présence d'une concentration encore importante d'azote nitrique dans le milieu de culture, l'activité enzymatique s'arrête au 6e jour, alors que l'absorption continue. On peut envisager plusieurs hypothèses :

Certains auteurs (SMITH et THOMPSON, 1971 a et b, ASLAM et OAKS, 1975) ont montré que l'induction enzymatique peut être inhibée par de fortes concentrations de nitrate. Chez Silene alba, l'introduction de concentrations croissantes de nitrates dans le milieu (2,71 - 5,42 - 10,84 - 21,71 mM) provoque un accroissement de l'activité nitrate réductase mais n'en modifie guère la durée, sauf pour la plus faible dose. La régulation de l'activité enzymatique ne répond donc pas à ce modèle.

ZIELKE et FILNER (1971) ont étudié l'activité nitrate réductase d'une suspension cellulaire de tabac ; ils pensent que l'enzyme subit un turnover constant et qu'elle est contrôlée par les modifications des taux de synthèse et de dégradation. Cependant, les facteurs qui influent sur ces changements ne sont pas déterminés.

On peut penser à une action de l'ammonium qui favoriserait la dégradation de l'enzyme. Mais cette hypothèse n'a été que très rarement vérifiée chez les végétaux supérieurs. OAKS et ses collaborateurs (1971) supposent qu'il apparaît à certains moments un système d'inactivation de l'enzyme ce qui explique les chutes d'activité. Là encore, la nature de l'inhibiteur reste à déterminer.

Un autre modèle théorique nous a paru intéressant. Il se pourrait que les nitrates absorbés soient répartis en divers compartiments cellulaires dont les fonctions seraient différentes. Certains ions participent à un "pool" de stockage, d'autres à un "pool" d'induction (HEIMER et FILNER, 1971 - FERRARI et Coll., 1973).

La vérification d'une telle conception n'est guère aisée et demande un important travail expérimental qui ne pouvait être entrepris dans le cadre de cette étude.

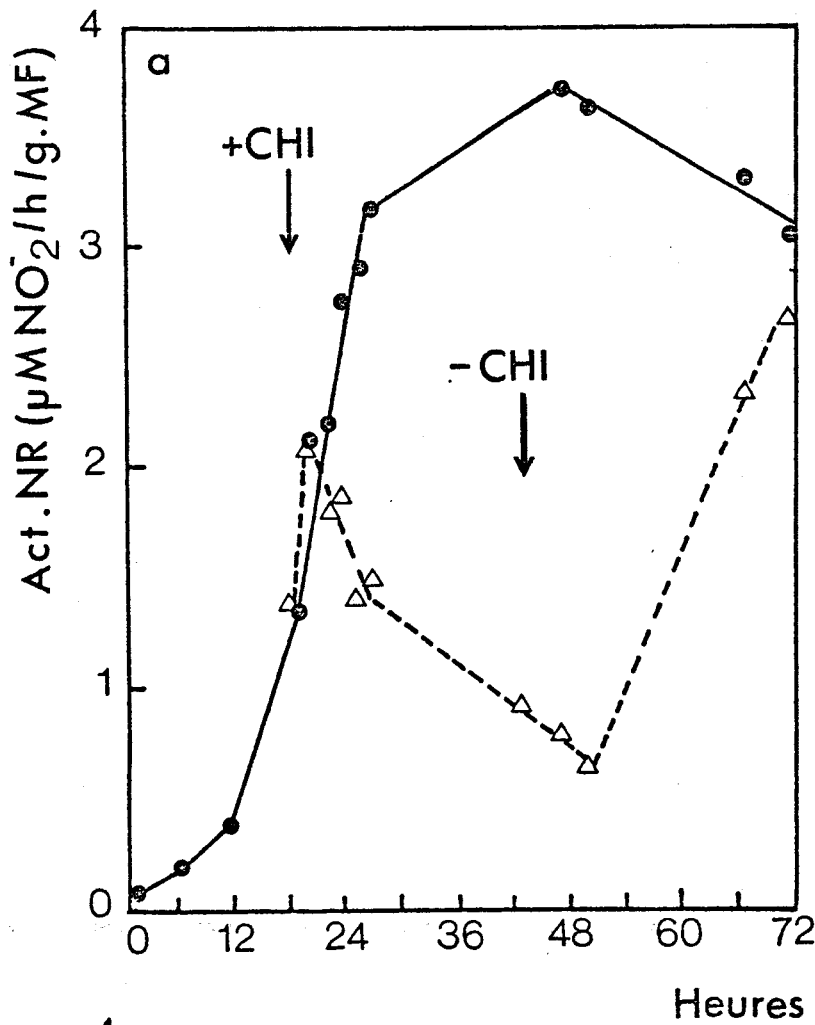
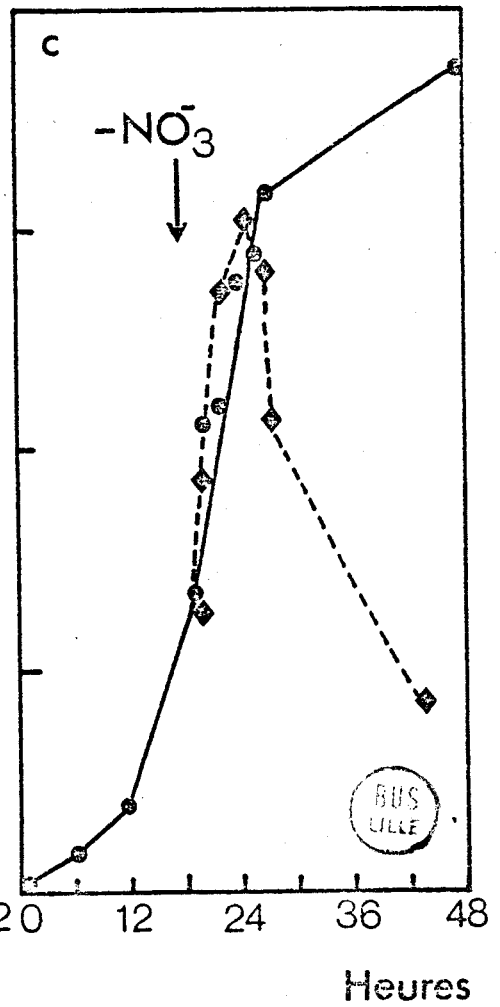
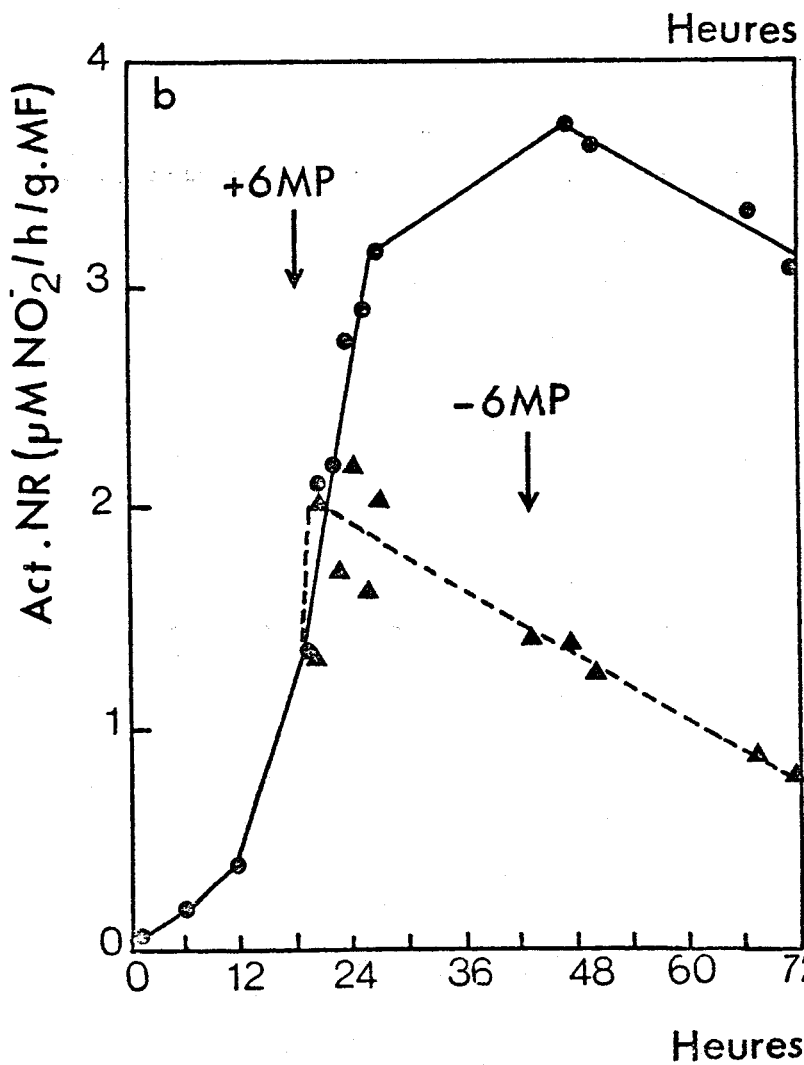


Fig 25



#### VI) CALCUL DE LA DUREE DE VIE DE L'ENZYME

La nitrate réductase est inductible mais sa période d'activité s'étend sur une faible période du cycle de culture. Nous avons essayé d'étudier son renouvellement et nous avons tenté d'évaluer sa durée de vie.

Les cellules sont donc cultivées dans le milieu de culture habituel enrichi en molybdène ( $25 \mu\text{g l}^{-1}$ ) pendant 18 heures de façon à ce que l'activité nitrate réductase soit élevée, sans pourtant avoir atteint son maximum.

On ajoute alors soit de la 6-méthylpurine ( $2,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) soit de la cycloheximide ( $4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Ou bien on transfère les cellules sur un milieu carencé en azote. Puis on mesure l'activité enzymatique. Les mesures d'activité sont alors effectuées selon la méthode de dosage "in vivo".

Les résultats reportés dans la figure 25 indiquent que l'activité enzymatique continue à augmenter pendant encore 1 h 30 environ avant de chuter brutalement. Il est remarquable que la perte d'activité apparaît plus rapidement lors de l'emploi d'un inhibiteur que lors du transfert sur un milieu carencé. En ce qui concerne la vitesse de la perte d'activité c'est l'inverse qui se produit.

Nous confirmons donc la nature inductible de l'enzyme et le caractère inducteur de l'azote nitrique.

Le délai observé entre l'introduction d'un inhibiteur métabolique et la chute d'activité s'explique par le fait que les vitesses d'absorption des substances peuvent varier avec leur nature. De plus, leur action au niveau de la transcription ou de la traduction n'est pas immédiate.

Il est vraisemblable que les processus de synthèse des protéines ou de transcription de l'ADN qui ont été amorcés avant l'adjonction des inhibiteurs, continuent.

Le fait que le délai entre le passage d'un milieu inducteur à un milieu carencé et la chute de l'activité enzymatique soit plus long que lors de l'utilisation d'un inhibiteur, peut s'expliquer par une nouvelle distribution des nitrates intracellulaires lors du passage en milieu carencé. Selon l'hypothèse précédemment citée, de HEIMER et FILNER (1971) et FERRARI et Coll. (1973), on peut imaginer que des ions du "pool" de stockage sont

reversés dans le "pool" inducteur. Ce passage permettrait ainsi une survie des cellules placées en conditions défavorables.

Il faut enfin remarquer que les courbes de croissance de l'activité enzymatique présentent deux pentes distinctes. On peut se demander s'il n'existe pas des enzymes caractérisées par des vitesses de renouvellement et des origines différentes. On a en effet montré chez certains eucaryotes qu'il existait deux classes d'ARN polydisperses présentant des durées de vie très dissemblables.

Les résultats de la figure 25 ont été reportés dans un système de coordonnées semi-logarithmiques (SCHRADER et Coll. 1968 - OAKS et Coll. 1972). La décroissance de l'activité enzymatique apparaît alors comme une fonction linéaire du temps et il devient aisé de déterminer graphiquement la durée de demi-vie de l'enzyme.

Selon la méthode expérimentale utilisée, nous aboutissons aux résultats suivants : 6 H 18 min., lors d'un transport dans un milieu carencé 8 H 30, lors de l'utilisation de la 6 méthylpurine et 11 H si l'inhibiteur employé est la cycloheximide

Les trois procédés utilisés dans la détermination de la durée de demi-vie de l'enzyme n'ont pas la même signification. La cycloheximide en bloquant la synthèse protéique devrait être le moyen permettant d'évaluer avec le plus d'exactitude, la décroissance de l'activité. La 6-méthylpurine ou le transfert dans un milieu carencé empêchent la transcription mais n'inhibent pas la traduction des messagers existants. Ces deux dernières méthodes mesurent donc et la durée de vie de l'ARN messager et celle de la protéine. Comme les résultats publiés par d'autres chercheurs (OAKS et STEVENS ou SCHRADER et Coll., 1967, JONES et Coll., 1978) attribuent à ces ARN des durées de vie de l'ordre de 20 à 30 min., nous avons dans un premier temps, décidé de négliger ce facteur et de comparer globalement les résultats obtenus par les trois méthodes décrites.

La variabilité des résultats s'explique aussi par le fait que les inhibiteurs ne peuvent être utilisés à des doses trop importantes qui provoqueraient la mort des cellules. Dans ces conditions, l'inhibition des processus de la transcription et de la traduction n'est jamais totale, d'autant plus que nous nous sommes toujours placés dans des conditions expérimentales permettant la reprise de la croissance de la suspension par une levée de l'inhibition. On comprend donc que les durées de demi-vie calculées,

sont plus longues, lorsque les cellules ont été mises en présence d'un inhibiteur que lorsqu'elles ont été transférées dans un milieu carencé.

Nos résultats rejoignent cependant ceux obtenus par d'autres chercheurs qui attribuent à la nitrate réductase ses durées de vie allant de 3 à 6 heures dans le cas de feuilles isolées de maïs (ASLAM et OAKS, 1975) ou des tissus de tabac (CHROBOCZEK et Coll., 1971) et même de 24 heures (pour revue voir HEWITT, 1975).

Nos résultats demandent cependant à être vérifiés en utilisant par exemple le tungstène qui est capable de remplacer le molybdène dans la protéine en la rendant inactive.

#### VII) ESSAI DE CARACTERISATION DE L'INDUCTION ENZYMATIQUE PAR L'ANALYSE EN ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Puisque l'enzyme est inductible, il était tentant d'essayer d'observer sa synthèse à différents stades de la culture en la caractérisant par une méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Des extraits de cellules âgées de 0, 3, 6, 9, 12, 15 et 24 heures ont été analysés. Les méthodes concernant les modalités de l'électrophorèse et de la mise en évidence de l'activité enzymatique dans le gel ont été décrites au chapitre des méthodes.

Dans des conditions d'extraction de dépôt et d'électrophorèse identiques pour chaque lot de cellules, l'activité enzymatique n'est décelée dans le gel qu'avec l'extrait obtenu à partir de cellules âgées de 24 heures. Après les opérations de coloration et de décoloration, les électrophorégrammes présentent les mêmes bandes protéiques, mais l'intensité de leur coloration augmente avec l'âge des cellules. Ceci montre que le transfert des cellules de 14 jours dans un milieu neuf, déclenche des processus de synthèse protéique et confirme les résultats de DUBOIS et Coll. (1976).

L'impossibilité de caractériser l'enzyme dans des extraits provenant de cellules âgées de moins de 24 heures est la conséquence de deux faits :



- d'une part, l'enzyme est très instable après son extraction et sa caractérisation ne peut donc se faire en fin de migration que dans des extraits qui en sont riches.

- d'autre part, comme nous avons manipulé des extraits bruts, plusieurs protéines peuvent migrer au même niveau dans le gel et il devient impossible de caractériser une bande protéique présentant une activité nitrate réductase.

L'étude de l'apparition de l'enzyme par cette méthode n'est possible qu'avec des préparations enzymatiques purifiées.

#### VIII) ESSAIS D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION DE LA NITRATE REDUCTASE

Nous avons vu que l'enzyme est synthétisée dans la suspension cellulaire de Silene alba au cours des premières heures qui suivent le transfert des cellules dans un milieu neuf.

Comme l'activité ne se développe que pendant un temps relativement court, on peut espérer que la synthèse de la nitrate réductase représente un signal biochimique permettant de caractériser une étape importante du cycle de croissance de la suspension. On peut penser que le pic de synthèse d'ARN observé vers la 6e heure de culture, renferme des ARN messagers de l'enzyme (DUBOIS et Coll., 1976, RAMBOUR et Coll., 1978). Comme de tels ARN peuvent être isolés (RAMBOUR et Coll., 1977) on peut les traduire dans un système acellulaire. Ceci ne présente d'intérêt que si la protéine enzymatique peut être identifiée et dosée. Deux méthodes peuvent alors être envisagées : la première serait de caractériser l'enzyme par un test d'activité ; cette solution n'est guère envisageable dans la mesure où l'enzyme ne serait formée qu'en faible quantité. Une seconde méthode fait appel aux techniques d'immunologie. La production d'anticorps de la nitrate réductase a été obtenue chez l'épinard (GRAF et Coll., 1975) et Neurospora (AMY et GARRETT, 1979). Il doit donc être possible d'obtenir un immun-sérum contenant des anticorps de l'enzyme de Silène. Cette méthode nécessite l'obtention d'une préparation enzymatique purifiée.

Ce travail de purification n'a donc été entrepris que dans le seul but d'obtenir une fraction permettant la production d'un anti-sérum.

La nitrate réductase est apparemment formée d'un complexe enzymatique contenant un groupement prosthétique renfermant du molybdène (voir historique) la synthèse de l'enzyme in vitro ne devrait conduire qu'à la formation de sous-unités protéiques constitutives de l'apoenzyme. Cependant, HEWITT et Coll. (1977) ont décrit et employé avec succès, des procédés qui reconstituent l'enzyme complète in vitro à partir de l'apoprotéine et d'un complexe contenant du molybdène.

Il n'est donc pas vain de concevoir une synthèse complète de l'enzyme de Silène in vitro à partir de sous-unités obtenues dans un système de synthèse acellulaire.

#### A) PROBLEMES POSES PAR LA PURIFICATION

La première difficulté que nous avons rencontrée, résulte de l'extrême instabilité de l'enzyme de Silène. Lorsqu'elle est extraite selon la méthode décrite précédemment, elle perd toute activité après quelques heures de conservation au froid (Fig. 7). Or, les procédés habituels de purification nécessitent souvent plusieurs heures. Par ailleurs, l'obtention de fractions hautement purifiées exige la combinaison de plusieurs procédés qui ne peuvent se dérouler que pendant plusieurs jours. Avec notre matériel, un tel protocole est donc exclu. Deux solutions sont offertes :

- la première exige la mise au point d'un procédé rapide permettant la récupération d'une fraction enzymatique encore active,

- la seconde consiste à trouver un moyen de stabiliser l'enzyme, et de procéder ensuite à sa purification.

#### B) PURIFICATION DE L'ENZYME NON STABILISEE

##### 1) Précipitation par le sulfate d'ammonium

A l'extrait brut obtenu selon la technique déjà décrite, on ajoute une solution saturée à froid de sulfate d'ammonium dont le pH a été ajusté à 7,5 à l'aide d'une solution normale d'ammoniaque. Dans ces conditions, l'enzyme est précipitée après l'addition à 1 volume d'extrait de 0,82 volumes de la solution saturée. Le taux de sulfate d'ammonium est alors égal à 45 % de la saturation. Après une centrifugation à 10 000 x g pendant 20 min. le culot est recueilli, il contient toute l'activité enzymatique. Nous avons par ailleurs vérifié l'absence d'activité enzymatique dans les fractions précipitées entre 0 et 20 % puis entre 45 et 75 % de saturation.

La fraction qui contient l'enzyme présente une activité égale à environ 75 % de celle de l'extrait brut. Ce rendement est faible comparé à ceux obtenus avec d'autres matériels : 120 % (NOTTON et Coll., 1977) 122 % (AHMED et SPILLER, 1976) 96 % (SOLOMONSON, 1975) 90 % (SOLOMONSON, 1978) 110 % (SCHLOMER et GARRETT, 1973) et de 106 % (LE CLAIRE et GRANT, 1972 HEIMER et Coll., 1976). Il est par contre du même ordre que celui obtenu par AMY et GARRETT (1974) chez la diatomée Thalassiosira pseudonana.

## 2) La filtration sur gel

Le précipité contenant l'enzyme est alors dissous dans un minimum de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5. La solution est alors déposée sur une colonne de Sephadex G 100 (40 x 2 cm). L'élution est réalisée par du tampon phosphate identique au précédent à un débit de 40 ml/heure.

L'activité nitrate réductase se trouve alors concentrée dans les fractions contenant toutes les autres protéines.

En remplaçant le Sephadex G 100 par un gel de Sephadex G 200, on obtient le même type de résultat. L'utilisation de la filtration sur gel comme procédé de purification est donc inefficace. De plus, l'activité enzymatique mesurée dans les éluats reste très faible qu'elle soit mesurée avec NADH, FMNH<sub>2</sub> ou le méthyl viologène réduit.

Par ailleurs, l'adjonction de 10 µM de FAD qui peut fonctionner comme groupement prosthétique de la nitrate réductase (ZUMFT et Coll., 1970) n'améliore pas la quantité d'enzyme récupérée.

## 3) La chromatographie d'affinité

L'utilisation de colorants bleus liés de façon covalente à certains supports tels le Sepharose permet la purification d'enzymes. C'est ainsi que la chromatographie d'affinité sur le bleu Sépharose a permis de purifier 150 fois la nitrate réductase de cotylédons de Courge (CAMPBELL et SMARELLI, 1978).

Aussi avons-nous tenté l'isolement de l'enzyme de Silene alba et par le bleu Sepharose et par le bleu dextran. Dans les conditions habituelles d'utilisation de ces gels, la nitrate réductase extrait de la suspension cellulaire n'est pas retenue.

Nous avons alors appliqué la technique décrite par BÖHME et Coll. (1972). Elle consiste en l'emploi de Sephadex G 200 à laquelle est couplé le bleu Cibacron F<sub>3</sub>G<sub>A</sub>.

Le précipité obtenu par l'adjonction de sulfate d'ammonium à 45 % de saturation est repris dans un petit volume de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5, mélangé à 5 ml de gel et agité très doucement pendant 30 min. La suspension est filtrée et le gel, remis en suspension dans quelques ml de tampon phosphate, est transvasé dans une petite colonne (18 x 1,8 cm) puis lavé par le même tampon, jusqu'à ce que l'absorbance de l'effluent soit nulle. On vérifie l'absence d'activité à la fois dans le tampon de lavage et dans le filtrat. Puis on élue l'enzyme par du tampon phosphate auquel on a ajouté 100  $\mu$ M de NADH (CAMPBELL et SMARELLI, 1978, SOLOMONSON, 1975).

L'enzyme peut aussi être élue par un gradient continu de 0 à 3 M de KCl dissous dans le tampon phosphate (NOTTON et Coll., 1977). Les activités enzymatiques restent faibles quel que soit le mode d'élution. Le NADH en particulier n'élue qu'une faible partie de l'activité enzymatique fixée sur le gel ; et il est ensuite impossible de concentrer l'enzyme par une solution de sulfate d'ammonium dont le taux de saturation est amené à 50 %. Si l'élution a été effectuée par le KCl, la précipitation de la nitrate réductase devient possible, sans doute parce que d'autres protéines ont également été éluées.

L'enzyme ainsi concentrée perd très rapidement son activité lorsqu'elle est conservée à  $-18^{\circ}\text{C}$ , précipitée par le sulfate d'ammonium ou dissoute dans du tampon phosphate 0,1 M auquel on a ajouté du glycérol (50 % v/v).

L'emploi de FAD à la concentration de 10  $\mu$ M dans les tampons d'extraction et d'élution n'améliore pas le rendement de la purification.

Nous avons par ailleurs essayé de purifier l'enzyme en l'adsorbant soit avant, soit après précipitation par le sulfate d'ammonium, sur un gel d'hydroxylapatite. Là encore les essais se sont révélés être infructueux.

#### 4) Conclusion

Les procédés usuels de purification, appliqués à l'enzyme de Silène aboutissent à l'obtention de préparations enzymatiques, rapidement dégradées ou inactivées. Le rendement de la purification est donc très faible. L'emploi de la chromatographie d'affinité qui est pourtant une méthode rapide, n'est pas satisfaisant dans notre cas.

L'obtention d'une quantité suffisante d'enzyme nécessaire à la confection d'un anti-sérum requiert de nombreuses extractions sur de grandes quantités de cellules. Ceci est difficilement réalisable avec la suspension

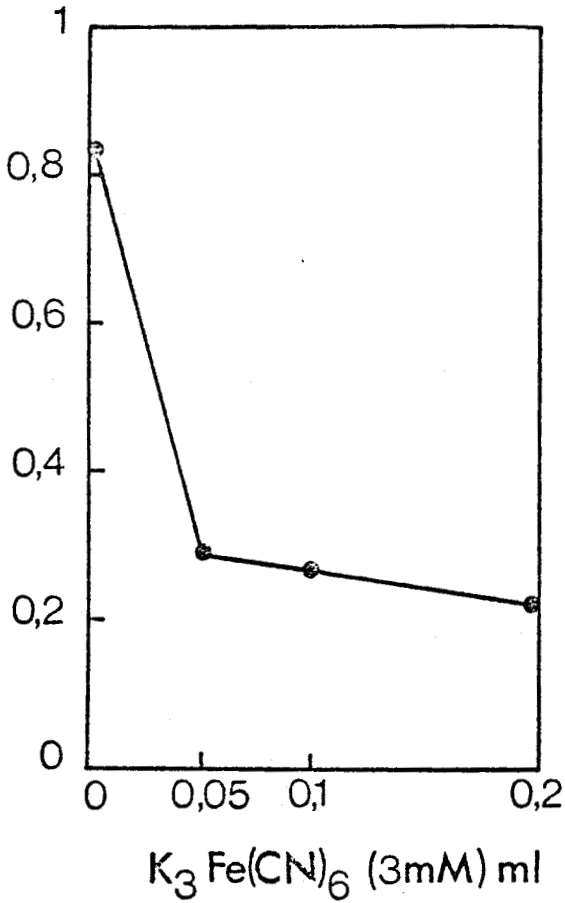
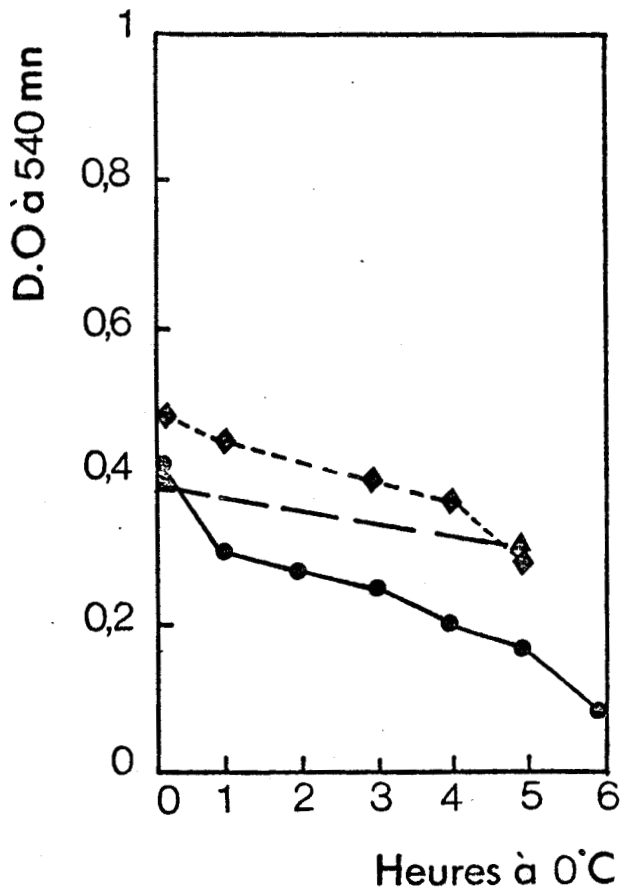


Fig. 26 : Action du ferricyanure de potassium sur l'activité N.R. des cellules de Silène.

Divers volumes d'une solution 3 mM de ferricyanure sont ajoutés à des aliquotes de l'extrait enzymatique.

Fig. 27 : Action du polyvinylpyrrolidone (PVP) sur la stabilité d'extraits enzymatiques.

- (●—●) absence de PVP
- (▲---▲) 10 % de PVP
- (◆---◆) 20 % de PVP



cellulaire de Silène puisque l'induction enzymatique a lieu lors des premières heures de culture à une période où la densité cellulaire est faible. Par ailleurs, les fractions purifiées seraient rapidement inactivées ou dégradées avant même qu'une quantité suffisante d'enzyme soit obtenue.

Il devient donc nécessaire d'essayer de stabiliser la nitrate réductase.

### C) ESSAIS DE STABILISATION DE L'ENZYME

Nous avons vu que l'utilisation de FAD ou d'EDTA ou de cystéine dans les divers tampons n'améliore pas les rendements de la purification. Nous avons donc essayé d'autres procédés.

#### 1) Activation de l'enzyme par le ferricyanure de potassium

Cette technique que nous a suggéré le Docteur HEWITT, consiste à incuber durant 5 min l'enzyme à 0°C en présence d'une solution à 3 mM de ferricyanure de potassium. Puis les nitrates et le NADH (solution à 3 mM) sont ajoutés. Les nitrites formés sont dosés à la fin de la réaction. Employé aux concentrations habituelles le ferricyanure ne permet pas l'activation de l'enzyme extraite du Silène (fig. 26). Sur les conseils du Docteur HEWITT, nous avons modifié légèrement le procédé. L'enzyme est extraite en présence de différentes concentrations de sulfate de nickel puis traitée par le ferricyanure. Les activités nitrate réductase sont alors mesurées avant et après élimination du ferricyanure par passages sur une colonne de Sephadex G 25. Dans ces conditions, la nitrate réductase n'est toujours pas activée.

#### 2) Action du polyvinylpyrrolidone (P V P) lors de l'extraction et sur la stabilité de l'enzyme

Les travaux de KLEPPER et HAGEMAN (1969) ont mis en évidence un effet protecteur du P V P lors de l'extraction de la nitrate réductase de feuilles de pommier. Ces auteurs pensent qu'il forme des complexes insolubles avec les tanins et les polyphénols présents dans les extraits enzymatiques.

Nous avons ajouté le P V P au milieu d'extraction à raison de 10 ou 20 g pour 100 g de matériel frais (AMY et GARRETT, 1974) (CAMPBELL et SMARRELLI, 1978).

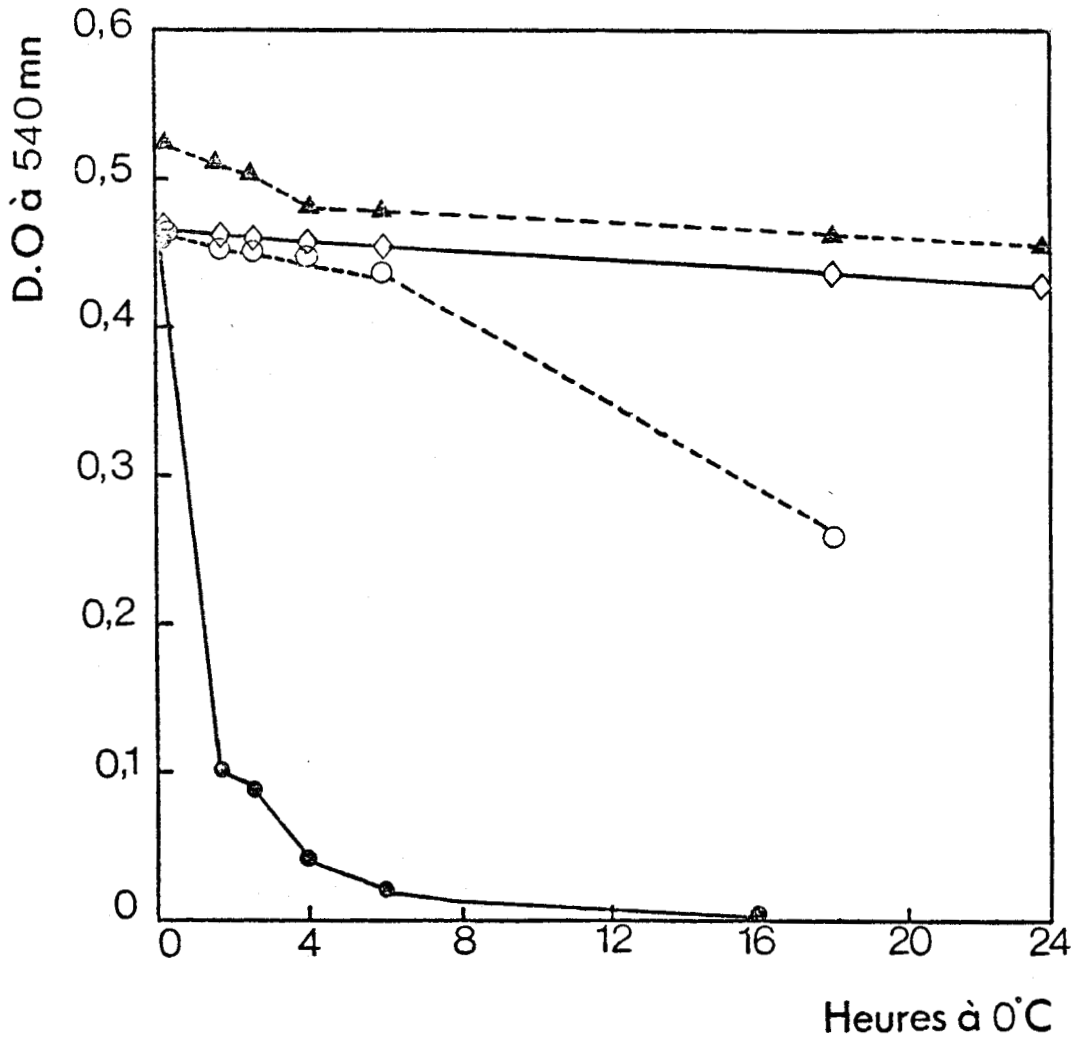


Fig. 28 : Influence de la caséine sur la stabilité de la nitrate réductase de cellules de *Silène*.

On ajoute de la caséine au tampon d'extraction puis on suit l'évolution de l'activité N.R. au cours du temps, l'extrait étant maintenu à 0°C.

(●—●) absence de caséine

(○---○) caséine à 1%; (◇—◇) 2%; (▲---▲) 3%.

Les résultats reportés dans la figure 27 montrent qu'employé à 10 %, le P V P peut augmenter la stabilité de l'enzyme. Toutefois, sa présence dans le milieu d'extraction pose des problèmes lors des centrifugations qui suivent la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium. Il provoque en effet la formation de culots très visqueux difficiles à recueillir.

### 3) Effets de l'addition de protéines dans le tampon d'extraction

L'adjonction de protéines telles la serum albumine bovine ou la caséine au milieu d'extraction peut stabiliser l'enzyme de différentes espèces végétales (ROBIN, 1979, SHERRARD et DALLING, 1978, SCHRADER et Coll., 1974). Elle est par contre inefficace dans le cas de plantules de concombre (AMINDARI et Coll., 1978).

Nous avons donc ajouté de la caséine à notre tampon d'extraction afin de voir si elle était susceptible de stabiliser l'enzyme de Silène. Employée aux doses de 2 et 3 % (p/v) la caséine augmente considérablement la stabilité de la nitrate réductase (figure 28). En effet, lorsque l'extraction a été effectuée en présence de 3 % de caséine, l'activité enzymatique atteint encore 40 % de l'activité initiale après plus de 40 heures de conservation au froid (0°C).

La caséine par contre n'augmente pas l'activité enzymatique comme l'observent SCHRADER et Coll. (1974) ou ROBIN (1979) chez d'autres végétaux.

Nos résultats sont en opposition avec ceux de CAMPBELL (1978) qui chez le maïs observe que la serum albumine bovine à 3 % augmente l'activité enzymatique mais ne stabilise pas l'enzyme.

Quelle que soit la concentration de caséine ajoutée, on note toujours une perte progressive d'activité au cours du temps (figure 28). Aussi, avons-nous pensé que l'extraction libérait une protéase. Nous avons donc effectué un essai rapide d'activité protéasique dans nos extraits, selon la technique de ANSON modifiée par JONSSON et MARTIN (1964). L'activité protéasique mesurée s'est révélée être très faible. Il ne semble donc pas que l'instabilité de la nitrate réductase de Silène soit liée à la présence d'une protéase présente dans l'extrait végétal.

L'effet stabilisateur de la caséine reste difficile à déterminer. En effet, dans des racines de maïs, elle inhibe une enzyme d'inactivation de la nitrate réductase (WALLACE, 1973, 1974, 1975).



Quant à la sérum albumine, elle active l'enzyme extraite de cotylédons de coton mais ne la stabilise pas. Elle n'augmente pas la quantité d'enzymes extraite (PURVIS et Coll., 1976). Enfin, on a signalé la présence de divers facteurs d'inactivation ou d'inhibiteurs spécifiques chez certains végétaux (PAN et MARSCH, 1972) KADAM et Coll., 1974, YAMAGA et OHIRA, 1976, 1977, 1978)..

Aussi, à la suite de notre étude, nous avons entrepris la purification de l'enzyme de Silène extraite en présence de caséine.

#### D) PURIFICATION DE L'ENZYME STABILISEE PAR LA CASEINE

Bien qu'elle stabilise la nitrate réductase, la présence de caséine complique et perturbe les procédés de purification comme l'avait déjà signalé CAMPBELL (1978).

Nous avons donc été amenés à réaliser de nombreux essais avant de mettre au point un procédé d'isolement satisfaisant.

La quantité de caséine qui permet de stabiliser l'enzyme pendant le temps nécessaire à la purification sans trop la perturber est comprise entre 1,2 et 1,5 %.

##### 1) Procédé de la purification

L'extraction s'effectue à partir de 80 g de cellules congelées par de l'azote liquide. Le milieu d'extraction consiste en un tampon phosphate  $K_2HPO_4 - KH_2PO_4$  0,1 M dont le pH est ajusté à 7,5 contenant 1,5 % de caséine. A l'extrait brut obtenu après une centrifugation à 12 000 x g pendant 20 mn, on ajoute des cristaux de sulfate d'ammonium de façon à obtenir 20 % de saturation. Les additions s'effectuent progressivement dans l'extrait sous agitation douce.

Lorsque le sel est dissous, l'agitation est stoppée et l'extrait maintenu au repos pendant 20 minutes. Le culot de protéines recueilli après centrifugation ne présente pas d'activité nitrate réductase.

Le surnageant est prélevé et porté à 45 % de saturation en sulfate d'ammonium selon la méthode décrite précédemment. Après précipitation des protéines, on procède à une centrifugation à 12 000 g pendant 20 minutes et on prélève le culot qui contient toute l'activité nitrate réductase mais aussi la caséine.

Le culot est maintenu à  $-18^{\circ}C$  pendant une nuit puis dissous dans

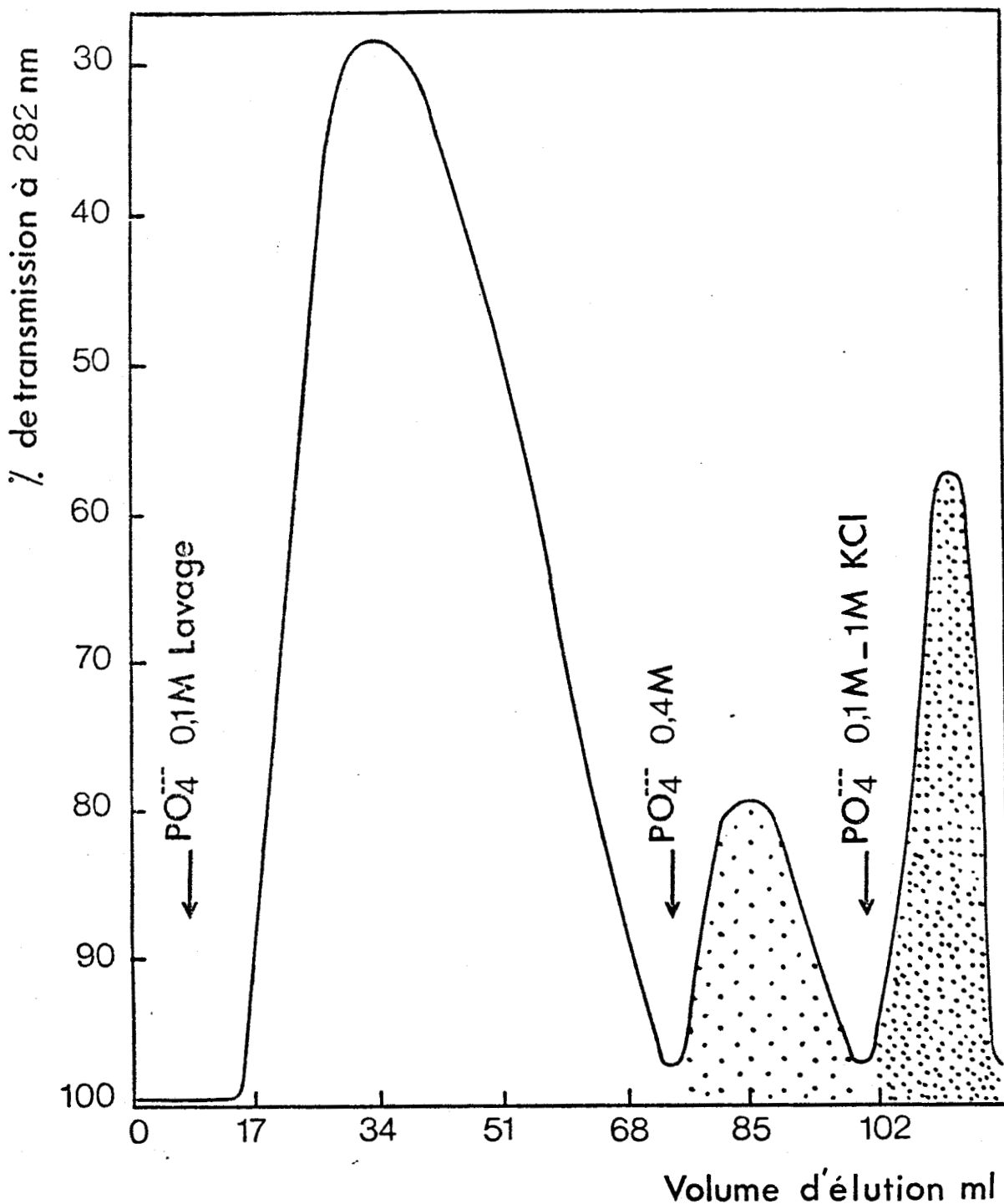


Fig. 29 : Fractionnement des protéines précipitées par le sulfate d'ammonium (45 % de sa saturation) par chromatographie d'affinité sur colonne de Bleu Sephadex G 200.

Les protéines dissoutes dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 sont mélangées avec 20 ml de gel puis la suspension est versée dans une colonne de 15 cm x 1,8 cm. Le gel est ensuite lavé par du tampon phosphate d'abord 0,1 M puis 0,4 M. Enfin, on procède à l'élution des protéines liées au gel par du tampon phosphate 0,1 M auquel est ajouté du KCl 1 M.

Les aires en pointillé correspondent à des fractions présentant une activité N.R.

un volume de tampon phosphate égal à la moitié du volume initial d'extrait brut. La solution est mélangée à 20 ml de gel Bleu Sephadex G 200 et agitée doucement pendant 30 minutes. Après décantation, la suspension est filtrée. On recueille le filtrat afin de vérifier s'il présente encore une activité enzymatique, ce qui permet de calculer la quantité d'enzyme retenue par le gel. On s'aperçoit qu'il ne s'élève qu'à 30 ou 40 %. Ce rendement est le meilleur que nous ayons obtenu. Il est vraisemblable que lorsque le culot contenant les protéines précipitées par le sulfate d'ammonium ajouté à 45 % de sa saturation, est remis en suspension dans un faible volume de tampon, l'encombrement protéique est tel qu'il entrave la fixation de l'enzyme aux particules du gel.

La dissolution du culot dans un volume trop important de tampon n'améliore guère la fixation par suite d'une dispersion trop importante des particules du gel pendant l'agitation.

Après filtration, le gel recueilli sur le filtre est lavé par du tampon phosphate puis remis en suspension dans ce même tampon et transféré dans une petite colonne (15 x 1,8cm). Le lavage est prolongé jusqu'à ce que la densité optique de l'effluent soit nulle. L'enzyme est alors éluée par du KCl 1 M en solution dans le tampon phosphate 0,1 M (NOTTON et Coll., 1977). (figure 29).

A l'éluat, on ajoute du sulfate d'ammonium de façon à amener sa concentration à 50 % de la saturation. Les protéines précipitées sont recueillies par centrifugation à 12 000 x g pendant 20 minutes. Le culot obtenu est gardé à -18°C pendant une nuit.

Quant au gel, il est lavé par une solution de KCl 3 M puis équilibré par du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5, afin d'être utilisé pour une nouvelle chromatographie.

Il faut enfin remarquer que si l'éluat de l'enzyme par le KCl 1 M est précédée par des lavages du gel avec du tampon phosphate 0,3 M (SOLOMONSON et Coll., 1975) ou 0,4 M (NOTTON et Coll., 1977), on peut décrocher une partie relativement importante de l'activité enzymatique (figure 29).

L'agitation de l'extrait mélangé au gel, puis la filtration nous ont paru préférables à la chromatographie d'affinité sur colonne telle qu'elle est pratiquée habituellement. En effet, la présence de la caséine provoque un tassement progressif du gel et perturbe le débit de la colonne. Nous avons tenté d'éviter cette difficulté, soit en augmentant le volume de tampon

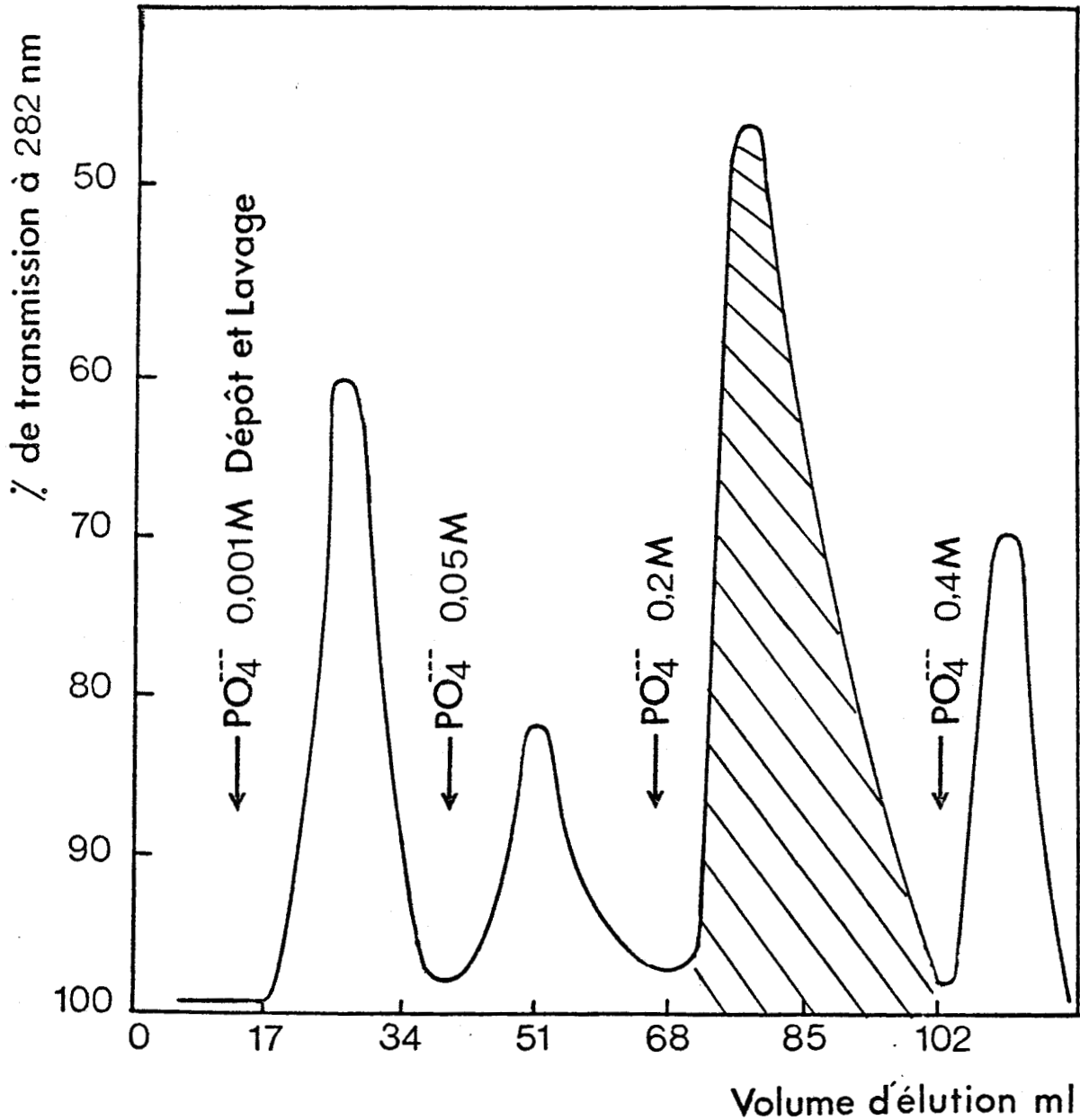


Fig. 30 : Isolement de la nitrate réductase par chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite-agarose.

Les protéines isolées par chromatographie d'affinité sont déposées sur 10 ml de H.A. Ultrogel et fractionnées par un gradient discontinu de tampon phosphate pH 7,5.

Le débit de la colonne est de  $17 \text{ ml.h}^{-1}$ . La zone hachurée correspond à l'ensemble des fractions qui présentent une activité N.R.

de dissolution des protéines, soit en déposant directement des extraits bruts contenant 1 % de caséine (à raison de 1 ml de tampon/g de matière fraîche). Dans de telles conditions, le gel retient la totalité de l'activité enzymatique mais les rendements obtenus après l'élution de l'enzyme sont alors très faibles puisque les temps de lavage et d'élution sont accrus et que des phénomènes d'inactivation ou de dégradation interviennent.

Le culot contenant les protéines éluées du gel et présentant une activité nitrate réductase, est dissous dans du tampon phosphate 0,001 M pH 7,5 et mis à percoler sur une colonne de Sephadex G 25, afin d'éliminer les sels. Le filtrat est alors déposé sur une colonne contenant 10 ml de gel d'hydroxyapatite agarose (HA - Ultrogel). Après lavage par du tampon phosphate 0,001 M jusqu'à ce que la densité optique de l'effluent soit nulle, on fait passer sur la colonne une solution de tampon phosphate 0,05 M. Cette opération élue une fraction protéique ne présentant pas d'activité nitrate réductase. Le passage d'un tampon phosphate 0,2 M permet l'élution de l'enzyme qui est alors précipitée par du sulfate d'ammonium (50 % de saturation) (figure 30). Une élution ultérieure par du tampon phosphate 0,4 M amène la libération de protéines sans activité nitrate réductase. Enfin le gel est lavé par du tampon phosphate 0,5 M pH 6,8 et remis en présence d'une solution tamponnée 0,001 M. Il peut alors être réutilisé.

Si l'on inverse les deux dernières étapes de la purification, en faisant précéder la chromatographie d'affinité par l'adsorption sur hydroxyapatite, l'enzyme n'est pas adsorbée. Il existe vraisemblablement une compétition entre l'enzyme et la caséine ; on a par ailleurs montré que les phosphoprotéines étaient fortement adsorbées par ce type de gel.

## 2) Modification possible

Cette modification ne concerne que l'étape d'affinité et a pour but d'augmenter les rendements de la purification.

Nous remplaçons l'élution sur colonne par une élution sur filtre.

L'enzyme précipitée par le sulfate d'ammonium est dissoute dans du tampon phosphate et mélangée avec le gel d'affinité. Puis la suspension est versée dans un entonnoir garni de papier filtre. Le gel est lavé jusqu'à ce que la densité optique du tampon de lavage mesurée à 280 nm soit nulle. Puis le gel est recueilli délicatement, mis en suspension dans un faible volume de tampon d'élution (KCl 1 M dans le tampon phosphate 0,1 M).

L'ensemble est remué doucement puis filtré, le gel retenu sur le filtre est rincé avec du tampon phosphate contenant du KCl 1 M. On procède alors à la mesure de l'activité enzymatique. Cette technique très rapide permet plusieurs passages en affinité et augmente le rendement de fixation, puisque deux mises en contact successives de l'enzyme avec le gel d'affinité permettent d'obtenir un taux de purification de 40 %.

D'autre part, lorsque la nitrate réductase est précipitée par le sulfate d'ammonium, on peut la conserver à -18°C sans perte d'activité pendant au moins 48 heures.

Cette méthode permet en outre de purifier l'enzyme extraite d'une quantité importante de cellules. Il suffit en effet de la précipiter par le sulfate d'ammonium, de la dissoudre puis de procéder à la fixation simultanée de plusieurs aliquotes sur des gels d'affinité. Les fractions éluées précipitées de nouveau sont alors regroupées et chromatographiées sur gel d'hydroxyapatite-agarose.

Moins rigoureuse que la chromatographie d'affinité sur colonne, cette méthode est néanmoins satisfaisante pour atteindre l'objectif que nous nous sommes fixés.

### 3) Élimination de la caséine

L'analyse en électrophorèse sur gel de polyacrylamide nous montre que la fraction enzymatique obtenue renferme encore une quantité importante de caséine. Ceci peut être gênant pour obtenir les anticorps de la nitrate réductase. Il est vraisemblable dans ce cas que l'immun-sérum renfermera plus d'anticorps de la caséine que de l'enzyme.

Nous avons vainement essayé d'éliminer la caséine par une filtration sur Sephadex G 200.

Par contre, SOLOMONSON et Coll. (1975) ont montré que la nitrate réductase extraite de cellules de Chlorella vulgaris est précipitée sélectivement par le sulfate de protamine. Aussi, avons-nous essayé ce procédé.

A un volume donné d'extrait enzymatique, on ajoute 0,2 volume d'une solution à 2 % de sulfate de protamine dissous dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5. On maintient le pH de l'extrait à 7,5 avec une solution d'hydroxyde de potassium 2 N. On obtient alors une précipitation importante de caséine. L'activité nitrate réductase subsiste dans le surnageant mais

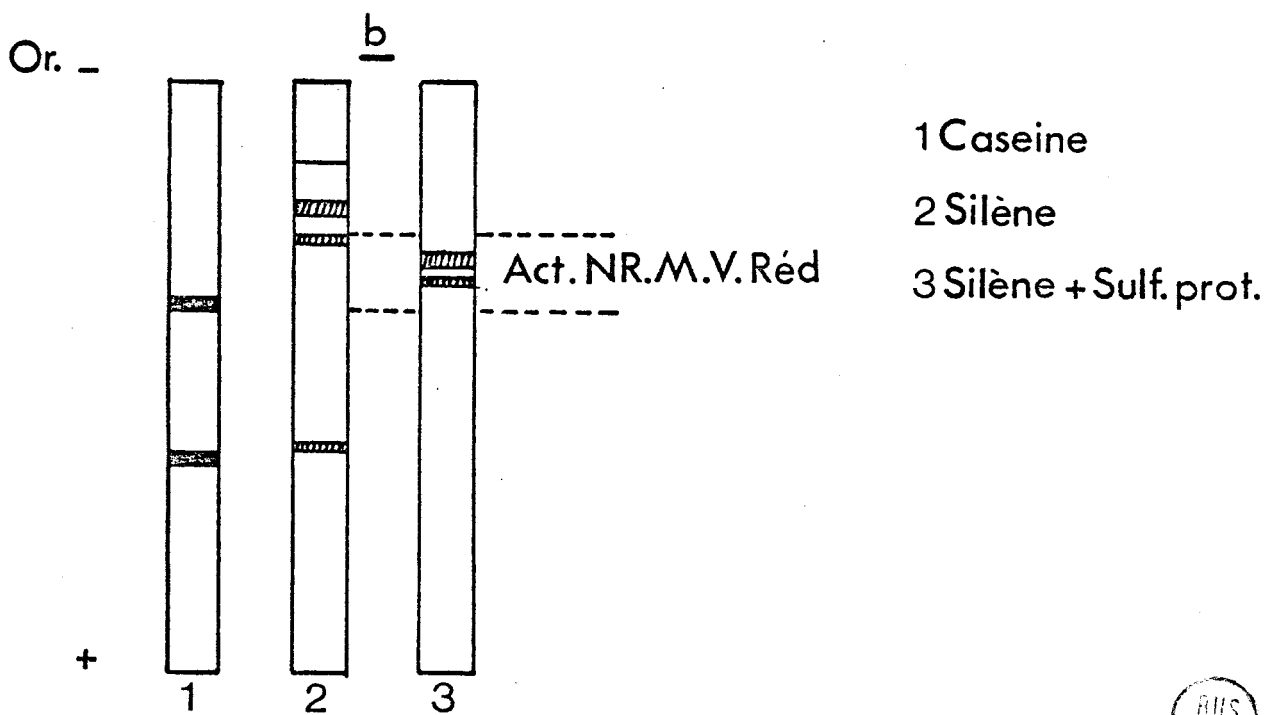
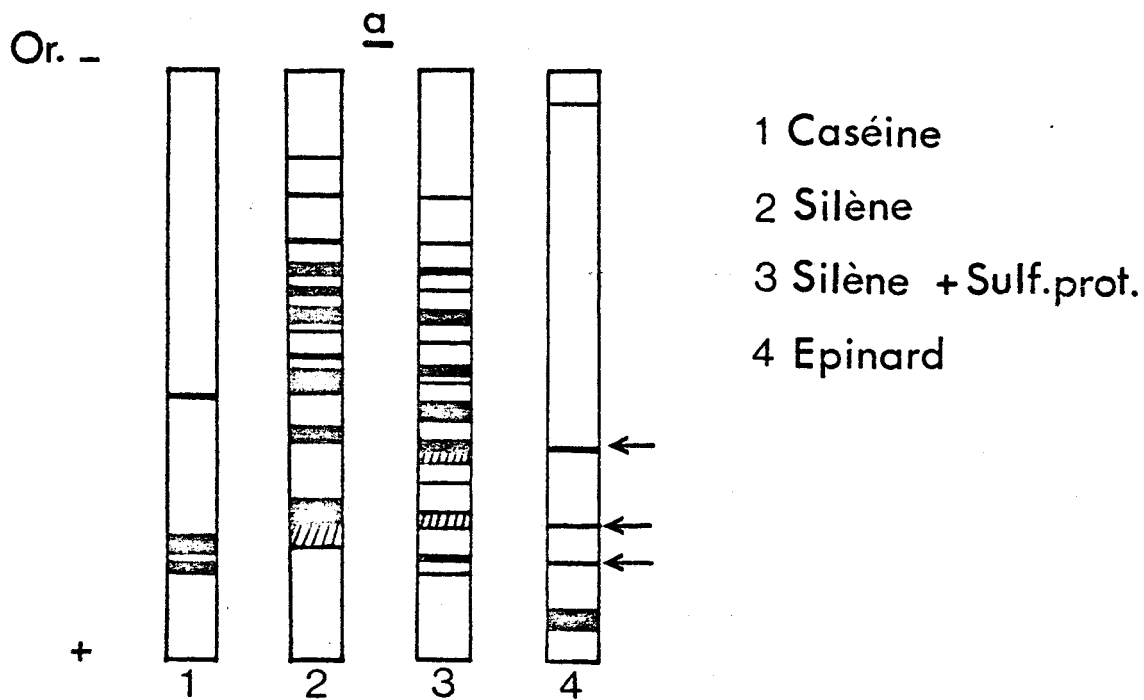


Fig 31

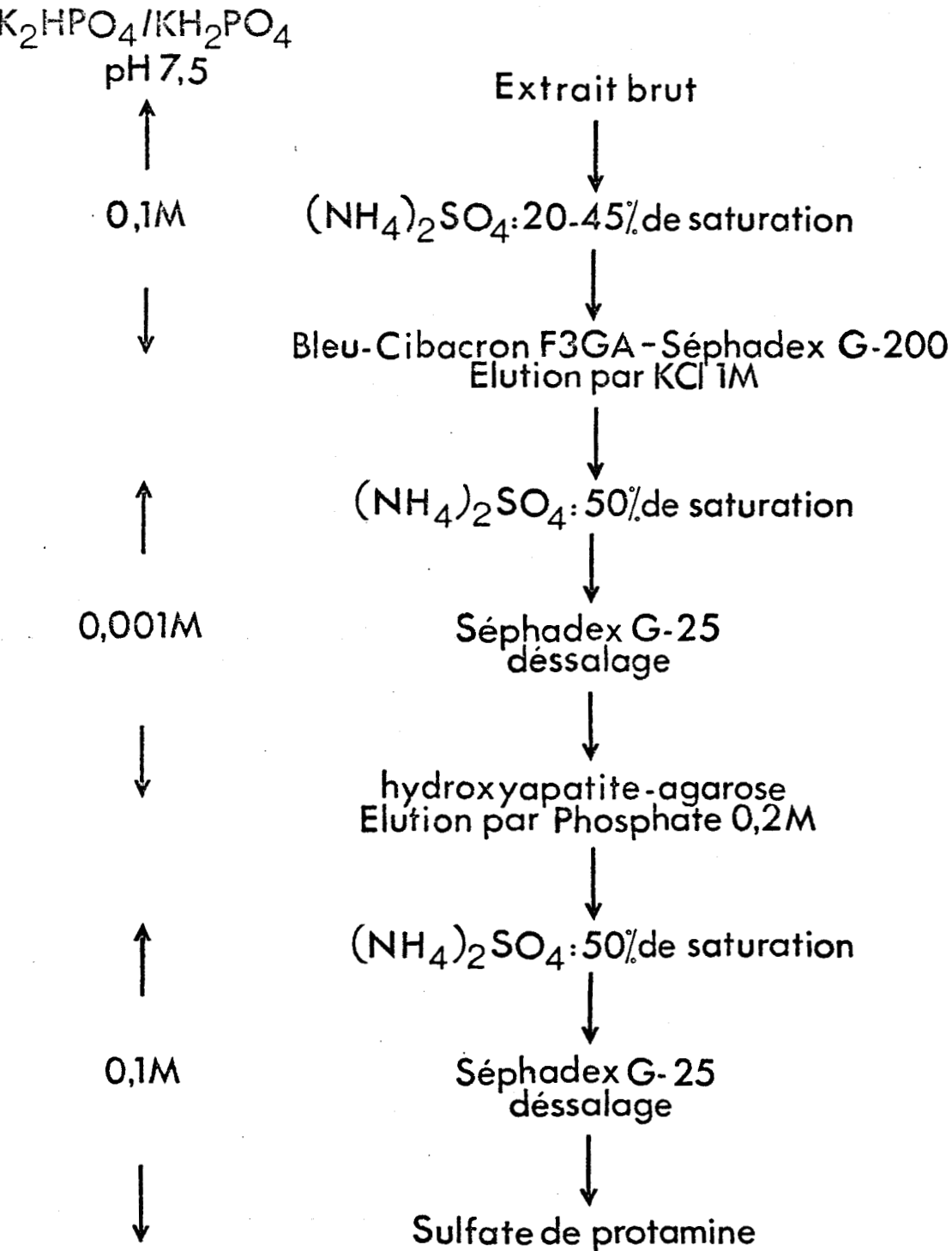


TABLEAU VI

Schéma récapitulatif de la méthode de purification de la N.R. des cellules de *Silene*.





elle est diminuée (Tableau V ). Il ne nous est pas possible de déterminer si une fraction de l'enzyme est précipitée en même temps que la caséine, puisque les précipités sont insolubles dans un tampon phosphate 0,1 M rendant impossible toute mesure d'activité enzymatique.

Il se peut aussi que la perte d'activité résulte de la diminution de l'environnement protéique de l'enzyme.

Une analyse par électrophorèse du surnageant, montre que la précipitation par le sulfate de protamine élimine effectivement une quantité très importante de caséine (figure 31).

#### 4) Résultats et discussion

Au terme du travail concernant la purification de la nitrate réductase et dont les différentes étapes sont résumées dans le Tableau VI il ne nous est pas possible d'évaluer la pureté de la préparation enzymatique. En effet, la présence constante et nécessaire de caséine lors des différentes étapes ainsi que l'impossibilité d'en connaître la proportion exacte, rendent les calculs d'activité spécifique sans valeur significative. Ceci n'était d'ailleurs pas notre but. A titre simplement indicatif, nous donnons cependant les rendements de purification des différents stades pour une quantité initiale de cellules de 80 g de matière fraîche (Tableau VII).

Les électrophorégrammes obtenus lorsque les migrations sont effectuées en présence ou en absence de S D S montrent que notre fraction purifiée est constituée de plusieurs bandes protéiques (figure 31 ). L'électrophorèse de l'enzyme purifiée d'épinard (don du Docteur HEWITT et de ses collaborateurs) effectuée en même temps que notre fraction purifiée de Silène traitée par le sulfate de protamine, révèle l'existence de trois bandes communes aux deux préparations enzymatiques. Il ne nous est cependant pas possible dans l'état actuel du travail d'affirmer que l'une ou plusieurs d'entre elles correspondent réellement à la nitrate réductase, d'autant plus que la présence de sulfate de protamine dans notre extrait perturbe la migration en absence de S D S. Il est donc nécessaire d'affiner la mise au point des procédés d'électrophorèse.

L'étude des activités enzymatiques de la préparation purifiée avant et après avoir été traitée par le sulfate de protamine (Tableau V ) montre qu'elles sont nettement plus élevées lorsque les cofacteurs utilisés sont le  $FADH_2$  et le méthyl viologène que lors de l'utilisation du NADH et

TABEAU VII : ACTIVITE N.R. MESUREE AUX DIFFERENTS STADES DE LA  
PURIFICATION

| ETAPE DE PURIFICATION                         | VOLUME<br>(ml) | ACTIVITE N.R.<br>(unités totales) | RENDEMENT<br>(%) |
|---|----------------|-----------------------------------|------------------|
| EXTRAIT INITIAL                               | 200            | 3,064                             | 100              |
| SULFATE $N H_4^+$<br>(20 - 45 %)              | 95             | 2,130                             | 70               |
| BLEU-SEPHADEX, ELUTION<br>PAR 0,4 M PHOSPHATE | 22             | 0,047                             | 1,5              |
| BLEU SEPHADEX, ELUTION<br>PAR 1 M KCl         | 23             | 0,090                             | 3                |
| HYDROXYAPATITE -<br>ELUTION PAR 0,05 M $PO_4$ | 15             | 0                                 | 0                |
| HYDROXYAPATITE -<br>ELUTION PAR 0,2 M $PO_4$  | 13             | 0,106                             | 3,5              |

*L'extrait initial a été réalisé à partir de 80 g de cellules ; le tampon d'extraction contient 1,5 % de caséine. L'étape "chromatographie par affinité" consiste en un seul passage de l'extrait sur le gel. Une unité totale = 1  $\mu M$  de  $NO_2^-$  formé par min.*

du FMNH<sub>2</sub>. Ce fait a souvent été observé lors de purifications de l'enzyme d'autres végétaux.

On peut donc penser que la sous-unité enzymatique où s'effectuent les échanges d'électrons avec le NADH est la plus labile. Cette sous-unité correspondrait à ce que OJI et IZAWA (1969a) ont nommé la diaphorase NADH spécifique.

Enfin, la préparation enzymatique de Silène précipitée par le sulfate d'ammonium, dessalée par une filtration sur Sephadex G<sub>25</sub> ne perd pratiquement pas d'activité après une conservation d'un mois à -18°C. Si par contre, on élimine la caséine par une précipitation au sulfate de protamine, l'activité est rapidement perdue.

La caséine exerce donc un effet de protection net vis à vis de l'enzyme.

L'analyse électrophorétique d'une aliquote de la fraction purifiée conservée en présence de caséine permet la séparation des protéines. Il est possible de déceler une activité nitrate réductase au niveau de certaines bandes. Une manipulation identique avec la fraction dont la caséine a été éliminée ne permet pas la mise en évidence de l'activité enzymatique dans le gel.

Il est enfin possible que la purification provoque l'élimination d'un inhibiteur, lors de la chromatographie par affinité.

## CONSIDERATIONS GENERALES

Au cours de cette étude, nous avons été amené à adapter et à préciser les méthodes d'extraction de la nitrate réductase des cellules d'une suspension cellulaire de Silene alba.

Nous avons en particulier constaté qu'il est inutile d'ajouter au tampon phosphate habituellement utilisé, de la cystéine qui joue un rôle protecteur vis à vis de groupements thiols ou un chélateur tel l'EDTA. Dans les extraits bruts, la nitrate réductase est bien protégée contre l'oxydation des groupements sulfhydrilés. Comme par ailleurs l'EDTA présente un effet inhibiteur de l'activité enzymatique, nous l'avons éliminé du tampon d'extraction.

L'emploi de différents cofacteurs dans les milieux d'incubation, nous permet d'affirmer que l'enzyme extraite des cellules de Silène cultivées en suspension est NADH spécifique et que son activité est maximale pour une valeur de pH de 7,5 ce qui est en accord avec l'ensemble des résultats déjà connus.

En suivant les variations des différents critères de croissance de cellules âgées de 14 jours repiquées dans un milieu liquide neuf, non renouvelé, nous avons pu définir un cycle de croissance cellulaire et en caractériser les différentes étapes. Aussi, avons-nous déterminé à quel stade du cycle s'effectuait la réduction des nitrates. Nous avons montré que l'activité nitrate-réductase apparaît après une période de latence de 6 à 9 heures et qu'elle est maximum vers la 48e heure pour s'annuler après 5 jours de culture alors que le milieu contient encore une quantité importante de nitrates. Ceci suscite donc deux séries de questions : d'abord l'enzyme est-elle activée ou synthétisée de novo, autrement dit, est-elle induite ou non, ensuite, comment l'activité enzymatique est-elle régulée ?

D'après nos résultats, il semble que la régulation s'effectue en partie par l'ion ammonium. En effet, lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une quantité importante de cet élément, la croissance de la suspension n'est pas modifiée mais l'activité nitrate réductase est nulle. Le mode exact de régulation n'est cependant pas connu.

Enfin, l'emploi d'inhibiteurs de la transcription et de la traduction, ou des expériences de carence azotée, nous ont montré que l'enzyme est induite par l'ion nitrate. Quant au molybdène, il représente le métal

nécessaire au fonctionnement de l'enzyme puisqu'il est partie intégrante du groupement prosthétique mais il n'a pas d'effet inducteur.

Il semble probable que les ions nitriques, absorbés après le 4<sup>e</sup> ou 5<sup>e</sup> jour de culture entrent dans un "pool" de stockage vacuolaire et ne sont pas ou peu accessibles à la réduction. Mais il est également possible que des cellules prélevées en phase stationnaire de croissance, puis transférées dans un milieu neuf, riche en saccharose, en hormone et en nitrates synthétisent rapidement une quantité importante d'enzymes. Les molécules formées permettraient une reprise rapide de la prolifération en réduisant immédiatement l'azote nitrique. Les nitrates absorbés ultérieurement interviendraient essentiellement dans l'équilibre des charges ioniques, mais pourraient aussi être reversés dans le "pool" inducteur au fur et à mesure des besoins. La quantité d'enzyme réductrice serait alors faible et non décelable par nos méthodes de dosage. Ceci expliquerait la complexité de la pente des courbes de décroissance de l'activité enzymatique lors de l'étude de la durée de demi-vie de l'enzyme.

La nitrate réductase du Silène est très labile et son extraction par les moyens habituels amène très rapidement soit sa destruction, soit son inactivation. Dans le but d'obtenir un anti-sérum de l'enzyme, nous avons réussi à isoler des préparations relativement stables et partiellement purifiées, en utilisant comme protecteur, la caséine que nous avons pu éliminer en partie par l'utilisation de sulfate de proçamine.

La labilité de la nitrate réductase a également été constatée lors de travaux effectués dans le laboratoire du Docteur HEWITT avec la suspension cellulaire de Paul's Scarlet Rose. L'enzyme extraite de feuilles d'épinard est par contre extrêmement stable. Aussi peut-on se demander si l'instabilité ou la dégradation de la molécule enzymatique est liée à certains genres ou espèces botaniques. A moins que la culture in vitro de fragments d'organes, de cals ou de cellules en suspension n'entraîne la synthèse d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques ou des modifications de la structure de l'enzyme. On a en effet observé des modifications importantes de la ploïdie dans la suspension de Silène cultivée in vitro (DUBOIS et Coll., 1976).

Le temps imparti à notre étude, ne nous a pas permis de répondre à cette question et nous n'avons pu qu'amorcer l'étude de l'activité enzymatique dans les différents organes de plants de Silene alba cultivés en serre.

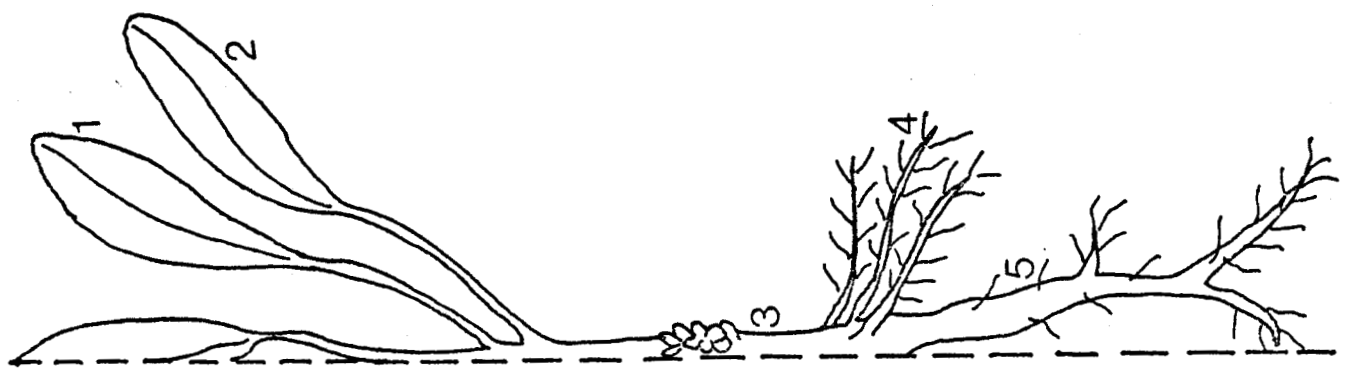
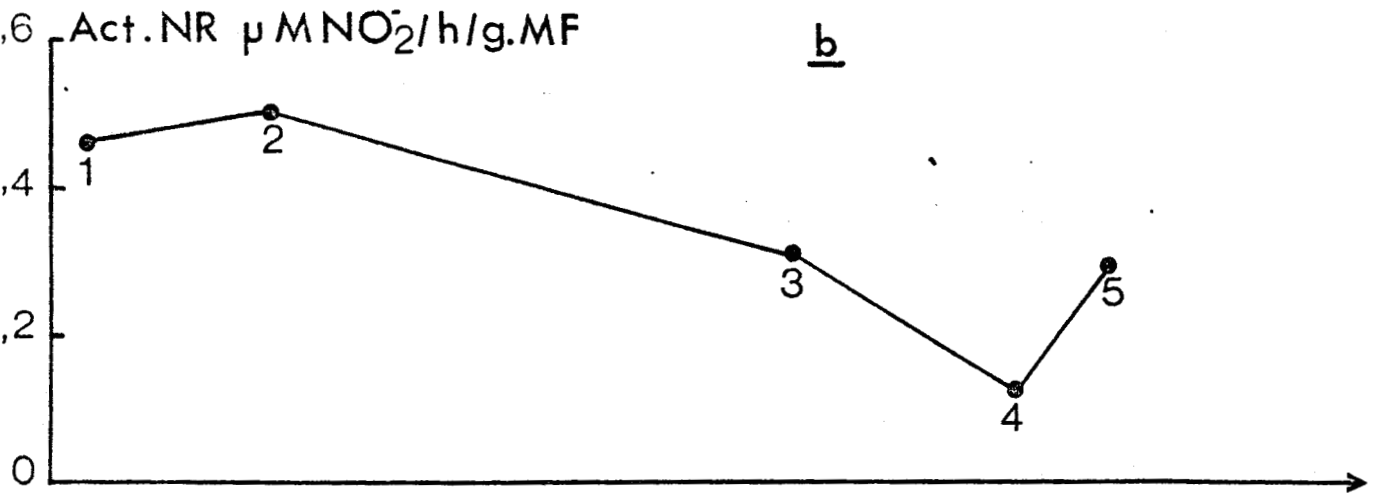
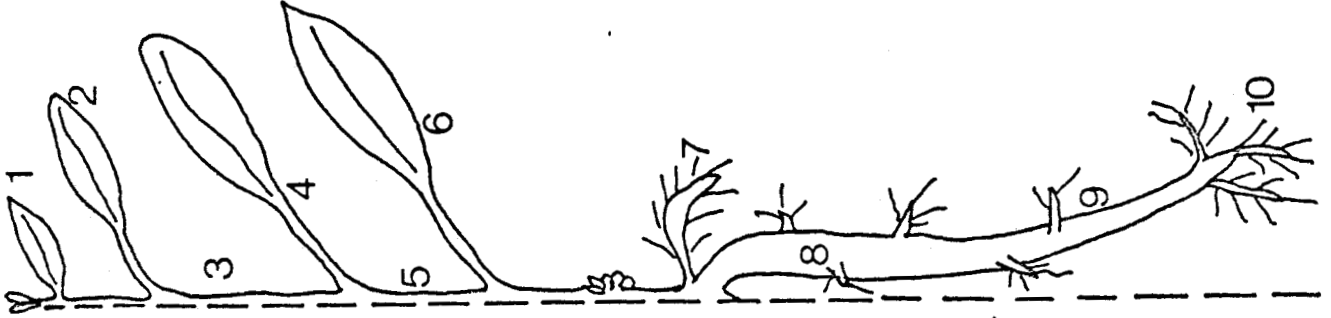
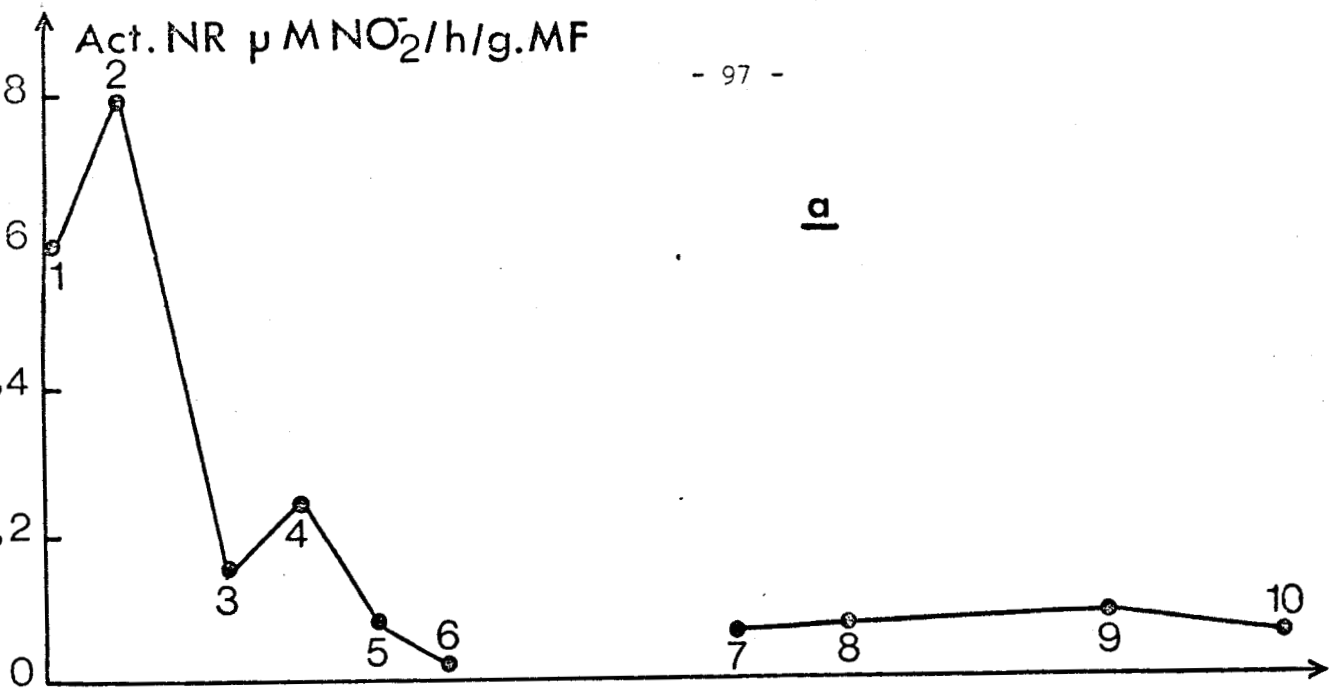


Fig 32



Nous avons utilisé des plantes maintenues à l'état de rosette et nous avons suivi l'évolution de l'activité, soit avant, soit en cours de montaison.

Les résultats acquis montrent que lorsque la plante est à l'état de rosette, l'activité très faible dans les racines est surtout localisée dans les feuilles les plus jeunes (Fig. 32b). En cours de montaison, la réduction des nitrates s'effectue dans le bourgeon terminal et dans les jeunes feuilles (Fig. 32a). Dans les plantes de Silène, les nitrates absorbés par la racine sont réduits dans les feuilles. Il ne nous a par contre pas été possible d'étudier la stabilité de l'enzyme extraite de plantes entières. Cette étude devrait être reprise ultérieurement. Si elle aboutissait à un résultat positif, elle permettrait d'obtenir un extrait enzymatique stable sans adjonction de caséine. Nous aurions donc le moyen de recueillir rapidement une quantité importante d'enzyme nécessaire à la fabrication d'un immun-sérum. Il reste alors à souhaiter que les anticorps formés entraînaient la précipitation de la nitrate réductase extraite de la suspension cellulaire.

B I B L I O G R A P H I E

- AFRIDI, M.M.R.K. et HEWITT, E.J., 1964.- The inducible formation and stability of nitrate reductase in higher plants. I. Effects of nitrate and molybdenum on enzyme activity in Cauliflower (Brassica oleracea var. botrytis). J. of experimental Botany, 15 (44), 251-71.
- AHMED, J. et SPILLER, H., 1976.- Purification and some properties of the nitrate reductase from Ankistrodesmus braunii. Plant and Cell physiol., 17, 1-10.
- AMINDARI, S., DIRR, M.A. et SPLITTSTOESS, E.R., 1978.- Induction of nitrate reductase in pumpkin seedlings. Plant and Cell Physiol., 19 (2), 299-302.
- AMY, N.K. et GARRETT, R.H., 1974.- Purification and characterization of the nitrate reductase from the diatom Thalassiosira pseudonana. Plant Physiol., 54, 629-637.
- AMY, N.K. et GARRETT, R.H., 1979.- Immunoelectrophoretic determination of nitrate reductase in Neurospora crassa. Analytical biochemistry, 95, 97-107.
- ASLAM, M. et OAKS, A., 1975.- Effect of glucose on the induction of nitrate reductase in corn roots. Plant physiol., 56, 634-639.
- ASLAM, M. et OAKS, A., 1976.- Comparative studies on the induction and inactivation of nitrate reductase in corn roots and leaves. Plant physiol., 57, 572-576.
- ASLAM, M., OAKS, A. et HUFFAKER, R.C., 1976.- Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. Plant physiol., 58 (4), 588-591.
- ASLAM, M., HUFFAKER, R.C. et TRAVIS, R.L., 1973.- The interaction of respiration and photosynthesis in induction of nitrate reductase activity. Plant physiol., 52, 137-141.
- ASLAM, M., OAKS, A. et BOESEL, I., 1978.- Effect of L-canavanine on nitrate reductase in corn roots. Plant physiol., 62, 693-695.
- BAREA, J.L., MALDONADO, J.M. et CARDENAS, J., 1976.- Further characterization of nitrate and nitrite reductases from Chlamydomonas reinhardtii. Physiologia Pl., 36 (4), 325-32.
- BAYLEY, J.M., KING, J. et GAMBORG O.L., 1972.- The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. Planta (Berl.), 105, 15-24.
- BEEVERS, L., FLESHER, D. et HAGEMAN, R.H., 1964.- Studies on the pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase in higher plants and its relationship to sulphhydryl level. Biochem. Biophys. Acta, 89, 453-464.
- BEEVERS, L., SCHRADER, L.E., FLESHER, D. et HAGEMAN, R.H., 1965.- The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. Plant physiol., 40, 691-698.
- BEEVERS, L. et HAGEMAN, R.H., 1969.- Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. of Plant Physiol., 20, 495-522.





- BEHREND, J. et MATELES, R.I., 1975.- Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. I. Effect of amino acids on growth. *Plant physiol.*, 56, 584-589.
- BEN-ZIONI, A., VAADIA, Y. et LIPS, S.H., 1970.- Correlations between nitrate reduction, protein synthesis and malate accumulation. *Physiol. plant.*, 23; 1039-1047.
- BEN-ZIONI, A., VAADIA, Y. et LIPS, S.H., 1971.- Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. *Physiol. plant.*, 24, 288-290.
- BLEVINS, D. et BARNETT, N., 1975.- The role of potassium and malate in nitrate uptake and translocation by wheat seedlings. *Plant physiol.* (56) suppl. 42
- (a) BLEVINS, D.G., HIATT, A.J., LOWE, R.H. et LEGGETT, J.E., 1978.- Influence of K on the uptake, translocation, and reduction of nitrate by barley seedlings. *Agronomy journal*, 70, 393-396.
- (b) BLEVINS, D.G., BARNETT, N.M. et FROST, W.B., 1978.- Role of potassium and malate in nitrate uptake and translocation by wheat seedlings. *Plant physiol.*, 62, 784-788.
- BÖHME, H.J., KOPPERSCHLAGER, G., SCHULZ, J. et HOFMANN, E., 1972.- Affinity chromatography of phosphofructokinase using cibacron blue F 3 G-A. *J. Chromatogr.*, 69, 209-214.
- BOTTOMLEY, W., HIGGINS T.J.V. et WHITFIELD, P.R., 1976.- Differential recognition of chloroplast and cytoplasmic messenger RNA by 70 S p 80 S ribosomal systems. *Febs Lett.* 63 (1), 120-124.
- BRASSART, C., 1976.- Culture de cellules végétales en fermenteurs. Essais avec les cellules du Silene alba (Miller) E.H.L. Krause. D.E.A. 3e Cycle, Univ. Lille I.
- BRASSART, C., DUBOIS, J. et BOURIQUET, R., 1978.- Nutrition azotée d'une suspension cellulaire de Silène (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 287, 1373-1376.
- BRUNETTI, N. et HAGEMAN, R.H., 1976.- Comparison of in vivo and in vitro assays of nitrate reductase in wheat (Triticum aestivum L.) seedlings. *Plant physiol.*, 58 (4), 583-587.
- BUCZEK, J., 1976.- The role of light in the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in cucumber seedlings. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. XLV, n° 1-2, 77-92.
- BUTZ, R.G. et JACKSON, W.A., 1977.- A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochemistry*, 16, 409-417.
- (a) CAMPBELL, W.H., 1976.- Separation of soybean leaf nitrate reductases by affinity chromatography. *Pl. Sci. Lett.*, 7 (4), 239-47, 1976.
- (b) CAMPBELL, W.H., 1976.- Separation of two nitrate reductase activities from the scutellum of corn by affinity chromatography. *Plant physiol. Suppl.* 70.
- CAMPBELL, W.H., 1978.- Isolation of NAD(P)H : nitrate reductase from the scutellum of maize. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 88, 357-361.

- CAMPBELL, W.H. et SMARRELLI, J. Jr, 1978.- Purification and kinetics of higher plant NADH : nitrate reductase. *Plant physiol.*, 61, 611-616.
- CANDELA, M.I., FISHER, E.G. et HEWITT, E.J., 1957.- Molybdenum as a plant nutrient. X. Some factors affecting the activity of nitrate reductase in cauliflower plants grown with different nitrogen sources and molybdenum levels in sand culture. *Plant physiol.*, 32, 280-288.
- CHAMPIGNY, M.L., 1963.- L'activité de la nitrate réductase des végétaux supérieurs. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, 9, n° 2 86-93.
- CHISHOLM, K.W. et GALITZ, D.S., 1975.- Chronological profiles of nitrate reductase activity in sunflowers. *Plant physiol.*, 56, Sup. n° 2, 35.
- CHROBOCZEK-KELKER, H. et FILNER, P., 1971.- Regulation of nitrite reductase and its relationship to the regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 252, 69-82.
- CIFERRI, O., 1975.- Mechanism of protein synthesis in higher plants. In "The chemistry and biochemistry of plants proteins". J.B. HARBORNE and C.F. VAN SUMERE (Eds.), Acad. Press, New York.
- COUPE, M., CHAMPIGNY, M.L. et MOYSE A., 1967.- Sur la localisation intracellulaire de la nitrate réductase dans les feuilles et les racines d'orge. *Physiol. végét.*, 5, 271-291.
- COVE, D.J., 1966.- The induction and repression of nitrate reductase in the fungus Aspergillus nidulans. *Biochim. Biophys. Acta*, 113, 51-56.
- CRESSWELL, C.F., HAGEMAN, R.H., HEWITT, E.J. et HUCKLESBY, 1965.- The reduction of nitrate, nitrite and hydroxylamine to ammonia by enzymes from Cucurbita pepo L. in the presence of reduced benzyl viologen as electron donor. *Biochem. J.*, 94, 40-53.
- CRIDDLE, R.S., DAU, B., KLEINKOPF, G.E. et HUFFAKER, R.C., 1970.- Differential synthesis of ribulose diphosphate carboxylase subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 41, 621-677.
- DANTZIG, A.H., ZUROWSKI, W.K., BALL, T.M. et NASON, A., 1978.- Induction and repression of nitrate reductase in Neurospora crassa. *Journal of Bacteriology*, 133 (2) 671-79.
- DE LA ROSA, F.F., CASTILLO, F. et PALACIAN E., 1977.- Effects of denaturing agents on spinach nitrate reductase. *Phytochem.*, 16, 875-879.
- DELSENY, M., ASPART, L., GUITTON, Y., 1977.- Effect of the protein synthesis inhibitor cycloheximide on RNA synthesis in radish seedlings. *Biochim.*, 59, 51-57.
- DOWNEY, R.J., 1971.- Characterization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase of Aspergillus nidulans. *Journal of Bacteriol.*, 105 (3), 759-768.
- DUBOIS, J. et BOURIQUET, R., 1974.- Culture in vitro de tissus et de suspensions cellulaires du Silene alba (Miller) E.H.L. Krause. *Société de Botanique du Nord de la Fr.*, 1, 70-88.

- DUBOIS, J., 1975.- Analyse quantitative de la croissance d'une culture de cellules du *Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause. Bull. Soc. Bot. de Fr., 122, n° 7-8, 269-280.
- DUBOIS, J., RAMBOUR, S. et VASSEUR, J., 1976.- Croissance d'une suspension cellulaire de *Silène* (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause) et évolution des acides nucléiques. Actes du 101e Congr. nat. des Soc. sav., Lille, Sciences, fasc. 1, 441-454.
- DUBOIS, J. et MORVAN, H., 1977.- Effets de la température et de la lumière sur la croissance des suspensions cellulaires de *Silène* et d'*Erable*. Bull. Soc. Bot. de France (soumis à publication).
- DUSKY, J.A. et GALITZ, D.S., 1977.- Nitrate reduction in different grass species. *Physiol. Plant.*, 39, 215-220.
- EVANS, H.J. et NASON, A., 1953.- Pyridine nucleotide nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.*, 28, 233-254.
- FERRARI, T.E. et VARNER, J.E., 1969.- Substrate induction of nitrate reductase in Barley aleurone layers. *Plant physiol.*, 44, n° 1, 85-88.
- FERRARI, T.E. et VARNER, J.E., 1971.- Intact tissue assay for nitrate reductase in Barley aleurone layers. *Plant physiol.*, 47, 790-794.
- FERRARI, T.E., YODER, O.C. et FILNER, P., 1973.- Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues : evidence for two nitrate pools. *Plant physiol.*, 51, 423-431.
- FILNER, P., 1966.- Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 299-310.
- GARRETT, R.H. et NASON, A., 1967.- Involvement of a b-type cytochrome in the assimilatory nitrate reductase of *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 58 (4), 1603-1610.
- GARRETT, R.H. et NASON, A., 1969.- Further purification and properties of *Neurospora* nitrate reductase. *J. Biol. Chem.*, 244 (11), 2870-2882.
- GRAF, L., NOTTON, B.A. et HEWITT, E.J., 1975.- Serological estimation of spinach nitrate reductase. *Phytochemistry*, 14, 1241-1243.
- HAGEMAN, R.H. et FLESHER, D., 1960.- Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant physiol.*, 35, 700-708.
- HAGEMAN, R.H., CRESSWELL, C.F. et HEWITT, E.J., 1962.- Reduction of nitrate, nitrite and hydroxylamine to ammonia by enzymes extracted from higher plants. *Nature*, 193, 247-250.
- HAGEMAN, R.H., HUCKLESBY, D.P., 1971.- Nitrate reductase from higher plants. *Methods enzymol.*, 23, 491-503.
- HAHLBROCK, K., EBEL, J. et OAKS, A., 1974.- Determination of specific growth stages of plant cell suspension cultures by monitoring conductivity changes in the medium. *Planta (Berl.)*, 118, 75-84.

- HEIMER, Y.M. et FILNER, P., 1971.- Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system. *Bioch. Biophys. Acta*, 230, 362-372.
- HEIMER, Y.M., 1976.- Specificity for nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate of nitrate reductase from the salt-tolerant alga Dunaliella parva. *Plant physiol.*, 58, 57-59.
- HEIMER, Y.M., KRASMIN, S. et RIKLIS, E., 1976.- The use of affinity chromatography for the purification of nitrate reductase. *Febs Letters*, 62 (1), 30-32.
- HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J. Ma, BAREA, J.L. et LOSADA, M., 1972.- Regulation by ammonia of nitrate reductase synthesis and activity in Chlamydomonas reinhardi. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 48, 996-1003.
- HEWITT, E.J. et NICHOLAS, D.J.D., 1964.- Enzymes of Inorganic Nitrogen Metabolism In : *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* 7. Band. Volume VII, 67-172 Springer-Verlag Berlin Gröttingen, Heidelberg.
- HEWITT, E.J., 1975.- Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant physiol.*, 26, 73-100.
- HEWITT, E.J., NOTTON, B.A. et RUCKLIDGE, G.J., 1977.- Formation of nitrate reductase by recombination of apoprotein fractions from molybdenum-deficient plants with a molybdenum-containing complex. *Journal of the less-common Metals*, 54, 537-553.
- HIPKIN, C.R., AL-BASSAM, B.A. et SYRETT, P.J., 1979.- Pyridine nucleotide specificity and other properties of purified nitrate reductase from Chlorella variegata. *Planta*, 144, 137-141.
- HOXMARK, R.C. et NORDBY, Q., 1977.- A warning against using chloramphenicol in the light. *Plant Science letters*, 8, 113-118.
- IHLE, J.N. et DURE, L., 1969.- Synthesis of a protease in germinating cotton cotyledons catalyzed by mRNA synthesized during embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36, 705-710.
- INGLE, J., 1968.- Nucleic acid and protein synthesis associated with the induction of nitrate reductase activity in radish cotyledons. *Biochem. J.*, 108, 715-724.
- ITO, N. et SUZUKI, Y., 1978.- Inactivation of nitrate reductase of the yeast, Rhodotorula glutinis. *Physiol. Plant.*, 44, 15-20.
- JACKSON, W.A., FLESHER, D. et HAGEMAN, R.H., 1973.- Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings. Some characteristics of apparent induction. *Plant physiol.*, 51 (1), 120-127.
- JAVILLIER, M., POLONOVSKI, M., FLORKIN, M., BOULANGER, P., LEMOIGNE, M., ROCHE, J. WURMSER, R., 1972.- *Traité de biochimie générale*. Tome III, 3e fasc. 723 p. Masson et Cie (Edit.), Paris.

- JAWORSKI, E.G. (1971).- Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 43, 1274-1279.
- JOHNSON, C.B., 1976.- Rapid activation by phytochrome of nitrate reductase in the cotyledons of *Sinapis alba*. *Planta*, 128, 127-131.
- JOLLY, S.O., CAMPBELL, W.H et TOLBERT, N.E., 1975.- NADH- and NADPH - nitrate reductase isoenzymes isolated from soybean leaves. *Plant physiol.*, Suppl. 56, n° 2. 73. Abstr. 399.
- JOLLY, S.O., CAMPBELL, W.H. et TOLBERT, N.E., 1976.- NADPH- and NADH - nitrate reductases from soybean leaves. *Arch. Bioch. Biophys.*, 174, 431-439.
- JONES, R.W. et SHEARD, R.W., 1973.- Nitrate reductase activity of dark-grown and light - exposed etiolated field peas (*Pisum arvense*). *Can. J. Bot.*, 51, 27-35.
- JONES, R.W. et SHEARD R.W., 1975.- Phytochrome, nitrate movement and induction of nitrate reductase in etiolated pea terminal buds. *Plant physiol.*, 55, 954-959.
- JONES, R.W., ABBOTT, A.J., HEWITT, E.J., JAMES, D.M. et BEST, G.R., 1976.- Nitrate reductase activity and growth in Paul's Scarlet Rose suspension cultures in relation to nitrogen source and molybdenum. *Planta*, 133, 27-34.
- JONES, R.W., ABBOTT, A.J., HEWITT, E.J., BEST, G.R. et WATSON, E.F., 1978.- Nitrate reductase activity in Paul's Scarlet Rose suspension cultures and the differential role of nitrate and molybdenum in induction. *Planta*, 141, 183-189.
- JÖNSSON, A.G. et MARTIN, S.M., 1964.- Protease production by *Aspergillus fumigatus*. *Agric. Biol. Chem.*, 28, 734-738.
- JOY, K.W., 1969.- Nitrogen metabolism of *Lemna minor*. II. Enzymes of nitrate assimilation and some aspects of their regulation. *Plant physiol.*, 44, 849-853.
- KADAM, S.S., GANDHI, A.P., SAWHNEY, S.K. et NAIK, M.S., 1974.- Inhibitor of nitrate reductase in the roots of rice seedlings and its effect on the enzyme activity in the presence of NADH. *Biochem. Biophys. Acta*, 350, 162-170.
- KESSLER, E., 1964.- Nitrate assimilation by plants. *Annual review of Plant physiol.*, 15, 57-72.
- KINSKY, S.C., 1961.- Induction and repression of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 82, 898-904.
- KLEPPER, L. et HAGEMAN, R.H., 1969.- The occurrence of nitrate reductase in apple leaves. *Plant physiol.*, 44, 110-114.
- KLEPPER, L., FLESHER, D. et HAGEMAN, R.H., 1971.- Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.*, 48, 580-590.
- LE CLAIRE, J.A. et GRANT, B.R., 1972.- Nitrate reductase from *Dunaliella tertiolecta*, purification and properties. *Plant and Cell Physiol.*, 13, 899-907.
- LESCURE, A.M., 1969.- Mutagenèse et sélection de cellules d'*Acer pseudoplatanus* L. cultivées in vitro. *Physiol. vég.*, 7, 237-250.

- LOSADA, M., PANEQUE, A., APARICIO, P.J., VEGA, J.M., CARDENAS, J. et HERRERA, J., 1970  
Inactivation and repression by ammonium of the nitrate reducing system  
in Chlorella. Bioch. Biophys. Res. Comm., 38 (6), 1009-1015.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J., 1951.- Protein measure-  
ment with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Mc CULLOUGH, W. et JOHN, P.C.L., 1972.- The inhibition of functional RNA synthesis  
in Chlorella pyrenoidosa by 6-methyl purine. New phytol., 71, 829-837.
- Mc MAHON, D., 1975.- Cycloheximide is not a specific inhibitor of protein synthesis  
in vivo. Plant physiol., 55, 815-821.
- MIFLIN, B.J., 1967.- Distribution of nitrate and nitrite reductases in Barley.  
Nature, 214, 1133-34.
- MIFLIN, B.J. et LEA, P.J., 1976.- The pathway of nitrogen assimilation in plants.  
Phytochemistry, 15, 873-885.
- MOHANTY, B. et FLETCHER, J.S., 1976.- Ammonium influence on the growth and nitrate  
reductase activity of Paul's Scarlet Rose Suspension cultures. Plant  
Physiol., 58, 152-155.
- NASON, A. et EVANS, H.J., 1953.- Triphosphopyridine nucleotide-nitrate reductase  
in Neurospora. J. Biol. Chem., 202, 655-673.
- NEYRA, C.A. et HAGEMAN, R.H., 1975.- Nitrate uptake and induction of nitrate reduc-  
tase in excised corn roots. Plant physiol., 56, 692-695.
- NEYRA, C.A. et HAGEMAN, R.H., 1976.- Relationships between carbon dioxide, malate,  
and nitrate accumulation and reduction in corn (Zea mays L.) seedlings.  
Plant physiol., 58, 726-730.
- NEYRA, C.A. et HAGEMAN, R.H., 1978.- Pathway for nitrate assimilation in corn  
(Zea mays L.) leaves. Cellular distribution of enzymes and energy sources  
for nitrate reduction. Plant physiol., 62, 618-621.
- (a) NICHOLAS, D.J.D. et NASON, A., 1954.- Mechanism of action of nitrate reductase  
from Neurospora. J. Biol. Chem., 211, 183-197.
- (b) NICHOLAS, D.J.D. et NASON, A., 1954.- Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum  
as a constituent of nitrate reductase. Jour. Biol. Chem., 207, 353-360.
- NICHOLAS, D.J.D. et NASON, A., 1955.- Role of molybdenum as a constituent of nitrate  
reductase from soybean leaves. Plant physiol., 30, 135-138.
- (a) NICHOLAS, J.C., HARPER, J.E. et HAGEMAN, R.H., 1976.- Nitrate reductase activity  
in soybeans (Glycine max (L) Merr. I. Effects of light and temperature.  
Plant physiol., 58, 731-735.
- (b) NICHOLAS, J.C., HARPER, J.E. et HAGEMAN, R.H., 1976.- Nitrate reductase activity in  
soybeans (Glycine max (L.) Merr.). II. Energy limitations. Plant physiol.,  
58, 736-739.
- (a) NOTTON, B.A. et HEWITT, E.J., 1971.- Incorporation of radioactive molybdenum into pro-  
tein during nitrate reductase formation and effect of molybdenum on  
nitrate reductase and diaphorase activities of spinach (Spinacea oleracea L.)  
Plant and Cell Physiol., 12, 465-477.

- (b) NOTTON, B.A. et HEWITT, E.J., 1971.- The role of tungsten in the inhibition of nitrate reductase activity in Spinach (Spinacea oleracea L.) leaves. Bioch. & Biophys. Res. Comm., 44, (3), 702-710.
- NOTTON, B.A., HEWITT, E.J. et FIELDING, A.H., 1972.- Isoelectric focusing of Spinach nitrate reductase and its tungsten analogue. Phytochem., 11, 2447-2449.
- NOTTON, B.A., FIDO, R.J. et HEWITT, E.J., 1977.- The presence fo functional haem in a higher plant nitrate reductase. Plant Science Letters, 8, 165-170.
- OAKS, A., WALLACE, W. et STEVENS, D., 1972.- Synthesis and turnover of nitrate reductase in Corn roots. Plant physiol., 50, 649-654.
- OAKS, A., 1974.- The regulation of nitrate reductase in suspension cultures of soybean cells. Bioch. Biophys. Acta, 372, 122-126.
- OAKS, A., ASLAM, M. et BOESEL, I., 1977.- Ammonium and amino acids as regulators of nitrate reductase in corn roots. Plant physiol., 59, 391-394.
- (a) OJI, Y. et IZAWA, G., 1969.- Flavine nucleotide nitrate reductase from broad bean leaves. Plant and cell physiol., 10, 743-749.
- (b) OJI, Y. et IZAWA, G., 1969.- Effects of univalent cations on the formation of nitrate reductase and nitrite reductase in rice seedlings. Plant and cell physiol., 10, 665-674.
- PAN, Y. et MARSH, H.V., 1972.- An investigation of the nitrate reductase inhibitor(s) in the roots of Zea mays. Plant physiol., 49 Suppl., Abstr. 274, 49.
- PANEQUE, A., DEL CAMPO, F.F., RAMIREZ, J.M. et LOSADA, M., 1965.- Flavin nucleotide nitrate reductase from Spinach. Bioch. Biophys. Acta, 109, 79-85.
- PANEQUE, A. et LOSADA, M., 1966.- Comparative reduction of nitrate by Spinach nitrate reductase with NADH<sub>2</sub> and NADPH<sub>2</sub>. Biochim. Biophys. Acta, 128, 202-204.
- PAULSEN, G.M. et HARPER, J.E., 1968.- Evidence for a role of calcium in nitrate assimilation in wheat seedlings. Plant physiol., 43, n° 5, 775-780.
- PFLUGER, R. et WIEDEMANN, R., 1977.- Der einfluß monovalenter kationen auf die nitratrereduktion von Spinacia oleracea L. Z. Pflanzenphysiol., Bd. 85 S. 125-133.
- POULLE, M., 1977.- Conditions de l'induction de la nitrate réductase d'une suspension cellulaire de Silene alba (Miller) E.H.L. Krause. D.E.A. 3e Cycle. Univ. Lille I.
- PURVIS, A.C., TISCHLER, C.R. et FITES, R.C., 1976.- In vitro studies of nitrate reductase activity in cotton cotyledons. Effects of Dowex 1-Cl and BSA. Plant physiol., 58 (1), 95-99.

- RADIN, J.W., 1976.- Regulation of nitrate reductase induction by glycine in cotton root tips : interactions with other amino acids. Plant physiol. Ann. Meet. Suppl., Abstr. 209, 39.
- RAMBOUR, S., VASSEUR, J. et DUBOIS J., 1977.- Mise en évidence d'ARN polyadénylés dans des suspensions cellulaires de Silene alba. C. R. Acad. Sc. Paris, 284, 1063-1066.
- RAMBOUR, S., VASSEUR, J. et DUBOIS, J., 1978.- Ribonucleic acid synthesis during early stages of growth cycle of Silene alba cells in batch suspension culture. Federation of European Societies of Plant Physiology, Inaugural Meeting, Edinburgh, abstract 200, 436-437.
- RAO, K.P. et RAINS, D.W., 1976.- Nitrate absorption by barley. 1. Kinetics and energetics. Plant physiol., 57, 55-58.
- RELIMPIO, A.Ma., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. et LOSADA, M., 1971.- Specific protection against inhibitors of the NADH-nitrate reductase complex from Spinach. Febs letters, 17 (2), 226-230.
- ROBIN, P., 1979.- Etude de quelques conditions d'extraction de la nitrate réductase des racines et des feuilles de plantules de maïs. Physiol. vég., 17(1), 45-54.
- RODIER, J., 1971.- Analyse chimique et physicochimique de l'eau. Méthode au salicylate de sodium. Ed. DUNOD (4ème édition).
- ROUSTAN, J.L., NEUBURGER, M. et FOURCY, A., 1974.- Nitrate reductase of maize leaves. Some properties. Physiol. vég., 12 (4), 527-544.
- SAHULKA, J., 1977.- The effect of some ammonium salts on nitrate reductase level, on in vivo nitrate reduction and on nitrate content in excised Pisum sativum Roots. Biol. Plant. (Praha), 19, 113-128.
- SAHULKA, J., 1978.- The effect of chloride on nitrate reductase level, on anaérobic nitrite production, and on nitrate content in excised Pisum sativum L. roots. Biol. Plant. (Praha), 20, 201-209.
- SAHULKA, J. et LISA, L., 1978.- The influence of sugars on nitrate reductase induction by exogenous nitrate or nitrite in excised Pisum sativum. Biol. Plant. (Praha)., 20, 359-367.
- (a) SANDERSON, G.W. et COCKING, E.C., 1964.- Enzymic assimilation of nitrate in tomato plants. I. Reduction of nitrate to nitrite. Plant physiol., 39, 416-422.
- (b) SANDERSON, G.W. et COCKING, E.C., 1964.- Enzymic assimilation of nitrate in tomato plants. II. Reduction of nitrite to ammonia. Plant physiol., 39, 423-431.
- SASAKAWA, H. et YAMAMOTO, Y., 1977.- Influences of some internal and external conditions on the induction of nitrate reductase in rice seedlings. Plant and cell physiol., 18, 207-214.
- SASAKAWA, H. et YAMAMOTO, Y., 1978.- Comparison of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings. Influences of light, temperature, oxygen concentration, exogenous sucrose, and metabolic inhibitors. Plant physiol., 62, 665-669.



- (a)SAWHNEY, S.K., NAIK, M.S. et NICHOLAS, D.J.D., 1978.- Regulation of nitrate reduction by light, ATP and mitochondrial respiration in wheat leaves. *Nature*, 272, 647-48.
- (b)SAWHNEY, S.K., NAIK, M.S. et NICHOLAS, D.J.D., 1978.- Régulation of nitrate reduction by light in wheat leaves. *Proceed. of the Austral. Biochem. Soc.* 11, 39.
- SCHLOEMER, R.H. et GARRETT, R.H., 1973.- Partial purification of the NADH. nitrate reductase complex from Chlorella pyrenoidosa. *Plant physiol.*, 51, 591-593.
- SCHRADER, L.E., BEEVERS, L. et HAGEMAN, R.H., 1967.- Differential effects of chloramphenicol on the induction of nitrate and nitrite reductases in green leaf tissue. *Biochem. Biophys. commun.*, 26, 14-17.
- SCHRADER, L.E., RITENOUR, G.L., EILRICH, G.L. et HAGEMAN, R.H., 1968.- Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. *Plant physiol.*, 43, 930-940.
- SCHRADER, L.E., CATALDO, D.A. et PETERSON, D.M., 1974.- Use of protein in extraction and stabilization of nitrate reductase. *Plant physiol.*, 53, 688-690.
- SHANER, D.L. et BOYER, J.S., 1976.- Nitrate reductase activity in maize (Zea mays L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant physiol.*, 58 (4), 499-504.
- SHEN, T.C., 1969.- The induction of nitrate reductase and the preferential assimilation of ammonium in germinating rice seedlings. *Plant physiol.*, 44, 1650-1655.
- SHEN, T.C., 1972.- Variation in the nitrate reductase of rice seedlings. *Planta (Berl.)*, 108, 21-28.
- SHEN, T.C., FUNKHOUSER, E.A. et GUERRERO, M.G., 1976.- NADH- and NAD(P)H- nitrate reductases in rices seedlings. *Plant physiol.*, 58, 292-294.
- SHERRARD, J.H. et DALLING, M.J., 1978.- Effect of casein on the extractability and stability of nitrate reductase from wheat leaves. *Ann. Bot.*, 42, 1421-1427.
- SIHAG, R.K., GUHA-MUKHERJEE, S. et SOPORY, S.K., 1978.- Regulation of nitrate reductase level in pea : in vivo stability by ammonium. *Biochem. and Biophys. research communic.*, 85 (3), 1017-1024.
- SLUITERS-SCHOLTEN, C.M. TH., 1973.- Effect of chloramphenicol and cycloheximide on the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in Bean leaves. *Planta (Berl.)*, 113, 229-240.
- (a)SMITH, F.W. et THOMPSON, J.F., 1971.- Regulation of nitrate reductase in excised Barley roots. *Plant physiol.*, 48, n° 2, 219-223.
- (b)SMITH, F.W. et THOMPSON, J.F., 1971.- Regulation of nitrate reductase in Chlorella vulgaris. *Plant physiol.*, 48, n° 2, 224-227.

- SOLOMONSON, L.P. et VENNESLAND, B., 1972.- Properties of a nitrate reductase of Chlorella. Bioch. Biophys. Acta, 267, 544-557.
- SOLOMONSON, L.P., 1975.- Purification of NADH-nitrate reductase by affinity chromatography. Plant physiol., 56, 853-855.
- SOLOMONSON, L.P., LORIMER, G.H., HALL, R.L., BORCHERS, R. et BAILEY, J.L. 1975.- Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-nitrate reductase of Chlorella vulgaris. Purification, prosthetic groups, and molecular properties. J. Biol. Chem., 250 (11), 4120-4127.
- SORGER, G.J., 1965.- Simultaneous induction and repression of nitrate reductase and TPNH cytochrome C reductase in Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Acta, 99, 234-45.
- SORGER, G.J. et DAVIES, J., 1973.- Regulation of nitrate reductase of Neurospora at the level of transcription and translation. Biochem. J., 134, 673-685.
- (a) SUBRAMANIAN, K.N. et SORGER, G.J., 1972.- Regulation of nitrate reductase in Neurospora crassa : stability in vivo. Journ. of Bacteriol., 110 (2), 538-546.
- (b) SUBRAMANIAN, K.N. et SORGER, G.J., 1972.- Regulation of nitrate reductase in Neurospora crassa : regulation of transcription and translation. Journ. of Bacteriol., 110 (2), 547-553.
- (c) SUBRAMANIAN, K.N. et SORGER, G.J., 1972.- The role of molybdenum in the synthesis of Neurospora nitrate reductase. Biochim. Biophys. Acta, 256, 533-543.
- THOMPSON, S.T., CASS, K.H. et STELLWAGEN, E., 1975.- Blue dextran-sepharose : An affinity column for the dinucleotide fold in proteins (nucleotide site/protein purification/super secondary structure/structural homology). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72 (2), 669-672.
- THOMPSON, S.T. et STELLWAGEN, E., 1976.- Binding of Cibacron blue F<sub>3</sub>GA to proteins containing the dinucleotide fold. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73, 361-365.
- TRAVIS, R.L., HUFFAKER, R.C. et KEY, J.L., 1970.- Light-induced development of polyribosomes and the induction of nitrate reductase in corn leaves. Plant physiol., 46, 800-805.
- TRAVIS, R.L. et KEY, J.L., 1971.- Correlation between polyribosome level and the ability to induce nitrate reductase in dark-grown corn seedlings. Plant physiol., 48, 617-620.
- UPCROFT, J.A. et DONE, J., 1974.- Starch gel electrophoresis of plant NADH-nitrate reductase and nitrite reductase. Journ. of Experim. Bot., 25, 503-508.
- VEGA, J.M., HERRERA, J., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. et LOSADA, M. (1971).- Role of molybdenum in nitrate reduction by Chlorella. Plant physiol., 48, 294-299.

- VENNESLAND, B. et JETSCHMANN, C., 1971.- The nitrate reductase of Chlorella pyrenoidosa. Bioch. Biophys. Acta, 227, 554-564.
- WALLACE, W. et PATE, J.S., 1965.- Nitrate reductase in the field pea (Pisum arvense L.). Annals of Bot., 29 (116), 655-671.
- WALLACE, W., 1973.- A Nitrate reductase inactivating enzyme from the maize root. Plant physiol., 52 n° 3, 197-201.
- WALLACE, W., 1974.- Purification and properties of a nitrate reductase-inactivating enzyme. Biochim. et Biophys. Acta, 341, 265-276.
- (a) WALLACE, W., 1975.- Effects of a nitrate reductase inactivating enzyme and NAD(P) H on the nitrate reductase from higher plants and Neurospora. Biochim. et Biophys. Acta, 377, 239-250.
- (b) WALLACE, W., 1975.- A re-evaluation of the nitrate reductase content of the maize root. Plant physiol., 55, 774-777.
- WEBER, K. et OSBORN, M., 1969.- The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The Journ. of Biolog. chem., 244 (16), 4406-4412.
- WELANDER, M., 1978.- The effect of mercaptoethanol on the activity of enzymes of nitrogen metabolism in leaves from Urtica dioica and Spinacia oleracea. Physiol. plant., 43, 242-246.
- WELLS, G.N. et HAGEMAN, R.H., 1970.- The conversion of NADPH to NADH by phosphatase activity in extracts of green leaves. Plant physiol., 46 suppl. Abstr. 243, 45.
- WELLS, G.N. et HAGEMAN, R.H., 1974.- Specificity for nicotinamide adenine dinucleotide by nitrate-reductase from leaves. Plant physiol., 54, n° 2, 136-141.
- WILSON, J.E., 1976.- Applications of blue dextran and Cibacron blue F<sub>3</sub>GA in purification and structural studies of nucleotide-requiring enzymes. Biochem. Biophys. Res. commun., 72 (3), 816-823.
- WRAY, J.L. et FILNER, P., 1970.- Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in Barley. Biochem. J., 119, 715-725.
- YAMAYA, T. et OHIRA, K., 1976.- Nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture. Plant and Cell Physiol., 17, 633-641.
- YAMAYA, T. et OHIRA, K., 1977.- Purification and properties of a nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture. Plant and Cell Physiol., 18, 915-925.
- YAMAYA, T. et OHIRA, K., 1978.- Nitrate reductase inactivating factor from rice seedlings. Plant and Cell Physiol., 19 (2), 211-220.
- YOUNG, M., 1973.- Studies on the growth in culture of plant cells. XVI. Nitrogen assimilation during nitrogen limited growth of Acer pseudoplatanus L. cells in chemostat culture. J. exp. Bot., 24, 1172-1185.

- ZIELKE, H.R. et FILNER, P., 1971.- Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultured tobacco cells. Journ. of Biol. Chem., 246, 1772-1779.
- ZINK, M.W. et VELIKY, I.A., 1977.- Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductases in cultured Ipomoea cells. Can. J. Bot., 55, n° 12, 1557-1568.
- ZUMFT, W.G., PANEQUE, A., APARICIO, P.J. et LOSADA, M., 1969.- Mechanism of nitrate reduction in Chlorella. Bioch. Biophys. Res. Com., 36 (6), 980-986.
- ZUMFT, W.G., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. et LOSADA, M., 1970.- Structural and functional role of FAD in the NADH-nitrate reducing system from Chlorella. Febs letters, 9 (3), 157-160.

# TABLE DES MATIERES

- 0 -

|   |      |
|---|------|
| INTRODUCTION  | p. 1 |
| HISTORIQUE  | p. 2 |
| I STRUCTURE ET MECANISME D'ACTION DE LA NITRATE REDUCTASE CHEZ LES EUCARYOTES                       | p. 2 |
| A) F A D ET GROUPEMENTS PROSTHETIQUES   | p. 2 |
| B) PRESENCE DE GROUPEMENTS THIOLS   | p. 2 |
| C) PRESENCE DU MOLYBDENE  | p. 3 |
| D) LES DIFFERENTS DONNEURS D'ELECTRONS  | p. 4 |
| 1) Spécificité des nucléotides à pyridine NADH et NADPH   | p. 4 |
| 2) Les autres donneurs d'électrons  | p. 5 |
| E) FONCTIONS, MODELES STRUCTURAUX ET MECANISME D'ACTION DE LA NITRATE REDUCTASE                     | p. 6 |
| 1) Chez les champignons   | p. 6 |
| 2) Chez les algues  | p. 7 |
| 3) Chez les plantes supérieures   | p. 8 |
| II PURIFICATION DE LA NITRATE REDUCTASE   | p.12 |
| III NITRATE REDUCTASE ET SYSTEME D'INDUCTION. INFLUENCE DU SUBSTRAT                                 | p.14 |
| A) NATURE INDUCTIBLE DE L'ENZYME  | p.14 |
| B) REGULATION PAR LES NITRATES  | p.15 |
| 1) Influence du substrat  | p.15 |
| 2) Nitrates et induction maximale   | p.15 |
| 3) Existence d'une période de latence   | p.16 |
| 4) Absorption et réduction des nitrates- compartimentation intracellulaire                          | p.16 |
| 5) Absorption et transport des nitrates-perméases   | p.18 |
| IV NITRATE REDUCTASE ET NUTRITION AZOTEE - REGULATION METABOLIQUE                                   | p.19 |
| A) ROLE DE L'ENZYME DANS LA NUTRITION AZOTEE  | p.19 |
| B) REGULATION DES LA NITRATE REDUCTASE  | p.20 |
| 1) Régulation par l'ammonium et autres substances azotées   | p.20 |
| a) l'ammonium   | p.20 |
| b) les acides aminés, leurs analogues et leurs dérivés  | p.22 |
| 2) Régulation par la lumière et les sources carbonées - Schémas possibles de régulation métabolique | p.23 |
| 3) Influence de la nutrition minérale   | p.26 |

|   |       |
|---|-------|
| MATERIEL ET METHODES  | p.27  |
| I LA SUSPENSION CELLULAIRE                                      | p.27  |
| A) LE MATERIEL BIOLOGIQUE                                       | p.27  |
| B) LE MILIEU NUTRITIF   | p.27  |
| 1) Minéraux   | p.27  |
| 2) Organiques   | p.28  |
| C) MESURE DE LA CROISSANCE                                      | p.28  |
| 1) Poids de matière fraîche                                     | p.28  |
| 2) Poids de matière sèche                                       | p.28  |
| II DOSAGE DE L'AZOTE NITRIQUE                                   | p.29  |
| III EMPLOI DES INHIBITEURS                                      | p.30  |
| A) LA CYCLOHEXIMIDE   | p.30  |
| B) LA 6-METHYLPURINE  | p.30  |
| C) LE CHLORAMPHENICOL   | p.30  |
| IV ESSAIS DE REINDUCTION  | p.30  |
| V MESURE DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE IN VITRO               | p.30  |
| A) PREPARATION DE L'EXTRAIT BRUT ENZYMATIQUE                    | p.30  |
| B) MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE IN VITRO                    | p.31  |
| 1) Avec N A D H comme donneur d'électrons                       | p.31  |
| 2) Avec F M N H <sub>2</sub> comme donneur d'électrons          | p.31' |
| 3) Avec méthyl viologène réduit comme donneur d'électrons       | p.31' |
| VI MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE IN VIVO                     | p.32  |
| VII MODIFICATIONS APPORTEES LORS DE LA PURIFICATION D'ENZYME    | p.32  |
| VIII DOSAGE DES PROTEINES                                       | p.33  |
| IX MARQUAGE DES PROTEINES PAR LA LEUCINE 3 H                    | p.33  |
| X COUPLAGE DU BLEU CIBACRON F <sub>3</sub> GA AU SEPHADEX G 200 | p.33  |
| XI ANALYSES EN ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE         | p.33  |

|   |      |
|---|------|
| RESULTATS ET DISCUSSION   | p.35 |
| I QUELQUES CONDITIONS DE L'EXTRACTION ET DE L'INCUBATION DE LA NITRATE REDUCTASE DE <i>SILENE ALBA</i>            | p.35 |
| A) INFLUENCE DE LA CYSTEINE   | p.35 |
| B) INFLUENCE DE L'EDTA  | p.37 |
| C) NATURE ET CONDITIONS D'UTILISATION DES DONNEURS D'ELECTRONS  | p.37 |
| 1) Le NADH  | p.37 |
| 2) Le NADPH   | p.39 |
| 3) Le FMNH <sub>2</sub>   | p.39 |
| 4) Le méthyl viologène réduit   | p.39 |
| 5) Conclusion   | p.39 |
| D) DETERMINATION DU pH OPTIMAL D'INCUBATION   | p.41 |
| E) STABILITE DE L'ENZYME  | p.41 |
| II CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE ET ACTIVITE NITRATE REDUCTASE   | p.43 |
| A) VARIATIONS DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE AU COURS DU CYCLE DE CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE         | p.43 |
| B) EXISTENCE D'UNE PERIODE DE LATENCE   | p.43 |
| C) DISCUSSION   | p.44 |
| III ACTIVITE NITRATE REDUCTASE ET ABSORPTION DES NITRATES   | p.46 |
| IV INFLUENCE DU MOLYBDENE   | p.49 |
| A) EFFET D'UNE FAIBLE DOSE D'AMMONIUM   | p.51 |
| B) INFLUENCE D'UNE DOSE ELEVEE D'AMMONIUM   | p.52 |
| C) CONCLUSION   | p.56 |
| V ETUDE DE L'INDUCTION DE L'ENZYME  | p.58 |
| A) EXPERIENCES DE REINDUCTION DE L'ENZYME   | p.61 |
| B) UTILISATION D'INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTION ET DE LA TRADUCTION  | p.62 |
| C) ACTION SEQUENTIELLE DE LA 6-METHYLPURINE ET DE LA CYCLOHEXIMIDE  | p.67 |
| 1) Action de la 6-méthylpurine  | p.67 |
| 2) Action de la cycloheximide   | p.68 |
| D) REINDUCTION APRES 5 JOURS DE CULTURE   | p.68 |
| E) CONCLUSIONS  | p.70 |
| VI CALCUL DE LA DUREE DE VIE DE L'ENZYME  | p.73 |
| VII ESSAI DE CARACTERISATION DE L'INDUCTION ENZYMATIQUE PAR L'ANALYSE EN ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE | p.75 |

|   |      |
|---|------|
| VIII ESSAIS D'ISOLEMENTS ET DE PURIFICATIONS DE LA NITRATE REDUCTASE                            | p.76 |
| A) PROBLEMES POSES PAR LA PURIFICATION  | p.77 |
| B) PURIFICATION DE L'ENZYME NON STABILISEE  | p.77 |
| 1) Précipitation par le sulfate d'ammonium  | p.77 |
| 2) La filtration sur gel  | p.78 |
| 3) La chromatographie d'affinité  | p.78 |
| 4) Conclusion   | p.79 |
| C) ESSAIS DE STABILISATION DE L'ENZYME  | p.81 |
| 1) Activation de l'enzyme par le ferricyanure de potassium                                      | p.81 |
| 2) Action du polyvinylpyrrolidone (P V P) Lors de l'extraction et sur la stabilité de l'enzyme. | p.81 |
| 3) Effets de l'addition de protéines dans le tampon d'extraction                                | p.83 |
| D) PURIFICATION DE L'ENZYME STABILISEE PAR LA CASEINE   | p.84 |
| 1) Procédé de la purification   | p.84 |
| 2) Modification possible  | p.88 |
| 3) Elimination de la caséine  | p.89 |
| 4) Résultats et discussion  | p.92 |

CONSIDERATIONS GENERALES p.95

BIBLIOGRAPHIE p.99