

N° d'ordre : 1128

50376  
1984  
8

50376  
1984  
8

UNIVERSITE DE LILLE - FACULTE DES SCIENCES

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE 3<sup>ème</sup> CYCLE**

par

Véronique DORCHIES



**ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE DE  
*CICHORIUM INTYBUS* : ETUDE A DIFFERENTS STADES  
DE DEVELOPPEMENT DE LA PLANTE ET DANS LES  
TISSUS CULTIVES *IN VITRO***

Soutenu en Janvier 1984 devant la Commission d'Examen

Président  
Rapporteur  
Examineurs

M. R. BOURIQUET  
M. S. RAMBOUR  
M. B. NOTTON  
M. E. JOLIVET

## REMERCIEMENTS

*Ce travail a été réalisé à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I. Je remercie Monsieur le Professeur BOURIQUET de son accueil, d'avoir permis la réalisation de cette étude et d'être le président du Jury.*

*Je prie Monsieur RAMBOUR de trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude pour m'avoir dirigée dans ce travail. Il a bien voulu assumer la responsabilité de me guider et de me conseiller tout au long de ces trois années. Je suis sensible de l'honneur qu'il me fait en examinant cette thèse en qualité de Rapporteur.*

*Je suis très reconnaissante envers Monsieur NOTTON, Professeur à l'Université de Bristol, qui a bien voulu faire partie de mon Jury. Je lui sais gré des conseils qu'il a bien voulu me prodiguer.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur JOLIVET, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A. de Versailles, d'avoir accepté de juger ce mémoire..*

*Que toutes les personnes du laboratoire qui, de près ou de loin, m'ont aidée au cours de cette étude, soient vivement remerciées pour leur amitié et leur sympathie.*

*Je ne saurais oublier mes parents qui m'ont permis de réaliser un désir cher. Qu'ils soient assurés de mon affection, par la présentation de ce travail.*

# TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	2
I. LA NITRATE REDUCTASE DANS LES FEUILLES	2
A - Structure de l'enzyme	2
1) Le site actif	2
2) Le donneur d'électrons	4
3) Le transfert d'électrons	6
B - Localisation de l'enzyme	9
1) Localisation subcellulaire	9
2) Localisation foliaire	10
II. LA NITRATE REDUCTASE DANS LES RACINES	11
A - Caractéristiques de l'enzyme racinaire	11
B - Localisation de l'enzyme	12
1) Localisation subcellulaire	12
2) Localisation racinaire	13
III. REGULATION DE L'ENZYME DANS LA PLANTE	14
A - La nutrition minérale	14
1) La source azotée	14
2) Le cation accompagnant	17
B - Les acides aminés et les protéines	20
C - Les conditions d'environnement	23
1) La lumière	23
2) La température	25

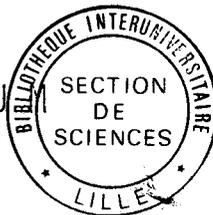
	Page
3) L'eau	26
a) La synthèse protéique	27
b) Les flux de nitrate	27
c) Le métabolisme primaire	28
D - L'état physiologique de la plante	28
1) L'âge	28
2) La synthèse de protéines et d'ARN	29
3) L'équilibre hormonal	31
IV - LA DISTRIBUTION DE L'ENZYME DANS LA PLANTE	33
V - L'EXTRACTION ET LA PURIFICATION DE L'ENZYME	35
A - L'extraction de l'enzyme	35
B - La purification de l'enzyme	36
MATERIEL ET METHODES	
LE MATERIEL	37
1) La plante entière	37
a) <i>Cichorium intybus</i> L. var. <i>Witloof</i>	37
b) Racine en forçage	37
2) La culture <i>in vitro</i>	38
A - Les fragments racinaires	38
a) Le matériel biologique	38
b) Le milieu de culture	38
c) Le conditionnement des cultures	39
B - Les fragments racinaires	39
a) Le matériel biologique	39
b) Le milieu de culture	39
α) Les minéraux	39
β) Les vitamines	40

	Page
c ) Le conditionnement des cultures	40
3) Les germinations	40
LES METHODES DE DOSAGE	
1) Dosages de l'activité de la nitrate réductase	41
a) Dosage <i>in vivo</i>	41
b) Dosage <i>in situ</i>	41
c) Dosage <i>in vitro</i>	42
α) Activité NADH ou NADPH-nitrate réductase	42
β) Activité méthyl-viologène - Nitrate réductase	42
2) Dosage des protéines	43
3) Dosage des nitrates	45
RESULTATS	47
I. L'ENDIVE EN CHAMP	47
1) Activité de la nitrate réductase dans les différents stades des plantes en champ	47
2) Activité de la nitrate réductase et teneur en nitrate dans les plantes de première année de végétation	50
II. L'ENDIVE EN FORCAGE	52
1) Activité de la nitrate réductase et teneur en nitrate au cours du forçage, dans les racines pivotantes	52
2) Activité de la nitrate réductase et teneur en nitrate au cours du forçage dans les racines secondaires	55
3) Activité de la nitrate réductase et teneur en nitrate au cours du forçage dans les bourgeons étiolés	55

	Page
4) Activité de la nitrate réductase d'une plante provenant du forçage et comportant une hampe florale	58
 III. FRAGMENTS RACINAIRES CULTIVES <i>IN VITRO</i>	 58
1) Evolution de l'activité de la nitrate réductase et de la teneur en nitrate pendant les 48 premières heures de culture	58
2) Evolution de l'activité de la nitrate réductase et de la teneur en nitrate pendant 16 jours de culture	60
3) Expérience de réinduction de l'activité de la nitrate réductase après 5 jours de culture	62
4) Comparaisons des expériences faites sur les fragments racinaires	62
 IV . FRAGMENTS DE FEUILLES ETIOLEES CULTIVES <i>IN VITRO</i>	 64
1) La stérilisation	64
2) Activité de la nitrate réductase à différents stades dans les explantats foliaires cultivés <i>in vitro</i>	67
 V. ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE DANS LES GRAINES ET LES PLANTULES D'ENDIVE	 69
 VI. COMPARAISON DE L'ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE DANS DES PLANTULES ET DES JEUNES PLANTS NEOFORMES	 72
 VII. ACTIVITE <i>IN VITRO</i> - PROTOCOLE D'EXTRACTION DE LA NITRATE REDUCTASE ET ESSAIS DE PURIFI- CATION	 74
1) Essais préliminaires	77
2) Modifications des conditions d'extractions	81
3) Les donneurs d'électrons	84

	Page
a) Le NADH	84
b) Le NADPH	84
4) Recherche d'inhibiteurs	90
5) Essais de purification	91
DISCUSSION	
I. MESURE DE L'ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE : ASPECTS METHODOLOGIQUES	92
II. SPECIFICITE DU DONNEUR D'ELECTRONS POUR LA NITRATE REDUCTASE DE <i>CICHORIUM INTYBUS</i>	94
III. ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE AU COURS DES DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT DE <i>CICHORIUM         INTYBUS</i>	95
IV. ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE ET MODIFICATION DES METABOLISMES. PROBLEME DE L'INDUCTION	98
V. LES OSCILLATIONS	101
CONCLUSIONS GENERALES	103
BIBLIOGRAPHIE	105

# ERRATUM



- p. 10 : dernier paragraphe : "l'enzyme est concentrée dans les cellules méristématiques des feuilles jeunes de plants de soja âgés de 17 jours".
- p. 26 : fin du premier paragraphe : "la production des carbohydrates dans les méristèmes racinaires".
- p. 27 : dernier paragraphe : "le passage du pool inactif au pool actif métabolique,..."
- p. 87 : Tableau 10 dans la condition "avec incubation" les chiffres sont intervertis entre la condition "sans NADH" et celle "avec NADH".

## A B R E V I A T I O N S

NAD <sup>+</sup> -NADH	: Formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine dinucléotide.
NADP <sup>+</sup> -NADPH	: Formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
FMN-FMNH <sub>2</sub>	: Formes oxydée et réduite du flavine mononucléotide.
FAD-FADH <sub>2</sub>	: Formes oxydée et réduite du flavine adénine dinucléotide.
MV	: Méthyl viologène.
ATP	: Adénosine triphosphate.
ARN	: Acide ribonucléique.
AIA	: Acide indol-acétique.
ABA	: Acide abscissique.
NR	: Nitrate réductase.
MS	: Matière sèche.
MF	: Matière fraîche.
E.D.T.A.	: Acide éthylène diamino tétraacétique.
P.V.P.	: Polyvinylpyrrolidone.
T.C.A.	: Acide trichloracétique.

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

La régulation de la réduction du nitrate par des modifications de l'activité des enzymes de la chaîne réductrice qui fait passer l'azote inorganique oxydé à l'état d'azote organique réduit est un phénomène extrêmement important dans le contrôle de l'assimilation du nitrate. Comme par ailleurs, le niveau d'activité de la nitrite réductase est généralement plus élevé que celui de la nitrate réductase et que le nitrite ne s'accumule pas dans les tissus, il apparaît que c'est l'étape de transformation du nitrate en nitrite qui constitue le lieu de régulation le plus important.

C'est à la suite de telles observations que BEEVERS et HAGEMAN (1969) concluent que la nitrate réductase est le point logique où s'exerce la régulation de l'entrée de l'azote réduit dans l'organisme végétal.

D'autre part des études portant sur la nutrition minérale des végétaux supérieurs et des plantes à intérêt agricole en particulier ont montré que la réduction du nitrate pouvait selon les espèces s'effectuer soit dans les racines, soit dans les feuilles (BONNER, 1950 ; COÏC et Coll., 1961). C'est dans ce contexte que le travail présent a été abordé. En effet, à notre connaissance la régulation de l'activité de la nitrate réductase n'a jamais été abordée chez l'endive qui possède en outre la capacité de régénérer des plantes entières à partir de racines ou de feuilles cultivées *in vitro* (GAUTHERET, 1959 ; PAULET et NITSCH, 1964 ; VASSEUR, 1965). Dans ces conditions, la nitrate réductase peut constituer un marqueur intéressant dans l'étude de l'organogenèse et peut contribuer à notre compréhension des modifications biochimiques qui accompagnent la différenciation. C'est dans cette perspective que ce travail a été réalisé. Nous avons donc étudié la distribution de l'activité de la nitrate réductase dans les différents organes de l'endive (racines, feuilles) puis nous avons suivi l'évolution de cette activité dans divers tissus cultivés *in vitro*.

# HISTORIQUE

La nitrate réductase catalyse chez les plantes supérieures, la réduction du nitrate en nitrite avec les pyridines nucléotides. Les tissus verts présentent d'une façon générale une activité nitrate réductase plus élevée que les tissus non chlorophylliens et constituent très souvent un matériel de choix pour l'étude de la nitrate réductase. Cependant l'activité de réduction du nitrate a également été mise en évidence dans les racines de nombreuses espèces (BEEVERS et HAGEMAN, 1969) mais son importance est très variable d'une espèce à l'autre.

## I - LA NITRATE REDUCTASE DANS LES FEUILLES

La majorité des études sur la réduction du nitrate dans les plantes supérieures a été faite avec les tissus foliaires à cause de l'abondance des enzymes et de la facilité de disposer du matériel.

### A - Structure de l'enzyme.

La nitrate réductase est généralement définie comme une molybdoflavoprotéine capable d'accepter les électrons fournis directement par le NAD(P)H ou FMNH<sub>2</sub>.

#### 1) Le site actif.

Le groupe prosthétique de l'enzyme est le FAD et non pas le FMN puisque l'activité enzymatique qui est diminuée de 50 % par 2 précipitations au sulfate d'ammonium, est complètement restaurée par le FAD alors que l'addition de FMN ne cause qu'une très faible activation (EVANS et NASON, 1953). Mais le benzyl et le méthyl viologène peuvent aussi fournir des électrons au système enzymatique (PANEQUE et Coll., 1965).

La forte inhibition de l'activité enzymatique par le parachloromercuribenzoate, sa réversibilité par la cystéine et la sensibilité de l'enzyme aux ions cuivriques suggèrent qu'un groupement sulfhydryl existe dans le site actif (EVANS et NASON, 1953).

De plus, l'activité et la spécificité nucléotidique accrues de la nitrate réductase, associées à une augmentation du nombre des groupements thiols, de la protéine (BEEVERS et Coll., 1964) permettent d'impliquer des groupes sulfhydryls dans le système enzymatique (EAGLESHAM et HEWITT, 1971).

Etant donné que le cyanure de potassium, l'azide de sodium ainsi que la thiocarbamide inhibent l'activité de la nitrate réductase et que la carence en  $\text{Mo}^{++}$  et en  $\text{Mn}^{++}$  produit l'accumulation du nitrate, EVANS et NASON (1953) estiment que la présence d'un métal est nécessaire pour réduire l'azote nitrique. En 1955, NICHOLAS et NASON identifient le molybdène comme étant le métal de l'enzyme. CANDELA et Coll. (1957) montrent que dans les feuilles matures de chou fleur, où l'activité est maximale, les plantes poussées sans molybdène, possèdent des activités de la nitrate réductase beaucoup plus basses que les plantes poussées en présence de ce métal. Des infiltrations de molybdène dans les plantes déficientes entraînent des augmentations d'activité enzymatique dans les 18 à 24 heures suivantes. NOTTON et HEWITT (1971) fournissent à des plants d'épinard poussés en l'absence de  $\text{Mo}^{++}$  et qui ne présentent pas d'activité enzymatique, du molybdène radioactif. Ils observent que les protéines marquées, séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide correspondent à la nitrate réductase. Ils suggèrent que l'enzyme est une protéine molybdène dépendante. En 1978, AGARWALA et Coll. trouvent que les feuilles de plants de maïs carencés en  $\text{Mo}^{++}$  montrent une activité de la nitrate réductase plus faible que les plants normaux. L'apport de molybdène aux plantes carencées est suivi d'une activité enzymatique fortement accrue en moins de 72 h. De plus, le tungstène est bien connu comme inhibiteur de la nitrate réductase (HEIMER et Coll., 1969 ; WRAY et FILNER, 1970 ; RAO et RAINS, 1976 b). Il est généralement supposé inhiber la biosynthèse de la nitrate réductase en empêchant l'incorporation du molybdène dans la structure de l'enzyme (WRAY et FILNER, 1970 ; NOTTON et Coll., 1974) ou en effectuant des changements structuraux de l'ensemble enzymatique (HEIMER et Coll., 1969 ; RAO et RAINS, 1976 b). Un effet similaire est produit par les sels de vanadium (BUCZEK et Coll., 1980). ASLAM (1982) montre que le tungstène, qui inhibe complètement l'activité de la nitrate réductase induite par le nitrate,

a peu d'effets sur l'activité enzymatique existante dans les feuilles de soja. Alors qu'il est actuellement admis que la nitrate réductase est une molybdoprotéine, la façon dont le molybdène est lié au complexe enzymatique reste inconnue. Il semblerait que la liaison se fasse par l'intermédiaire d'une protéine.

La présence d'une fonction "hème" dans le site actif de la nitrate réductase a été récemment identifiée par l'étude spectrale de l'enzyme purifiée de l'épinard (NOTTON et Coll., 1977 ; FIDO et Coll., 1979) et de l'orge (SOMERS et Coll., 1982). Ces études spectrales indiquent donc la présence d'un cytochrome de type b, associé à la fois à l'enzyme active et à la forme inactivée par le tungstène ( NOTTON et Coll., 1979).

## 2) Le donneur d'électrons.

La nitrate réductase des feuilles de nombreuses espèces végétales a une spécificité pour le NADH comme donneur d'électrons (BEEVERS et Coll., 1964 ; SANDERSON et COCKING, 1964 ; MARETZKI et DE LA CRUZ, 1967 ; KLEPPER et HAGEMAN, 1969) bien que EVANS et NASON (1953) dans des extraits de feuilles de soja trouvent que la nitrate réductase a une préférence pour le NADPH. Mais l'enzyme de ces tissus et de ceux du blé, extraite en présence de cystéine, a une activité deux fois plus grande avec le NADH que le NADPH (BEEVERS et Coll., 1964). De même, RELIMPIO et Coll. (1971) observent une nette stimulation de la réduction du nitrate par le NADH d'un extrait enzymatique foliaire d'épinard, fait en présence de FAD. Ces mêmes auteurs montrent que seuls le FAD et le NADH empêchent l'inhibition de l'activité NADH : nitrate réductase de l'épinard par le parachloromercuribenzoate. -

KLEPPER et HAGEMAN (1969) ne trouvent pas d'activité enzymatique dans les feuilles de pommier lorsque le NADPH est le donneur d'électrons, par contre, ils n'observent aucune différence en présence de NADH ou de FMNH<sub>2</sub>.

En 1966, PANEQUE et LOSADA signalent que chez l'épinard la réduction du nitrate avec NADH comme donneur d'électrons requiert seulement la nitrate réductase. Au contraire, quand

le donneur d'électrons est le NADPH, le système a besoin, en outre d'une nitrate réductase, de la présence d'une FMN- et d'une NADP-réductase.

KLEPPER et Coll. (1971) montrent que l'addition du NADH seul à des extraits de blé et d'*Amaranthus hybridus* L. donne des maxima de réduction du nitrate et que le NADPH n'est pas un donneur effectif d'électrons pour la nitrate réductase. Pour eux ainsi que pour WELLS et HAGEMAN (1974), l'activité NADPH est probablement un artefact résultant d'une activité phosphotassique qui transforme le NADPH en NADH. Mais, JOLLY et Coll. (1976) séparent, par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, l'activité de la nitrate réductase des extraits foliaires de soja en une activité NADH : nitrate réductase et une NADPH : nitrate réductase.

Pour ces auteurs, l'activité de la NADPH : nitrate réductase est détectée dans les extraits préparés sans cystéine, alors que l'enzyme NADH n'est pas trouvée dans ces conditions. De plus quand le NADPH est utilisé comme donneur d'électrons pour la NADPH : nitrate réductase, le FAD est nécessaire pour obtenir une activité maximale, mais il n'augmente pas l'activité de la NADH : nitrate réductase. Et pour JOLLY et Coll. (1976) la NADPH : nitrate réductase a une activité de 50 % de celle de la NADH : nitrate réductase.

En 1979, SUBBALAKSHMI et Coll. arrivent à la conclusion que seuls la génération de NADH par le cycle tricarboxylique et son maintien à l'état réduit pourraient être les facteurs qui régulent l'activité enzymatique dans les feuilles de riz et de blé. Cette hypothèse rejoint les travaux de SAWHNEY et Coll. (1978) qui ont montré que, dans les feuilles de blé, la réduction du nitrate n'a lieu que lorsque l'oxydation du NADH, par la chaîne mitochondriale de transfert des électrons, est inhibée.

Récemment, ORIHUEL-IRANZO et CAMPBELL (1980) concluent que la NADH : nitrate réductase est plus active dans les

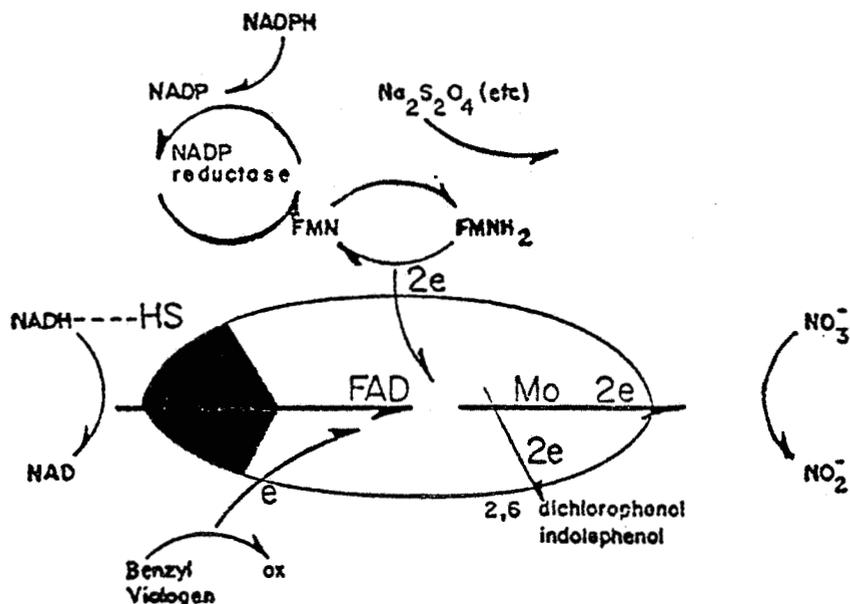
jeunes cotylédons de soja et que lorsque les cotylédons vieillissent, la NAD(P)H : nitrate réductase devient plus active.

Cependant, en plus de la réaction physiologique normale de réduction du nitrate par les nucléotides pyridiniques, la nitrate réductase présente deux autres activités partielles qui peuvent être mises en évidence séparément et inhibées sélectivement et qui ne mettent en jeu qu'une partie du complexe enzymatique. L'une d'elles est une activité diaphorase qui correspond à la première moitié du complexe, elle provoque la réduction par le NAD(P)H d'une multitude d'accepteurs d'1 ou 2 électrons (dichloro-indophénol, sels de tétrazolium, cytochrome-c...). L'autre activité concerne ce qu'il est convenu d'appeler la moitié terminale du complexe enzymatique ; elle est indépendante du NADPH et provoque la réduction du nitrate par les flavines ou les viologènes réduits (HAGEMAN et Coll., 1962 ; PANEQUE et Coll., 1965 ; SCHRADER et Coll., 1968 ; OJI et IZAWA, 1969 b).

### 3) Le transfert d'électrons.

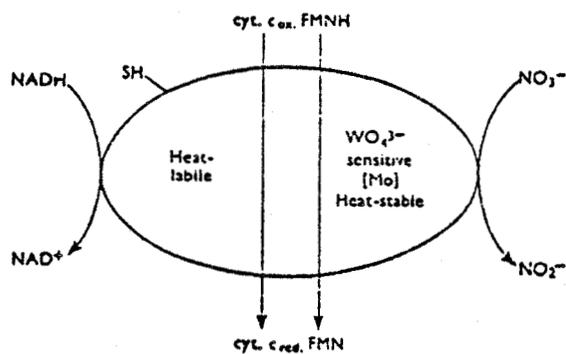
Il apparaît donc que la nitrate réductase est souple dans l'utilisation du donneur d'électrons si bien que l'on a distingué 3 sous-classes de nitrate réductase dont la fourniture d'électrons se fait par des nucléotides pyridiniques. E.C. 1.6.6.1. est spécifique pour NADH et correspond au type d'enzyme présente dans toutes les feuilles des plantes supérieures mais on la trouve aussi dans quelques algues vertes telle que la chlorelle. Chez les autres algues vertes ainsi que chez les levures on trouve une nitrate réductase qui peut utiliser le NADH et le NADPH avec la même efficacité, c'est la nitrate réductase E.C. 1.6.6.2. Enfin il existe chez *Aspergillus nidulans* ainsi que chez *Neurospora crassa* une nitrate réductase spécifique pour le NADPH, elle a été classée E.C. 1.6.6.3. (GUERRERO et Coll., 1981).

Toutes ces observations permettent de donner un schéma du transfert d'électrons. Ainsi en 1968, SCHRADER et Coll. donnent une représentation schématique de la réduction du nitrate par une enzyme, probablement composée de sous-unités qui peut utiliser à la fois le NADH ou les flavines ou le benzyl viologène comme donneur d'électrons.



Représentation schématique de la réduction du nitrate 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.

En 1970, WRAY et FILNER proposent que les activités NADH-nitrate réductase, FMNH<sub>2</sub>- nitrate réductase et NADH- cytochrome -c réductase proviennent d'un même complexe enzymatique permettant la réduction du nitrate avec le NADH comme donneur d'électrons.

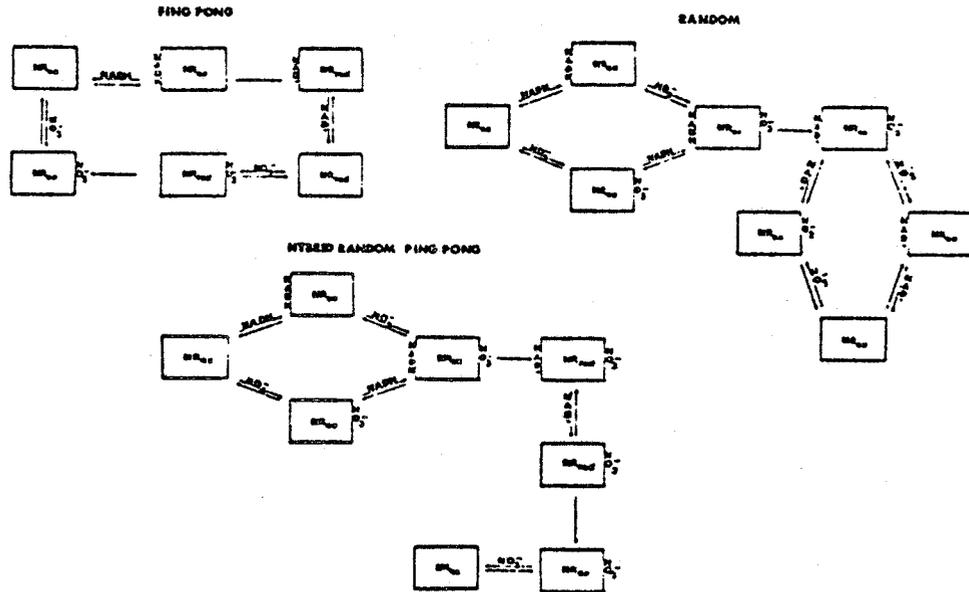


BU  
LILLE

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 du nitrate avec NADH comme donneur d'électrons.

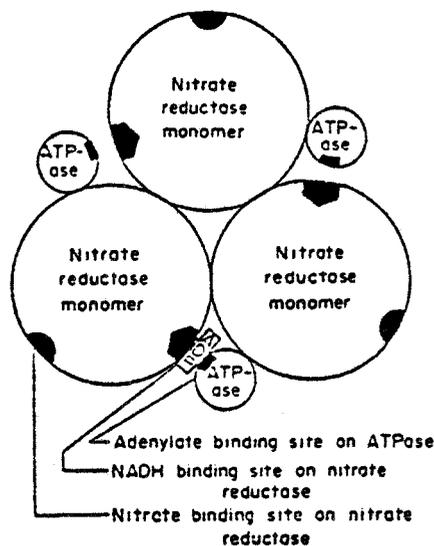
Pour CAMPBELL et SMARRELLI (1978) la réduction du nitrate se ferait par un mécanisme "ping-pong" où le transfert des électrons à partir du site NADH via le site nitrate s'effectuerait par l'intermédiaire de la nitrate réductase réduite. Cette cinétique

"ping-pong" de la NADH- nitrate réductase est supposée protéger l'enzyme contre l'inactivation par le NADH ou le ferrocyclochrome-c en présence de nitrate, chez les feuilles d'épinard (MALDONADO et Coll., 1978).



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

Mais selon BUTZ et JACKSON (1977), le transport et la réduction du nitrate seraient accomplis par le complexe enzymatique tétramère-ATPasique de la nitrate réductase où les molécules d'ATPase sont situées à proximité du site de liaison du NADH de l'enzyme de réduction.



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.

Cependant ce schéma de BUTZ et JACKSON a été sévèrement critiqué. En effet il n'y a pas toujours une corrélation étroite entre l'absorption et la réduction du nitrate ; d'autre part une absorption de nitrate a pu être mise en évidence dans des cellules qui ne contiennent pas de nitrate réductase fonctionnelle (HEIMER et FILNER, 1970 et 1971 ; SCHLOEMER et GARRETT, 1973 ; DODDEMA et Coll., 1978).

Si tout le monde s'accorde pour attribuer une structure multimérique à la nitrate réductase, les opinions divergent lorsqu'il s'agit de dénombrer les sous-unités.

Alors que la nitrate réductase de l'orge semble se constituer de deux sous-unités de 100 000 daltons chacune (KUO et Coll., 1980), celle de la chlorelle en posséderait 3 de 100 000 chacune ( SOLOMONSON, 1979). Enfin chez la courge et l'épinard, l'enzyme comprendrait deux sous-unités différentes représentées chacune en deux exemplaires et dont les masses moléculaires seraient de 75 000 et 45 000 chez la courge (REDINBAUGH et Coll., 1982) et de 120 000 et 85 000 chez l'épinard ou en plus existerait un cofacteur à molybdène de 45 000 daltons (NOTTON et HEWITT, 1979).

## B - Localisation de l'enzyme.

### 1) Localisation subcellulaire.

Comme le métabolisme du nitrate dans les tissus chlorophylliens est intimement lié à la photosynthèse, les enzymes impliquées semblent devoir être directement associées aux organites responsables de la photosynthèse.

EVANS et NASON (1953) démontrent que les grana de chloroplastes illuminés peuvent fournir les électrons nécessaires à

la réduction du nitrate. Ces électrons sont incapables par eux-mêmes de réduire le nitrate en absence d'une nitrate réductase purifiée. Plus tard, l'utilisation des méthodes d'extractions à base de solvants aqueux et non aqueux permet de conclure que la nitrate réductase est une enzyme exo-chloroplastique ; mais l'association de l'enzyme à la membrane externe du chloroplaste est possible et sa destruction lors des isolements n'est pas exclue (RITENOUR et Coll., 1967). Par contre, COUPE et coll. (1967) qui mettent également en oeuvre une extraction dans laquelle sont utilisés des solvants non aqueux, séparent la nitrate réductase de l'orge par centrifugation en gradient de densité et concluent que l'enzyme est chloroplastique. Cependant il n'est pas exclu qu'elle puisse être adsorbée par les chloroplastes (STOCKING, 1959). Mais LIPS (1975) suggère que la nitrate réductase est localisée à l'extérieur de la membrane des microbodies (cf. GENEVES, 1972) ou constitue une partie détachable de la membrane elle-même.

Au contraire la localisation cytoplasmique de l'enzyme est étayée par de nombreuses observations. Ainsi SCHRADER et Coll. (1967) montrent que le chloramphénicol inhibe la synthèse de la nitrite réductase mais non celle de la nitrate réductase (JACKSON et Coll., 1973 ; SASAKAWA et YAMAMOTO, 1977 a). Or on sait depuis les travaux d'ANDERSON et SMILLIE (1966) que le chloramphénicol s'attache aux ribosomes chloroplastiques et ainsi inhibe la synthèse protéique à cet endroit, mais celui-ci est sans effet sur les ribosomes cytoplasmiques. Donc une localisation cytoplasmique de l'enzyme est plus vraisemblable.

Cependant BUTZ et JACKSON (1977), en proposant une structure du complexe enzymatique, le situent vers la face interne du plasmalemme. Toutefois, plus récemment WALLSGROVE et Coll. (1979) ne mettent pas en évidence l'association de la nitrate réductase soit avec un organe cellulaire soit avec une fraction membranaire, dans des protoplastes de feuilles de pois.

## 2) Localisation foliaire.

Selon les travaux d'EVANS et NASON (1953), l'enzyme est concentrée dans les feuilles jeunes et méristématiques de plants de soja âgés de 17 jours. Les premières feuilles d'un plant de

17 jours contiennent peu d'enzyme, alors que les mêmes feuilles d'un plant de 8 jours en contiennent beaucoup. Ceci suggère donc que l'enzyme est concentrée dans les tissus jeunes et métaboliquement actifs. Des résultats identiques furent trouvés par BLAHOVA et SEGETA (1980) chez le concombre, EVANS (1982) chez le pois chiche et GAUDINOVA (1982) chez le pois. Pour tous ces chercheurs, les jeunes feuilles pleinement déployées ont le maximum d'activité enzymatique et l'activité de la nitrate réductase diminue avec l'âge et le processus de sénescence des feuilles. WALLACE (1973 b) et CHATTERJEE et Coll. (1980) montrent que le limbe de la dernière feuille apparue a une plus grande activité enzymatique *in vivo* que le limbe des deux autres feuilles des plantules d'orge. En 1978, NEYRA et HAGEMAN ont localisé la nitrate réductase dans les cellules du mésophylle des feuilles de maïs.

## II - LA NITRATE REDUCTASE DANS LES RACINES.

Une grande partie de l'azote transporté dans la sève, à la fois, des mono- et des dicotylédones est sous forme organique, ce qui signifie que la plus grande partie de l'azote entrant est incorporée dans les composés organiques au niveau des racines (WALLACE et PATE, 1965). MIFLIN (1967) montre que l'activité de la nitrate réductase dans les extraits racinaires est équivalente à celle d'extraits foliaires. La même année, COUPE et Coll. extraient une nitrate réductase des racines d'orge et montrent que les racines sont plus efficaces que les feuilles dans la réduction du nitrate.

### A - Caractéristiques de l'enzyme racinaire.

Les premiers travaux sur la nitrate réductase racinaire sont ceux d'EVANS et NASON (1953). Ces auteurs ont trouvé une activité NADPH-nitrate réductase dans les racines de plusieurs espèces.

Quelques années après, VAIDYANATHAN et STREET (1959) observent que les extraits racinaires de tomate ne peuvent effectuer la réduction du nitrate qu'en présence de NADH et FMN. SANDERSON

et COCKING (1964) pensent que les propriétés de la nitrate réductase racinaire sont similaires à celles de l'enzyme foliaire, chez la tomate, l'orge, le blé et la pomme de terre. Ils montrent que le NADH est le donneur d'électrons ; que la cystéine protège l'enzyme extraite, et ils suggèrent l'existence d'un groupement sulfhydryl sur le site actif de la nitrate réductase. Mais pour eux, le FAD n'est pas le groupement prosthétique.

Plus récemment, REDINBAUGH et CAMPBELL (1981) purifient deux nitrate réductases des racines de maïs :

- une nitrate réductase éluée par le NADPH qui est bispécifique puisqu'elle peut utiliser soit le NADPH soit le NADH comme donneur d'électrons. Elle est identique à la NAD(P)H : nitrate réductase des feuilles de soja (JOLLY et Coll., 1976) ou des plantules de riz (SHEN et Coll., 1976) ; et son activité est stimulée par le FAD.

- une nitrate réductase éluée par le NADH qui est monospécifique pour le NADH ; dont l'activité est augmentée en présence de FAD, qui, de plus, apparaît plus stable que la précédente.

Ces mêmes auteurs en concluent que la NAD(P)H : nitrate réductase (E.C. 1.6.6.2) est limitée aux tissus non chlorophylliens (racines et scutellum) tandis que la NADH : nitrate réductase est présente dans tous les tissus.

Pour certains (SANDERSON et COCKING, 1964 ; MIFLIN, 1970 a) la nitrate réductase utiliserait le succinate comme donneur d'électrons plutôt que le NADH. Mais il a été montré qu'il s'agissait d'un phénomène dû à une contamination bactérienne.

## B - La localisation de l'enzyme.

### 1) Localisation subcellulaire.

La première localisation subcellulaire de la nitrate réductase dans les racines est due à MIFLIN (1968). Il observe que

l'enzyme réductrice du nitrate co-sédimente à des valeurs plus basses de  $g$  que la glutamine déhydrogénase et la fumarase et donc elle réside dans une particule séparée de la mitochondrie. Deux ans plus tard, MIFLIN (1970 b) montre que l'enzyme réductrice du nitrate est contenue dans une particule différente de la mitochondrie. Cette fraction contenant la nitrate réductase est riche en vésicules membranaires qui existent *in situ* ou qui résulteraient de membranes cellulaires telle que le réticulum endoplasmique enroulé en sphère après rupture de la cellule. Mais en 1976, BLEVINS et Coll. ont montré que cette observation est probablement le résultat d'une contamination bactérienne.

Entre temps MARETZKI et DE LA CRUZ (1967), supposent que la nitrate réductase trouvée dans les racines de canne à sucre est identique à celle qui existe dans les tissus chlorophylliens. Ils concluent que sa présence dans les racines confirme qu'elle n'est pas associée aux chloroplastes, démontré aussi par RITENOUR et Coll. (1967).

## 2) Localisation racinaire.

Tous les travaux sur la nitrate réductase racinaire s'entendent pour dire que l'enzyme est située dans la partie apicale de la racine.

Ainsi WALLACE (1973 b) observe que l'enzyme réductrice du nitrate présente dans les racines primaires de maïs est essentiellement dans la région de l'apex comprise dans les 2 premiers mm. Puis GASPARIKOVA et Coll. (1978) et OAKS et STULEN (1980) chez le maïs confirment cette observation.

De plus OAKS et Coll. (1972) et ASLAM et OAKS (1976) montrent que l'induction de la nitrate réductase dans les racines de maïs est plus efficace et plus rapide dans les pointes racinaires que dans les parties racinaires matures.

### III - LA REGULATION DE L'ENZYME DANS LA PLANTE.

La nitrate réductase constitue le point privilégié d'une régulation du métabolisme azoté puisque c'est la première enzyme de la chaîne d'incorporation de l'azote réduit dans la plante ; en effet les effets toxiques d'un excès en nitrite ou en ammonium dans une plante impliquent une régulation de leur production. C'est ainsi que la réduction du nitrate et son assimilation par l'intermédiaire de l'ammonium, chez les plantes supérieures, dépendent de plusieurs facteurs : la lumière (CANDELA et Coll., 1957 ; HAGEMAN et FLESHER, 1960), les éléments minéraux (HEWITT et AFRIDI, 1959) et la source d'azote, mais aussi la sécheresse, l'équilibre hormonal, l'âge de la plante et son patrimoine génétique. Tous ces facteurs influent sur la capacité de réduction du nitrate. Le trait caractéristique du métabolisme du nitrate est donc sa sensibilité aux conditions d'environnement.

#### A - La nutrition minérale.

##### 1) La source azotée.

Il est maintenant bien admis que la nitrate réductase est inductible par le nitrate, son substrat (CANDELA et Coll., 1957 ; HEWITT et AFRIDI, 1959 ; HAGEMAN et FLESHER, 1960 ; AFRIDI et HEWITT, 1964 ; BEEVERS et Coll., 1965 ; SHEN, 1969 ; AMINDARI et Coll., 1978 ; LEWIS et Coll., 1982 b).

Selon les espèces, différents taux de nitrate sont requis pour une induction maximale et dans certains cas de très fortes concentrations en nitrate sont nécessaires. De plus, si l'utilisation du nitrate et sa réduction varient selon l'espèce étudiée, l'activité de la nitrate réductase au sein d'une même espèce est différente selon le tissu considéré et selon sa teneur en nitrate.

SASAKAWA et YAMAMOTO (1977 b) trouvent qu'il faut la présence du nitrate pour observer un maximum d'activité enzymatique,

puisque'une déficience en cet anion provoque une baisse et de l'induction de la nitrate réductase et de son activité. RADIN, en 1978 étudie l'activité de la nitrate réductase en fonction de la teneur en nitrate endogène et des concentrations en nitrate apportées à des plants de pois et de coton. Il remarque que chez le pois, le substrat n'est absolument pas limitant dans les racines mais qu'il est rigoureusement limitant dans les feuilles. Par contre, chez le coton, le substrat a peu d'effet. Il en conclut que la capacité des racines de pois à transporter le nitrate dans le xylème est faible comparée à celle des racines de coton. La racine de pois présente une très grande capacité naturelle de synthèse de la nitrate réductase, du fait de l'absorption de nombreux ions nitrate avant leur passage dans le xylème.

OAKS et STULEN (1980) observent que des additions de nitrate au milieu sont nécessaires pour que la nitrate réductase du maïs soit active. De plus, ils remarquent que si le nitrate augmente l'activité enzymatique, cette augmentation est plus grande lorsque l'ammonium est présent en même temps que l'ion nitrique. L'activité de la nitrate réductase est aussi stimulée lorsque le glucose est associé au nitrate (ASLAM et OAKS, 1975). De même, RUFTY et Coll. (1981) remarquent que chez les plantules de maïs, plus la proportion de nitrate transloqué est grande, plus la proportion de nitrate réduit diminue ; donc moins il y a de substrat, moins il y a de réduction. De plus ils suggèrent que la diminution de l'activité réductrice est associée à la disponibilité du substrat au voisinage des sites catalytiques de la nitrate réductase. Dans les racines excisées de maïs, NEYRA et HAGEMAN (1975) montrent que l'induction de l'enzyme se produit simultanément à l'absorption de cet ion par la racine et qu'elle augmente parallèlement à la vitesse de son absorption.

D'après DAVIDIAN et SALSAC (1979), la quantité de nitrate réduit représente toujours une faible fraction de la quantité absorbée. Donc le flux de nitrate à travers le cytoplasme provoque

l'induction et le maintien d'une certaine activité de la nitrate réductase. Ce résultat confirme ceux obtenus auparavant par HEIMER et FILNER (1971) et SHANER et BOYER (1976 a) selon lesquels l'induction et le maintien de l'activité de la nitrate réductase dépendent du flux de nitrate. De telles observations ont été expliquées en postulant l'existence d'un pool métabolique, petit, cytoplasmique, de nitrate accessible à la nitrate réductase (FERRARI et Coll., 1973) et aussi présumé responsable de l'induction de l'enzyme (HEIMER et FILNER, 1971), et un pool de stockage, grand, vacuolaire, séparé du site de réduction (OAKS et BIDWELL, 1970 ; HEIMER et FILNER, 1971 ; FERRARI et Coll., 1973 ; ASHLEY et Coll., 1975 ; EZETA et JACKSON, 1975 ; ASLAM et Coll., 1976 ; SHANER et BOYER, 1976 a ; ADAMOWICZ, 1980). L'absorption de nitrate par des protoplastes d'orge a confirmé que la plus grande partie des ions absorbés se retrouve dans la vacuole (MARTINOIA et Coll., 1981). Des essais répétés pour mesurer ces pools par une méthode indirecte ont donné des résultats équivoques (HAGEMAN et Coll., 1980). Plus récemment, ROBIN et Coll. (1983 a) évaluent la fraction métabolisable du nitrate par une mesure *in situ* de l'activité de réduction. Comme la vacuole occupe 90 % du volume de la cellule, la fraction cytoplasmique, donc métabolisable, du nitrate doit représenter 0,1 % du contenu cellulaire total. Si le nitrate cytoplasmique n'est pas saturant, le contrôle de son entrée par le plasmalemme et le tonoplaste constitueront un moyen de régulation de l'assimilation de l'azote.

CLEMENT et Coll., (1978) montrent que la capacité d'utilisation du nitrate par les plantules s'adapte aux conditions de croissance de la plante (DEANE-DRUMMOND, 1982). Plus tard, STEER (1982) remarque, chez le maïs et chez *Capsicum annuum*, que plus on fournit de nitrate plus on augmente l'activité de la nitrate réductase. Cependant, chez *Capsicum*, la réduction nécessite la lumière.

En résumé, même si le nitrate a une grande action dans la régulation de la synthèse et de l'activité de la nitrate

réductase, les conditions d'environnement, les besoins de la plante et les taux des divers métabolismes de la plante entière interviennent.

## 2) Le cation accompagnant.

La nature du cation accompagnant le nitrate est également très importante. Il faut tout d'abord qu'il favorise l'entrée de l'anion dans la cellule. RAO et RAINS (1976 a) observent que l'absorption nitrique croît avec l'augmentation de la concentration en calcium, dans le milieu. OJI et IZAWA (1969 a) comparent les effets des cations monovalents sur l'apparition de la nitrate réductase dans les plants de riz. Ils montrent que seul le potassium stimule la synthèse de l'enzyme (résultat confirmé par PFLÜGER et WIEDEMANN, 1977) et que l'ammonium l'inhibe faiblement. En 1977 (b), SASAKAWA et YAMAMOTO remarquent que l'induction enzymatique est diminuée par des déficits en K, B, Zn, Cu et Mo et est augmentée lors de carence en Mn. De plus la teneur en Fe intervient également puisque la constitution de l'enzyme dépend de celle-ci. DAVIDIAN et SALSAC (1979) montrent que l'induction de la nitrate réductase est plus importante dans une solution de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  que dans une solution de  $\text{KNO}_3$ . Alors que pour les plantules d'orge, le  $\text{KNO}_3$  augmente l'activité enzymatique des feuilles mais moins celle des racines (BLEVINS et Coll., 1978 a et b).

De tous les travaux se rapportant à l'effet des cations, il résulte que le calcium est le plus efficace pour augmenter ou induire l'activité de la nitrate réductase (PAULSEN et HARPER, 1968). Chez le raygrass, l'efflux de  $^{14}\text{NO}_3^-$ , existant lorsque les plantes sont transférées dans une solution fortement enrichie en  $^{15}\text{NO}_3^-$ , augmente lorsque le  $\text{Mg}^{2+}$  est présent dans le milieu à la place du  $\text{Ca}^{2+}$  (MORGAN et Coll., 1973). Ainsi, le fait que cet efflux soit limité en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  par rapport au  $\text{Mg}^{2+}$ , suggère que la perméabilité membranaire diminue en présence de calcium (RAINS et Coll., 1964). Une année auparavant, ces mêmes auteurs (MORGAN et Coll., 1972) ont remarqué que les taux les plus bas d'assimilation et de translocation du nitrate sont trouvés

dans les racines soumises au  $Mg (^{15}NO_3)_2$ . Il semble donc que la présence de  $Mg^{2+}$  dans les tissus racinaires provoque une accumulation de  $NO_3^-$  (MORGAN et Coll., 1972). Pour DAVIDIAN et SALSAC (1979), en présence de calcium, les efflux de nitrate vers le milieu extérieur et vers la vacuole diminuent plus fortement que l'entrée de nitrate par le plasmalemme ; ce qui aboutit à une augmentation de la fraction métabolisable, responsable de l'induction enzymatique. MATSUMOTO et Coll. (1980) observent que l'activité de la nitrate réductase, mesurée *in vivo* et *in vitro*, diminue dramatiquement lorsque le calcium est retiré du milieu de culture ; la perte de cette activité coïncide avec une baisse en nitrate dans les feuilles du concombre. Ceci indique que la baisse d'activité enzymatique, causée par l'absence de calcium dans le milieu, est due principalement à une déficience en nitrate comme inducteur de l'enzyme, dans les feuilles. Récemment TOURAINÉ et GRIGNON (1982) mesurent le flux volumique des exsudats et les concentrations ioniques dans la sève en utilisant des racines excisées de maïs. Ils remarquent que les racines secrètent le nitrate plus rapidement à partir de  $KNO_3$  que du  $NaNO_3$ . L'effet stimulant du potassium serait spécifique de la sécrétion et non de l'accumulation et de l'absorption du nitrate.

Mis à part les effets du calcium, ceux de l'ammonium sont aussi étudiés par de nombreux chercheurs, qu'il soit seul dans le milieu ou qu'il accompagne le nitrate. Les premiers travaux portant sur l'effet de l'ammonium sont ceux d'AFRIDI et HEWITT (1964) qui trouvent que l'enzyme de la réduction du nitrate ne peut être décelée dans les tissus foliaires de chou-fleur cultivés aseptiquement en présence de sulfate d'ammonium ou d'acide glutamique mais en absence de nitrate. En 1969, SHEN parle d'un phénomène de rétroinhibition de l'ammonium puisque ce dernier empêche la première étape de la réduction du nitrate ( $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$ ) mais n'inhibe pas l'assimilation du nitrite par les plantules de riz. SMITH et THOMPSON (1971) observent que l'induction enzymatique par le nitrate est partiellement empêchée par la présence d'ammonium dans le

milieu d'incubation. Mais ce dernier n'inhibe pas l'utilisation du nitrate par les racines excisées d'orge. Toutefois, ils concluent que l'ammonium ou un produit du métabolisme de cet ion a un effet direct sur la synthèse de la nitrate réductase dans les racines excisées d'orge (VIJAYARAGHAVAN et Coll., 1979 ; MACKOWN et Coll., 1982). Les mêmes résultats sont trouvés chez le coton par RADIN (1973) ; en utilisant l'arsénate, il suppose que le taux de glycolyse et la production conséquente de NADH sont des facteurs limitants en aérobiose ou en présence d'ammonium. Le même auteur, en 1975, estime que l'effet dépressif de l'ammonium sur l'activité de la nitrate réductase est dû à l'existence de fortes concentrations en nitrate ; cette proposition est compatible avec l'hypothèse que l'absorption du nitrate régule l'activité de la nitrate réductase. Par contre, OAKS et Coll. (1977) et SIHAG et Coll. (1978) et VIJAYARAGHAVAN et Coll. (1979) remarquent que l'ammonium n'inhibe pas l'induction de l'enzyme dans les racines de maïs, dans les plantules de riz et dans les feuilles de blé, mais qu'il augmente l'activité de la nitrate réductase lorsqu'il est employé seul ou en présence de glucose. Pour TOMPKINS et Coll. (1978), la présence du nitrate, plutôt qu'un produit de sa réduction (ammonium ou nitrite) est requise pour initier l'utilisation du nitrate. Dans la plante entière de coton, OAKS et Coll. (1979) observent que l'ammonium inhibe l'induction enzymatique dans les bourgeons mais la stimule dans les racines. En 1980, OAKS et STULEN trouvent que l'ammonium, présent en même temps que le nitrate dans le milieu, augmente l'activité de la nitrate réductase chez le maïs (DATTA et Coll., 1981). Plus près de nous, LEWIS et Coll., (1982) rapportent que la présence de l'ammonium dans les éléments minéraux diminue à la fois l'export de nitrate vers le xylème et son accumulation dans les racines et les feuilles. La même année, RUFTY et Coll. remarquent que l'importance de l'inhibition due au  $\text{NH}_4^+$  sur l'utilisation du nitrate est considérablement modérée par la présence de potassium. En 1983, MENGEL et Coll. observent que la plus faible activité enzymatique se trouve dans les racines de maïs traitées par l'ammonium (SAHULKA, 1977). Par contre, TIMPO et NEYRA (1983) indiquent que, dans les feuilles de haricot, le

potentiel de réduction du nitrate, n'est pas diminué par une croissance des plantes en présence d'ammonium ou d'urée. Il en résulte donc que l'effet de l'ammonium sur l'enzyme est très différent selon la plante utilisée et les conditions expérimentales et que ce problème reste obscur chez les plantes supérieures.

#### B - Les acides aminés et les protéines.

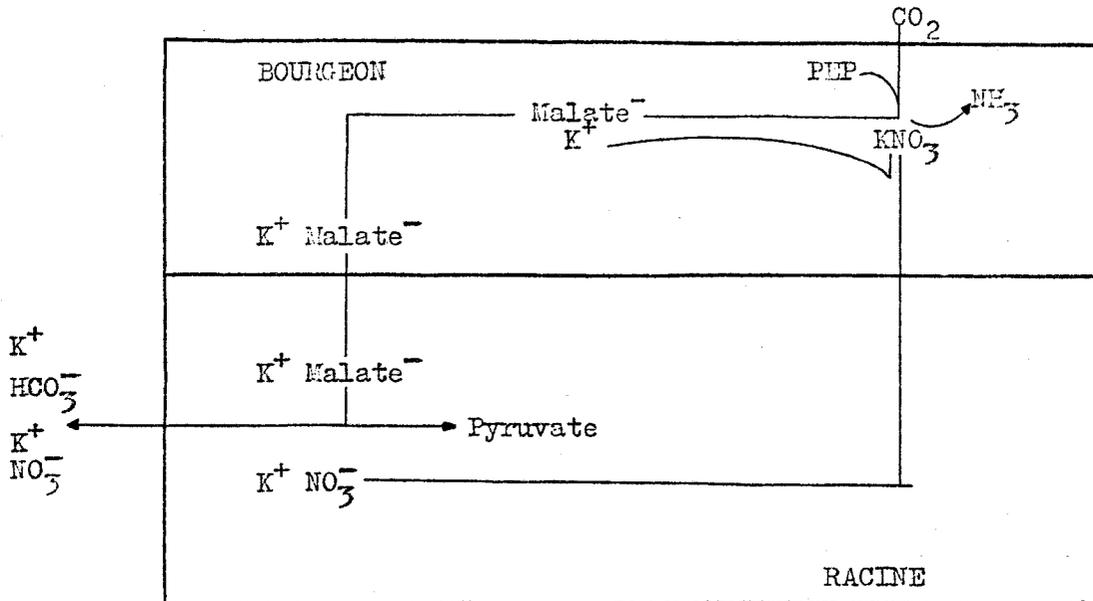
Il est connu que les acides aminés et les protéines agissent sur l'utilisation, la réduction et le métabolisme du nitrate (WEISSMAN, 1972 ; OAKS et Coll., 1977 ; RADIN, 1977 ; SAHULKA et LISA, 1978).

En 1974, SCHRADER et VOGELZANG observent que, chez le maïs et l'avoine, l'addition de 3 % de sérum albumine bovine ou de caséine au tampon d'extraction empêche ou retarde le déclin de l'activité de la nitrate réductase pendant plusieurs heures. Non seulement ces protéines stabilisent l'enzyme après son extraction mais son activité est augmentée spécialement dans les tissus matures. Donc l'addition de ces protéines doit empêcher la liaison d'un inhibiteur sur la nitrate réductase ou la plus grande concentration de protéines dans l'extrait doit empêcher la dissociation de la molécule enzymatique ou sert de substrat à l'action de protéases. ASLAM et OAKS (1975) montrent que l'addition de glucose au milieu ne modifie pas l'absorption nette du nitrate mais augmente parallèlement la fraction métabolisable et l'induction de la nitrate réductase. OAKS et Coll. (1977) remarquent que les acides aminés au contraire inhibent partiellement l'induction de l'enzyme dans les racines de maïs (RADIN, 1977). Pour eux, les acides aminés agissent sur l'induction et non sur le turnover de l'enzyme.

ASLAM et Coll. (1978) observent que la L-canavanine inhibe l'induction de la nitrate réductase dans les pointes et les sections matures des racines de maïs. Mais dans les pointes racinaires, l'inhibition est réversible complètement par une concentration équimolaire d'arginine, alors que dans les sections matures de plus fortes concentrations en arginine sont requises. Cet effet

de l'arginine est très semblable à celui du  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (ASLAM et OAKS, 1976). Ils suggèrent que l'effet de la canavanine, dans un système défini tel que l'induction de la nitrate réductase, est direct et en relation avec la synthèse protéique. Ces résultats avec la canavanine montrent que le nitrate protège seulement la nitrate réductase préexistante de la dégradation et suggèrent que la canavanine est incorporée dans la protéine-nitrate réductase pour produire une enzyme inactive. En 1979, OAKS et Coll. remarquent qu'un mélange d'acides aminés réduit le taux de nitrate réductase extractible dans les bourgeons, les pointes racinaires et les racines matures. Ces additions d'acides aminés inhibent plus fortement l'induction de la nitrate réductase dans les racines matures que dans les pointes racinaires. Pour eux, ils doivent interférer plus avec le transport du nitrate dans les bourgeons que directement avec l'enzyme. Enfin, RAMARAO et Coll. (1981 a et b) observent que le succinate, le malonate et le D - malate inhibent considérablement la réduction *in vivo*, sous anaérobiose et à l'obscurité, en limitant l'apport de NADH. Cette inhibition est réversible par le fumarate et le pyruvate. Ils proposent que l'inhibition observée est probablement due à l'effet de ces métabolites sur l'enzyme  $\text{NAD}^+$  - malique mitochondriale (DAVIES et PATIL, 1975). Il est possible, toutefois que l'inhibition de l'enzyme par le malonate et le D - malate soit responsable d'un manque en NADH requis pour la réduction du nitrate.

Le malate exerce aussi un contrôle sur la nitrate réductase. BEN-ZIONI et Coll. (1970 a et b) proposent un mécanisme par lequel les produits de la carboxylation du phosphoénol pyruvate (en particulier l'acide malique) contrôlent l'utilisation nitrique dans les racines. Ce mécanisme peut être schématisé comme suit :



Pour eux, la quantité de nitrate réduit est liée stoïchiométriquement à la synthèse de malate. Ce mécanisme de régulation est aussi trouvé chez le ricin (KIRKBY et ARMSTRONG 1980). A la même époque, DEANE - DRUMMOND et CLARKSON (1979) remarquent que l'addition de malate 0,1 mM dans le milieu extérieur cause une hausse de l'activité de la nitrate réductase dans les plantes décapitées au début de la photopériode et remplace partiellement les effets du bourgeon illuminé. L'oxalate, le fumarate et le tartrate n'ont pas d'effet. De plus, la préincubation des racines de plantes intactes avec du malate 10 mM pendant 3 heures, juste avant l'ablation des parties aériennes, provoque une augmentation du flux des acides aminés dans le xylème des racines décapitées. Donc le malate peut influencer l'assimilation du nitrate dans la plante entière en changeant la disponibilité du nitrate vis à vis de l'enzyme. De même, ROBIN et Coll. (1979) observent que des concentrations en nitrate du milieu comprises entre quelques dizaines et quelques centaines de microéquivalents permettent des activités enzymatiques plus importantes dans les feuilles que dans les racines, ces concentrations doivent être environ 20 fois plus élevées. Une des explications de ces observations est une répression de l'induction de la nitrate réductase des racines par le transfert d'asparagine et de glutamine des parties aériennes aux racines. Donc les bourgeons

régulent directement ou indirectement l'activité de l'enzyme dans les racines (BLEVINS et Coll., 1978 b).

### C - Les conditions d'environnement.

#### 1) La lumière.

Dans les tissus verts de nombreuses espèces, la lumière joue, après le nitrate, un rôle important. Elle est reconnue, depuis longtemps, pour avoir un effet stimulant sur l'activité de la nitrate réductase (CANDELA et Coll., 1957 ; SHIBATA et Coll., 1969 ; AMINDARI et Coll., 1978 ; KATO, 1980). Mais cet effet est plus ou moins discuté par les auteurs.

Pour certains, la lumière stimule l'induction de l'enzyme par une augmentation de la synthèse protéique (KANNANGARA et WOOLHOUSE, 1967 ; TRAVIS et Coll., 1970 a ; TRAVIS et KEY, 1971 ; NICHOLAS et Coll., 1976 b ; KNYPL et JANAS, 1979). CHEN et RIES (1969) puis TRAVIS et Coll. (1970 a et b) remarquent que dans les feuilles de beaucoup d'espèces végétales placées à l'obscurité, le nitrate n'induit pas l'activité de la nitrate réductase. Cet effet indirect de la lumière dans l'induction enzymatique s'expliquerait parce que les produits de la photosynthèse seraient la source d'énergie indispensable à l'induction (TRAVIS et KEY, 1971 ; NICHOLAS et Coll., 1976 b ; JORDAN et HUFFAKER, 1972) ou parce que la lumière est indispensable à la production du donneur d'électrons pour la réduction du nitrate (KLEPPER et Coll., 1971). CANVIN et ATKINS (1974) et ATKINS et CANVIN (1975) remarquent que dans les feuilles d'orge, la réduction du nitrate cesse lorsque la lumière est éteinte. Ils pensent que dans les feuilles existe un mécanisme régulateur qui arrête immédiatement la réduction nitrique à l'obscurité et évite ainsi l'accumulation de nitrite qui peut seulement être réduit lors des réactions photosynthétiques. Cette suggestion est expliquée par SAWHNEY et Coll. (1978). En effet, la photosynthèse inhibe la respiration mitochondriale et permet l'accumulation de NADH qui peut être utilisé pour la réduction du nitrate. A l'obscurité, la respiration mitochondriale reprend et le NADH oxydé par la voie de la chaîne respiratoire n'est plus

disponible pour la réduction nitrique. Donc, la lumière, l'ATP et la respiration mitochondriale réaliseraient un mécanisme régulateur de la réduction du  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$  dans les feuilles vertes. Plus récemment, NAIK et NICHOLAS (1982) suggèrent qu'une induction maximale par le nitrate nécessite la fixation du  $\text{CO}_2$  et l'export d'ATP par la navette du triose phosphate.

BUCZEK (1976) observe qu'en général, la lumière augmente l'activité de la nitrate réductase des cotylédons et réprime celle des racines, lors d'expériences de courtes durées. De plus au cours de l'étiollement des cotylédons, l'activité enzymatique non seulement disparaît dans les cotylédons mais elle est également diminuée dans les racines. Si les plantes sont transférées à la lumière, l'activité de la nitrate réductase augmente dans les racines. Pour l'auteur, la synthèse de l'enzyme qui a bien lieu dans les racines et les cotylédons ne nécessite pas la présence de la lumière. Celle-ci exercerait une action indirecte dans les différents organes de la plante étudiée.

Pour d'autres, la lumière n'est pas indispensable à l'induction de l'enzyme (BEEVERS et Coll., 1965 ; TRAVIS et KEY, 1971 ; JONES et SHEARD, 1978). Pour TRAVIS et KEY (1971), la lumière n'est pas nécessaire à l'induction de la nitrate réductase dans les feuilles de plantules placées à l'obscurité mais l'est pour réactiver l'appareil de la synthèse protéique des feuilles âgées. JONES et SHEARD (1978) montrent que le nitrite s'accumule *in situ* dans les feuilles vertes contenant la nitrate réductase lorsqu'elles sont transférées en anaérobiose et à l'obscurité. Ceci indique que la lumière n'est pas nécessaire à la réduction du nitrate. En 1979, ASLAM et Coll. observent que les plantules d'orge réduisent le nitrate à la fois à la lumière et à l'obscurité. Si la réduction est plus lente à l'obscurité, cela n'est pas dû à une absorption moindre du nitrate. Pour eux, la réduction plus rapide du nitrate à la lumière est attribuée à la production d'assimilats photosynthétiques, fournisseurs d'énergie réductrice. Et donc, lorsque des métabolites sont en quantité suffisante dans les tissus verts, la lumière n'est pas obligatoire pour la réduction du nitrate.

En résumé, la lumière est souvent nécessaire au maintien d'une haute activité de la nitrate réductase puisque :

- (1) le NADH fourni par la photosynthèse sert de donneur d'électrons dans la réduction du nitrate en nitrite (KLEPPER et Coll., 1971).
- (2) la lumière permet la disponibilité d'une plus grande concentration de nitrate dans les cellules (BEEVERS et HAGEMAN, 1969 ; RAO et RAINS, 1976 b).
- (3) la lumière augmente la synthèse protéique (TRAVIS et Coll., 1970 a).

## 2) La température.

La température est souvent associée à la lumière puisqu'elle modifie la réponse de l'activité de la nitrate réductase à l'obscurité. C'est ainsi qu'une température basse freine la perte d'activité enzymatique de plantes maintenues à l'obscurité (TRAVIS et Coll., 1969 ; TRAVIS et Coll., 1970 a et b).

NICHOLAS et Coll. (1976 a) remarquent que la perte d'activité de la nitrate réductase, mesurée *in vivo*, des feuilles de soja maintenues à l'obscurité, est plus rapide à 40°C qu'à 20°C. Toutefois, après 16 heures d'obscurité, les plantes exposées à 20°C ont perdu 95 % de l'activité enzymatique initiale. Donc l'augmentation de l'activité enzymatique est dépendante de la température. Par contre, DEANE-DRUMMOND et Coll. (1980) après avoir exposé les racines et les bourgeons à différentes températures remarquent que l'augmentation de l'activité enzymatique est plus importante dans les racines quand les plantules sont cultivées de telle sorte que les racines sont maintenues à 10°C et les bourgeons à 20°C, que lorsque les plantules entières sont soumises à la même température de 20° C. De plus les fluctuations nycthémerales de l'activité de la nitrate réductase sont plus importantes dans les racines de plantules soumises aux deux types de température que lorsque les racines sont également placées à 20°C et à l'obscurité. La lumière et la température influent donc sur la régulation de l'activité enzymatique. La réponse de l'enzyme à la température (HARRIS et WHITTINGTON, 1983) dépend beaucoup plus des changements de tem-

pérature au cours de la journée ou entre le jour et la nuit que de l'espèce considérée. Ainsi une température élevée pendant la nuit augmente l'activité de la nitrate réductase, sans doute par suite d'un métabolisme plus actif. Cependant une diminution de la température pendant le jour entraîne une activité enzymatique plus grande. Selon BAKKER et VAN HASSELT (1982), la réduction de l'activité enzymatique par le froid est de nature photooxydative puisqu'elle n'opère qu'en présence de lumière et d'oxygène. La même année, CUMBUS et NYE remarquent que l'utilisation du nitrate est plus affectée par des températures comprises entre 10 et 30°C et que la teneur en azote des bourgeons est plus affectée par la température racinaire. Donc, lors d'une température de 10°C, la croissance lente n'est pas associée à une pénurie en azote des bourgeons. L'influence principale de la température s'exerce sur l'expansion et la différenciation des tissus racinaires et probablement à travers les effets sur la production des carbohydrates aux méristèmes racinaires.

En résumé, la température interagit avec la lumière sur la régulation de l'activité de la nitrate réductase.

### 3) L'eau.

De nombreux changements métaboliques ont lieu lorsque le potentiel hydrique d'une plante diminue, on observe en particulier des changements dans l'activité de certaines enzymes (BARDZIK et Coll., 1971). Une des plus affectées est la nitrate réductase qui décline de 50 % dans les plantules de maïs présentant un déficit hydrique de 10 % (BARDZIK et Coll., 1971). Cet effet sur la nitrate réductase n'est pas étonnant puisqu'elle est labile (EVANS et NASON, 1953 ; INGLE et Coll., 1966, SCHRADER et Coll., 1968) et que son activité est affectée par de nombreux facteurs environnants (BEEVERS et Coll., 1965 ; HAGEMAN et FLESHER, 1960).

L'effet d'un déficit hydrique a été bien étudié dans 3 cas précis : la synthèse protéique, les flux de nitrate et le métabolisme primaire.

a) La synthèse protéique.

D'après BARNETT et NAYLOR (1966), BEN-ZIONI et Coll. (1967), puis RHODES et MATSUDA (1976), un stress hydrique diminue le nombre des polyribosomes qui sont le siège de la synthèse protéique. De plus, même une réhydratation sans nitrate implique une augmentation de l'activité enzymatique; le manque d'eau affecte donc bien la synthèse enzymatique (TRIBOI-BLONDEL, 1978). Les mêmes explications sont données par HSIAO (1970), MORILLA et Coll. (1973), PLAUT (1974), DHINDSA et CLELAND (1975) et par HEUER et Coll. (1979) qui attribuent la perte de l'activité enzymatique, due à un stress hydrique, à la fois à une inhibition directe et à un taux ralenti de la synthèse de l'enzyme. En effet la diminution de cette activité est obtenue 1 heure seulement après le stress et l'induction de l'enzyme par la lumière est inhibée par ce déficit hydrique.

Le manque d'eau ralentit la croissance par un effet indirect sur le contenu en polyribosomes ; l'action directe de la sécheresse s'exerce sur la synthèse de la nitrate réductase, en freinant l'activité des polyribosomes (RHODES et MATSUDA, 1976).

b) Les flux de nitrate.

Comme la nitrate réductase est induite par son substrat, le déclin de son activité par un déficit hydrique doit refléter une diminution de la teneur en nitrate des tissus. Mais c'est le flux de nitrate qui régularise la synthèse de l'enzyme et son activité (SHANER et BOYER, 1976 a). Cette synthèse dépend donc de l'approvisionnement réel en ion nitrique et non pas du taux de nitrate des tissus où il serait localisé dans des sites moins accessibles (MARTINOIA et Coll., 1981). Par conséquent, l'augmentation de l'activité enzymatique par simple apport d'eau implique le passage du pool métabolique inactif au pool actif, du nitrate présent. Il existe donc une influence directe du flux hydrique sur la disponibilité du nitrate susceptible d'induire l'enzyme (TRIBOI-BLONDEL, 1978). SHANER et BOYER (1976 b) prouvent que l'inhibition de l'activité de la nitrate réductase par de bas potentiels hydriques n'est pas contrôlée par un effet direct de ce déficit hydrique

sur la synthèse protéique ni par une altération du contenu en nitrate du tissu, mais plutôt par une diminution dans le flux de nitrate, qui régule la synthèse enzymatique. Car malgré le stress hydrique, l'activité de la nitrate réductase peut être accrue à condition d'augmenter la concentration externe du nitrate, ce qui augmente son flux.

c) Le métabolisme primaire.

La photosynthèse et la respiration sont une source de nucléotides réduits nécessaires à la réduction du nitrate. Mais la photosynthèse et la respiration sont moins vite affectées que la nitrate réductase par le régime hydrique (TRIBOI-BLONDEL, 1978).

D - L'état physiologique de la plante.

1) L'âge.

L'activité de la nitrate réductase diminue avec l'âge des tissus. Les études de WALLACE et PATE (1965) réalisées sur des feuilles d'âge différents, prélevées sur des plantes qui se sont développées en présence d'une quantité constante de nitrate, montrent que l'activité de l'enzyme est la plus importante au moment où la feuille est en pleine expansion, puis que, par la suite, elle diminue nettement tout en continuant à être faiblement active jusqu'à la sénescence.

Tous les travaux ultérieurs s'accordent pour dire que l'activité de la nitrate réductase diminue avec l'âge de la plante (JORDAN et HUFFAKER, 1972 ; OAKS et Coll., 1972 ; WALLACE, 1973 b ; SCHRADER et Coll., 1974 ; WALLACE, 1975 ; AMINDARI et Coll., 1978). Pour JORDAN et HUFFAKER (1972), cette diminution n'est pas due à un manque de nitrate dans les tissus. OAKS et Coll. (1972) remarquent également une inactivation de l'enzyme extraite de racines matures, au cours du temps et sous l'effet de variations thermiques. Ce phénomène pourrait être lié à l'apparition d'un système d'inactivation spécifique de la nitrate réductase (WALLACE, 1973 a et 1975) ou à une altération de la stabilité physicochimique de l'enzyme (SCHRADER et VOGELZANG, 1974). Pour PALMER (1979) la faible

activité de la nitrate réductase endogène de tubercules de pomme de terre est probablement due à une faible teneur en nitrate plutôt qu'à une accumulation d'azote organique ou à la présence d'inhibiteurs spécifiques de la nitrate réductase. Enfin, on ne saurait oublier qu'avec l'âge s'observent des modifications de l'appareil photosynthétique (baisse de la teneur en chlorophylle) ainsi que de l'appareil de synthèse protéique (baisse du nombre des polyribosomes). Par conséquent, le vieillissement des feuilles entraîne une diminution de la concentration en donneurs d'électrons et se traduit par une capacité affaiblie de la synthèse protéique.

## 2) La synthèse des protéines et d'ARN.

L'induction de la nitrate réductase, activée par le nitrate, dépend plutôt d'une synthèse protéique *de novo*, que d'une activation de molécules enzymatiques préexistantes ou préformées (HEWITT et AFRIDI, 1959 ; AFRIDI et HEWITT, 1964 ; BEEVERS et Coll., 1965 ; INGLE et Coll., 1966 ; INGLE, 1968). De même lorsque la synthèse protéique est stimulée, l'induction enzymatique est augmentée (TRAVIS et Coll., 1970 b ; NICHOLAS et Coll., 1976 b). C'est ainsi que de nombreux chercheurs ont étudié les effets des inhibiteurs de la synthèse protéique (cycloheximide) et d'ARN (chloramphénicol, 6 méthyl-purine, 5 fluorouracyl, actinomycine) sur la synthèse de l'enzyme réductrice du nitrate.

En 1967, SCHRADER et Coll. remarquent que l'induction de l'enzyme est réprimée par le chloramphénicol, suggérant que la nitrate réductase est synthétisée par un système ribosomal cytoplasmique. INGLE (1968) retrouve les mêmes résultats avec le chloramphénicol, la cycloheximide, l'actinomycine -D et la puromycine, malgré toutefois une plus forte inhibition de la cycloheximide. Il conclut cependant d'une façon prudente que si l'induction de la nitrate réductase s'effectue par le biais d'une synthèse protéique, celle-ci pourrait être nécessaire non pas à la synthèse de la nitrate réductase en soi mais à un activateur d'un précurseur de l'enzyme. Tous les travaux ultérieurs s'accordent pour dire que la formation et l'induction de la nitrate réductase sont des processus de la synthèse protéique (SHEN, 1969 ; OAKS et Coll., 1972 ;

SLUITERS-SCHOLTEN, 1973 ; NEYRA et HAGEMAN, 1975 ; RAO et RAINS, 1976 b ; SASAKAWA et YAMAMOTO, 1977 a et 1978 ; POULLE et RAMBOUR, 1979 ; OAKS et STULEN, 1980) voire une synthèse *de novo* de la nitrate réductase (RADIN, 1974 ; HEWITT, 1975 ; SMITH et THOMPSON, 1971 ; CARELLI et MAGALHAES, 1981). D'autres auteurs remarquent que les inhibiteurs de la synthèse protéique diminuent considérablement l'absorption du nitrate (SHEN, 1969 ; JACKSON et Coll., 1973 ; RAO et RAINS, 1976 b).

Pour ce qui est des inhibiteurs de la synthèse d'ARN, leurs effets sont différents d'un cas à l'autre. Ainsi, pour certains auteurs, ces inhibiteurs répriment complètement l'induction de la nitrate réductase (SCHRADER et Coll., 1967 ; SHEN, 1969 ; HEWITT, 1975 ; SLUITERS-SCHOLTEN, 1973) ou affectent la translocation du nitrate (EZETA et JACKSON, 1975 ; TOMPKINS et Coll., 1978). Pour d'autres ils n'ont aucun effet sur l'induction enzymatique (NEYRA et HAGEMAN, 1975 ; SASAKAWA et YAMAMOTO, 1977 a ; CARELLI et MAGALHAES, 1981). JACKSON et Coll. (1973) remarquent que suivant l'inhibiteur employé, l'effet est différent. Ainsi le chloramphénicol n'a aucune influence ; par contre la 6-méthylpurine a un effet fort dépressif (elle inhibe toutes les formes d'ARN) ; en outre la 5-fluorouracyl (inhibitrice des ARN ribosomiaux) n'a pas d'effet. Donc suivant les auteurs, la synthèse d'ARN dans l'induction enzymatique est nécessaire (VAN STEVENINCK et VAN STEVENINCK, 1972).

En ce qui concerne l'induction de la nitrate réductase, le problème est loin d'être totalement résolu actuellement. En effet, si la compréhension du mécanisme de l'induction chez les algues ou les champignons inférieurs semble relativement claire, il n'en est pas de même chez les végétaux supérieurs. Chez les Ascomycètes, la plupart des auteurs s'accordent pour dire que la nitrate réductase est synthétisée *de novo* (BAHNS et GARRETT, 1980). Chez les algues, l'induction pourrait passer par la synthèse d'une protéine qui activerait un précurseur de l'enzyme (FUNKHOUSER et RAMADOSS, 1980 ; FUNKHOUSER et Coll., 1980 ; VENNESLAND 1980). Chez les végétaux supérieurs, la découverte de multiples formes enzymatiques complique le problème. De plus une certaine confusion résulte d'une

utilisation dans des sens très différents du terme "induction". Pour de nombreux auteurs, il est synonyme d'apparition de l'activité enzymatique alors que pour d'autres il correspond à la synthèse *de novo* de l'enzyme. Toujours est-il que l'induction dans le second sens a été montrée dans certains cas. ZIELKE et FILNER (1971) par la combinaison de techniques de marquages et de gradient de densité montrent la synthèse *de novo* de l'enzyme dans des cellules de tabac. SOMERS et Coll. (1983) observent chez divers mutants une relation étroite entre l'existence d'une activité enzymatique et la présence d'un matériel antigénique qui précipite les anticorps spécifiques de la nitrate réductase. Dans le cas des suspensions cellulaires de silène, l'existence d'une fraction antigénique a été montrée en absence de toute activité de la nitrate réductase (RAMBOUR et Coll., 1982, sous-presse ; POULLE et RAMBOUR, communication personnelle). Cette observation rejoint donc les résultats de FUNKHOUSER et Coll. (1980). Comme par ailleurs on a souvent, par d'autres moyens, mis en évidence des formes inactives de la nitrate réductase (pour revue voir GUERRERO et Coll., 1981), on voit donc que le problème de la synthèse de la protéine-nitrate réductase chez les végétaux supérieurs est loin d'être résolu.

### 3) L'équilibre hormonal.

L'équilibre hormonal joue un rôle important dans la croissance et le développement d'une plante puisqu'ils sont gouvernés par les phytohormones : auxines, gibbérellines, cytokinines, acide abscissique...

Ainsi en 1970 a, ROTH-BEJERAMO et LIPS remarquent que l'ablation de l'apex (source d'auxine) chez le tabac diminue l'activité de la nitrate réductase dans les jeunes feuilles. Cet effet n'est pas directement lié à la production d'auxines puisque l'addition d'AIA ne rétablit pas cette activité foliaire. Si au contraire les plantes décapitées sont traitées par de l'acide gibbéréllique, une importante stimulation de l'activité enzymatique est observée dans les jeunes feuilles. Ils suggèrent donc, que l'acide gibbéréllique est un facteur majeur, affectant l'activité de la nitrate réductase. Or la kinétine modifie aussi la concentration d'acide gibbéréllique nécessaire à la stimulation de l'activité

enzymatique et donc plus il y a de kinétine, moins il y a d'acide gibbérellique et donc moins d'activité de la nitrate réductase.

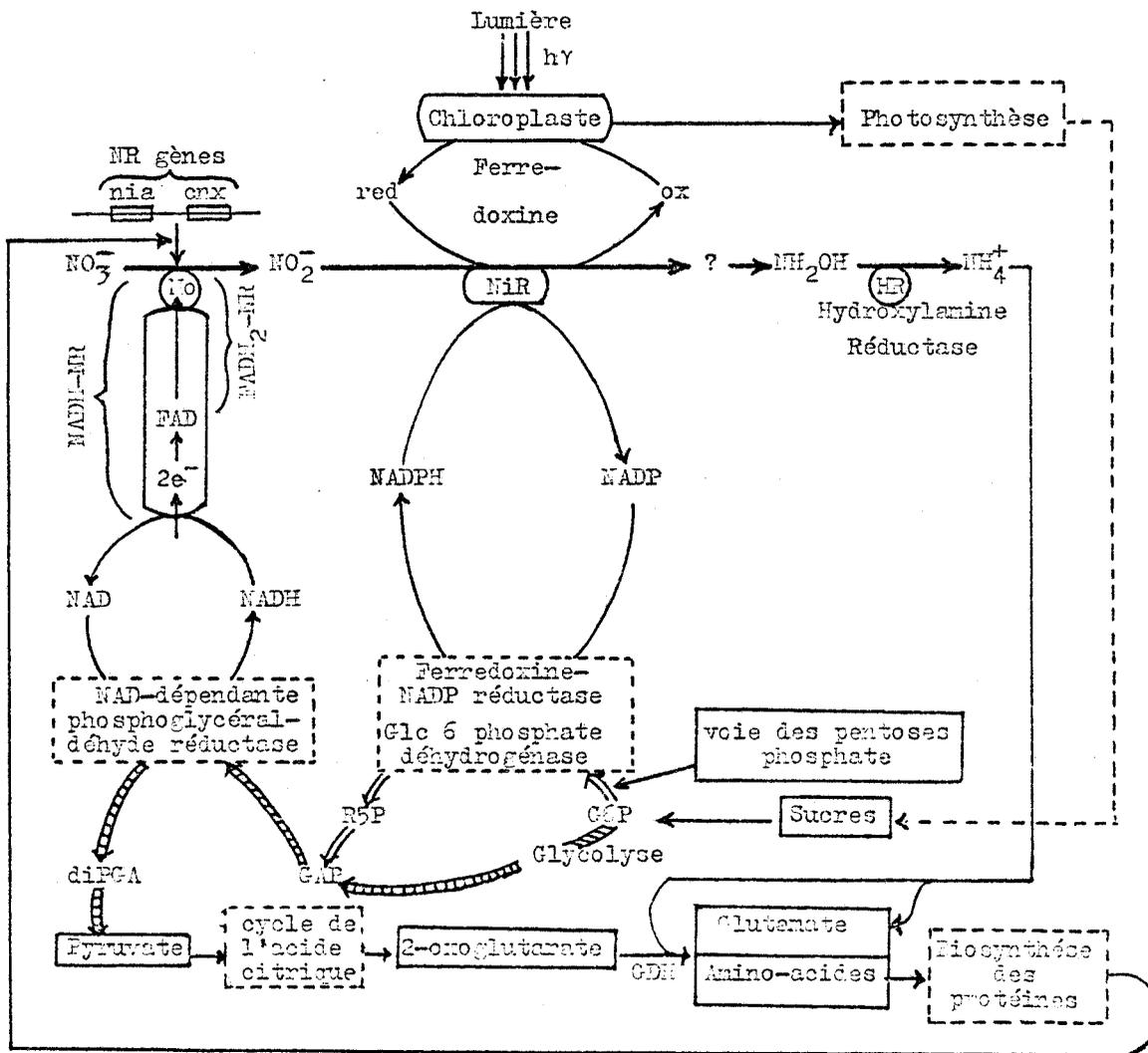
KNYPL, en 1977, étudie le contrôle des phytohormones sur l'activité de la nitrate réductase. Il remarque que l'AIA et l'ABA répréssent la synthèse de l'enzyme induite par le nitrate. Tandis que l'acide gibbérellique, la kinétine n'affectent pas cette activité à l'obscurité ; à la lumière, la kinétine augmente faiblement mais significativement l'activité enzymatique. De tels résultats suggèrent un contrôle de la nitrate réductase par les phytohormones. Il semble que les phytohormones agissent par la mobilisation d'un inducteur.

Dans un récent travail, PALMER (1981) montre que l'acide abscissique inhibe l'activité de la nitrate réductase dans les tubercules de pomme de terre, en présence de nitrate exogène, pendant l'étape initiale d'incubation. Cependant des prétraitements avec l'hormone, pendant des périodes allant jusqu'à 24 heures et en l'absence de nitrate, augmentent significativement l'activité de la nitrate réductase lorsque des nitrates sont fournis aux tubercules. Cette réponse à l'hormone suggère que ce prétraitement supprime les inhibitions ou stimule les processus associés à l'utilisation et à la réduction du nitrate. L'année suivante, PALMER (1982) propose, en utilisant l'actinomycine -D et la cycloheximide, que la réponse de l'acide abscissique requiert la synthèse protéique mais doit être indépendante de la transcription d'ARN, et que l'effet stimulant de l'acide abscissique en présence d'actinomycine -D sur l'enzyme est dû à la suppression de la synthèse d'inhibiteurs protéiques.

En fait, les hormones modifient l'activité de la nitrate réductase. Or le déficit hydrique et le vieillissement affectent l'équilibre hormonal qui, par ce fait, peut agir sur l'activité enzymatique.

En conclusion, on peut estimer que les facteurs qui interviennent de la façon la plus efficace sur la régulation de la

nitrate réductase sont l'état physiologique de la plante ainsi que son métabolisme, schématisés comme suit :

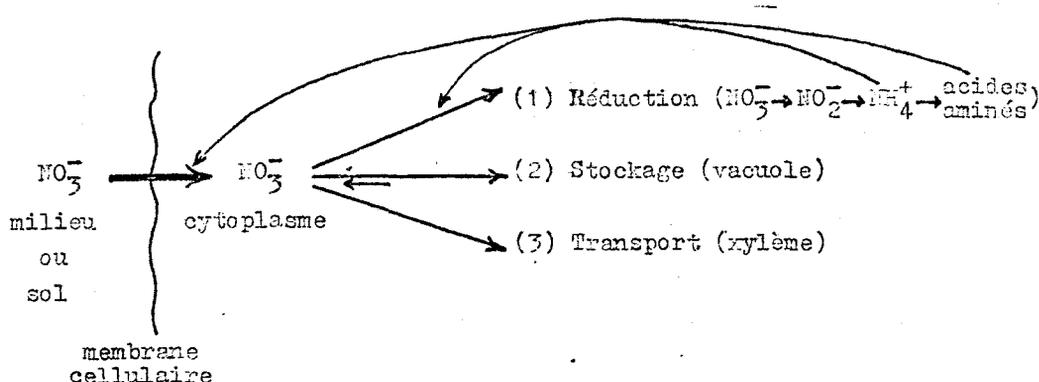


IV - LA DISTRIBUTION DE L'ENZYME DANS LA PLANTE.

De nombreux chercheurs ont tenté de comparer les taux de nitrate réductase dans les différents organes de la plante (BAR-AKIVA et SAGIV, 1967 ; WEISSMAN, 1972 ; WALLACE, 1973 b ; RADIN, 1974 et 1975 ; ASLAM et OAKS, 1976) même si les comparaisons sont difficiles à faire. Il apparaît cependant que brièvement après

la germination, il existe une activité enzymatique mesurable à la fois dans les racines (avant l'allongement, selon RADIN, 1974) et dans les bourgeons. Puis comme la plante devient mature, l'activité disparaît ou n'est plus détectée dans les racines et les feuilles prennent le relais dans la réduction du nitrate. Cette perte d'activité serait due, selon WALLACE (1973 a et 1975), à la présence d'une protéine inactivatrice de la nitrate réductase dans les parties matures de la racine. Cette protéine inactivatrice agirait comme une protéase, bien que ce dernier point ne soit pas démontré. Son rôle physiologique n'est pas non plus clairement défini (KADAM et Coll., 1974 ; JOLLY et TOLBERT, 1978). De nombreux travaux ont donc porté sur la présence ou non des inactivateurs de la nitrate réductase dans les tissus (ASLAM, 1977 ; SHERRARD et Coll., 1979 a et b ; YAMAYA et Coll., 1980 ; HE et Coll., 1982 ; LEONG et SHEN, 1982).

Mais il ne faut pas oublier que même lorsque l'activité de la nitrate réductase n'est pas détectée dans les racines, ces dernières restent néanmoins un élément essentiel dans le métabolisme du nitrate de la plante, puisque grâce à elles le nitrate entre dans la plante. Ce n'est qu'après son entrée que le nitrate est soit (1) réduit par le système racinaire en  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NH}_4^+$  et éventuellement en acides aminés azotés (HEWITT, 1975), soit (2) stocké dans la vacuole lorsqu'il est en excès dans le milieu externe (MARTINOIA et Coll., 1981) et donc réutilisable lors d'une carence (FERRARI et Coll., 1973), soit (3) transféré par le xylème dans les parties aériennes de la plante (AHSLEY et Coll., 1975). Ce rôle des racines dans le métabolisme azoté peut donc être schématisé comme suit :



## V - L'EXTRACTION ET LA PURIFICATION DE L'ENZYME.

### A - L'extraction de l'enzyme.

L'extraction de la nitrate réductase, des tissus végétaux, présente de nombreuses difficultés puisqu'elle se fait par un broyage de tissus. Or le broyage libère des composés phénoliques qui inhibent puissamment des activités enzymatiques (LOOMIS et BATAILLE, 1966 ; ANDERSON, 1968). Cette difficulté peut être évitée grâce à des adsorbants tels que la caséine (LOOMIS et BATAILLE, 1966 ; SCHRADER et Coll., 1974 ; ROBIN, 1979), l'albumine (ANDERSON, 1968), le PVP insoluble (KLEPPER et HAGEMAN, 1969 ; CAMPBELL et SMARRELLI, 1978 ; REDINBAUGH et CAMPBELL, 1981 et 1983) ou les résines échangeuses d'ions (PURVIS et TISCHLER, 1976).

De plus ce broyage a pour autre conséquence, des oxydations cellulaires qui sont limitées par l'apport d'antioxydants au tampon d'extraction. Ces antioxydants ont souvent des groupements thiols tels que la cystéine (CAMPBELL et SMARRELLI, 1978 ; ROBIN, 1979 ; REDINBAUGH et CAMPBELL, 1981) ou le dithiothréitol (KUO et Coll., 1982). Les concentrations d'antioxydants utilisés dépendent de l'espèce et de l'organe étudiés (ROBIN, 1979).

Enfin, la protéolyse est aussi une source d'erreur dans la mesure de l'activité de la nitrate réductase *in vitro* des tissus matures (SCHRADER et Coll., 1974). Celle-ci est assurée par une protéase spécifique et très active dans les parties âgées du maïs (WALLACE, 1973 a et 1975). Elle peut être neutralisée par la présence de cystéine dans le tampon (WALLACE, 1975).

D'autres produits peuvent être ajoutés au tampon et surtout des stabilisateurs de l'enzyme tels que le FAD, le molybdène, l'EDTA.

Le tampon d'extraction varie selon les auteurs mais il s'agit soit du tampon phosphate de potassium (EVANS et NASON, 1953 ; NICHOLAS et NASON, 1955 ; CANDELA et Coll., 1957 ; CAMPBELL et SMARRELLI, 1978 ; TISCHLER et Coll., 1978 ; FIDO et Coll., 1979 ; NOTTON et Coll., 1979 ; ROBIN, 1979 ; PURVIS et Coll., 1980 ; REDINBAUGH et CAMPBELL, 1981 et 1983) soit du tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane -HCl (BEEVERS et Coll., 1964 ; WALLACE et PATE, 1965 ; EAGLESHAM et HEWITT, 1971 ; NOTTON et Coll., 1977 ; KUO et

Coll., 1980 et 1982 ; SOMERS et Coll., 1982). Leur concentration et leur pH dépendent aussi de l'espèce et de l'organe étudiés.

### B - La purification de l'enzyme.

Les premières purifications de l'enzyme ont été faites par EVANS et NASON (1953), qui utilisent une adsorption sur gel de phosphate de calcium et des précipitations par sulfate d'ammonium. Ils ont obtenu des préparations enzymatiques faiblement purifiées et à bas rendement.

Puis l'apparition des nouvelles méthodes, telles que la gel filtration, la chromatographie sur gel d'hydroxyapatite ou DEAE-cellulose a permis une purification partielle de l'enzyme mais toujours à faible rendement, dû certainement à sa nature labile (PANEQUE et Coll., 1965 ; ROUSTAN et Coll., 1974 ; JOLLY et Coll., 1976). Puis la chromatographie d'affinité qui est un procédé rapide et spécifique de l'isolement de la nitrate réductase, donne de bons rendements (WALLACE et PATE, 1965 ; SOLOMONSON, 1975 ; SHERRARD et DALLING, 1979).

Le procédé de purification de l'enzyme a été développé en utilisant la chromatographie d'affinité en bleu-Dextran sépharose (SOLOMONSON, 1975 ; NOTTON et Coll., 1977 ; SHERRARD et DALLING, 1979) ou alors la chromatographie d'affinité en Bleu-sépharose (CAMPBELL et SMARRELLI, 1978 ; FIDO et Coll., 1979 ; NOTTON et Coll., 1979 ; KUO et Coll., 1980 ; REDINBAUGH et CAMPBELL, 1981 ; SOMERS et Coll., 1982).

En 1975, PORATH et Coll. développent une nouvelle technique de purification qu'ils ont nommée la chromatographie d'affinité par métal chélateur et qui consiste à attacher la moitié de la molécule d'EDTA sur une sépharose et qui est liée à un métal tel que  $Zn^{++}$  ou  $Cu^{++}$ . L'élution se fait par changement de force ionique ou de pH (REDINBAUGH et CAMPBELL, 1983).

Dans la majeure partie des cas, la chromatographie est précédée de précipitations des protéines par le sulfate d'ammonium et lorsque l'enzyme est purifiée, son analyse peut se faire par électrophorèse.

# MATERIEL ET METHODES

## LE MATERIEL

### 1) La plante entière

#### a) *Cichorium intybus* L. var. *Witloof*.

La chicorée de Bruxelles ou chicorée Witloof est une plante bisannuelle, de jours longs, appartenant à la famille des Astéracées. Son cycle de végétation comprend, la première année, une phase végétative caractérisée par la production d'une racine tubérisée et de feuilles disposées en rosette, et la seconde année, une phase reproductrice aboutissant à la formation des graines. Généralement dans la pratique agricole en usage dans notre région, le cycle de végétation est interrompu à la fin de la première année et les racines sont récoltées afin d'obtenir des endives. Seuls les producteurs de graines laissent se poursuivre le cycle complet.

#### b) Racine en forçage.

La racine de chicorée Witloof est apte à donner sous des conditions bien déterminées de lumière et de température (forçage) un bourgeon formé d'un ensemble de feuilles étiolées partiellement charnues, emboîtées, qui constitue l'endive encore appelée chicon.

Le forçage des racines qui traditionnellement sont placées dans un substrat solide, est actuellement effectué dans des salles obscures et maintenues à 18° C, à 90 % d'humidité et les endives poussent sans terre de couverture, à partir de racines qui sont placées dans une solution minérale (nitrate de chaux à 3g. l<sup>-1</sup>). L'alimentation en solution nutritive est continue et se fait par le bac du haut de la pile, contenant les racines disposées en rangs serrés. Lorsque le niveau est atteint, le trop plein déborde dans le bac immédiatement inférieur et ainsi de suite. Tous les 18 jours les endives sont récoltées.

De jeunes racines se forment très rapidement (vers le 9ème jour) sur la racine pivotante et leur nombre croît jusqu'à la récolte. Leur importance quantitative est certainement liée à l'obtention de bon rendement en chicons.

## 2) La culture "in vitro".

### A - Les fragments racinaires.

#### a) Le matériel biologique.

Les racines tubérisées, gardées en chambre froide à 4° C et à l'obscurité, sont épluchées puis désinfectées par de l'hypochlorite de calcium à 140g. l<sup>-1</sup> pendant 25 minutes et enfin rincées trois fois pendant respectivement 5, 10, 15 minutes (BUVAT, 1945) par de l'eau stérile.

Selon une technique décrite par LEFEBVRE (1977) des cylindres de 6 mm de diamètre sont prélevés à l'aide d'un trocart puis découpés en disque de 2 mm d'épaisseur et placés horizontalement dans les fioles de Fourneau, à raison de 10 fragments par fiole, ou alors de 5 mm et 1 cm d'épaisseur et placés dans des tubes 190/22 mm, à raison d'un fragment par tube. Tous les ensemencements se font de façon à ce que la face de l'explantat située dans la partie la plus proche du collet soit hors du milieu.

#### b) Le milieu de culture.

Le milieu nutritif employé est constitué par :

- les macroéléments de la solution de HELLER (1953) :  
KCl : 937,5 mg.l<sup>-1</sup> ; Na NO<sub>3</sub> : 750 mg.l<sup>-1</sup> ; Mg SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 312,5 mg.l<sup>-1</sup> ; Ca Cl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O : 937,4 mg.l<sup>-1</sup> ; Na H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O : 176,2 mg.l<sup>-1</sup>.

- les microéléments de la solution de HELLER (1953) :  
ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 10 mg.l<sup>-1</sup> ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 10 mg.l<sup>-1</sup> ; Mn SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O : 0,758 mg.l<sup>-1</sup> ; CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O : 0,3 mg.l<sup>-1</sup> ; AlCl<sub>3</sub> : 0,3 mg.l<sup>-1</sup> ; NiCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O : 0,3 mg.l<sup>-1</sup> ; KI : 0,1 mg.l<sup>-1</sup> ; Fe Cl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O : 10 mg.l<sup>-1</sup>.

Ce milieu est solidifié par de la gélose (agar Difco) à 6 ‰ et les fioles de Fourneau contenant environ 40 ml de milieu ou les tubes avec environ 16 ml de milieu sont stérilisés à l'autoclave pendant 25 minutes à 120° C.

c) Le conditionnement des cultures.

Après l'ensemencement, les fioles et les tubes sont recouverts d'une feuille d'étain qui empêche la dessiccation du milieu, puis placés pendant 16 jours dans une pièce maintenue à 24° C et à la lumière continue (130 lux).

B - Les fragments foliaires.

a) Le matériel biologique.

Les endives sont récoltées juste avant la stérilisation. Les feuilles de taille moyenne sont seules retenues et stérilisées par de l'hypochlorite de calcium selon un protocole mis au point par VASSEUR (1979 a et b) mais la concentration en hypochlorite de calcium est de 150 g. l<sup>-1</sup> et le temps de stérilisation de 40 minutes. Les explantats sont alors prélevés au niveau de la nervure centrale, charnue, à l'aide d'un trocart de 16 mm de diamètre, et placés horizontalement dans des tubes 190/22 mm, à raison d'un fragment par tube. L'épiderme inférieur de l'explantat est au contact du milieu.

b) Le milieu de culture.

Le milieu nutritif est celui de MURASHIGE et SKOOG (1962) dépourvu de glycoColle et d'hydrolysate de caséine ; il contient les éléments suivants :

α) Les minéraux.

- Les macroéléments :

CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O : 440 mg.l<sup>-1</sup> ; NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> : 1650 mg.l<sup>-1</sup> ; KNO<sub>3</sub> : 1900 mg.l<sup>-1</sup> ; Mg SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 370 mg.l<sup>-1</sup> ; KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> : 170 mg.l<sup>-1</sup>.

- Les microéléments :

Fe - EDTA Merck :  $19,45 \text{ mg.l}^{-1}$  ;  $\text{Zn SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  :  $10,6 \text{ mg.l}^{-1}$  ;  
KI :  $0,83 \text{ mg.l}^{-1}$  ;  $\text{Na}_2 \text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$  :  $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$  ;  $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$  :  
 $0,025 \text{ mg.l}^{-1}$  ;  $\text{Co Cl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$  :  $0,025 \text{ mg.l}^{-1}$  ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  :  $6,2 \text{ mg.l}^{-1}$  ;  
 $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$  :  $16,9 \text{ mg.l}^{-1}$ .

β) Les vitamines.

Pyridoxine :  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  ; Acide nicotinique :  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  ;  
Vitamine B<sub>1</sub> :  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  ; Inositol :  $100 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Du glucose à 3 % ( $30\text{g.l}^{-1}$ ) est ajouté au milieu puis celui-ci est solidifié par de la gélose (agar Difco) à 6 %/.. Les paniers de tubes contenant environ 15 ml de milieu sont passés à l'autoclave pendant 25 minutes à  $120^\circ \text{C}$ .

c) Le conditionnement des cultures.

Après l'ensemencement, les tubes sont recouverts d'une feuille d'étain comme les fioles. Puis les paniers de tubes sont placés dans une pièce maintenue à  $22^\circ \text{C}$  et éclairée 12 heures par jour. La lumière est produite par des tubes luminescents qui fournissent un éclairage de 1000 lux environ au niveau des tubes.

3) Les germinations.

Des boîtes de Pétri sont tapissées d'ouate, recouverte d'un disque de papier filtre de même diamètre. Le tout est imbibé soit d'eau distillée (témoin) soit de milieu de HELLER (1953) soit de nitrate de chaux ( $3 \text{ g.l}^{-1}$ ). Les graines sont déposées sur ce papier imbibé et mises à germer à la lumière dans une pièce maintenue à  $22^\circ \text{C}$  et éclairée 12 heures par jour (1000 lux).

## LES METHODES DE DOSAGE

### 1) Dosages de l'activité de la nitrate réductase

#### a) Dosage *in vivo*.

Le principe de la méthode *in vivo* de mesure de l'activité de la nitrate réductase consiste à doser le nitrite formé après la réduction du nitrate par les explants incubés sous conditions anaérobies (FERRARI et VARNER, 1971 ; JAWORSKI, 1971). L'anaérobiose est nécessaire car la nitrite réductase ne fonctionne pas sous ces conditions, ce qui permet de doser le nitrite présent dans le milieu.

Les échantillons sont mis dans 2 ml du mélange d'incubation suivant :

- tampon phosphate  $K_2 HPO_4 / KH_2 PO_4$  0,1 M pH 7,5  
: 30 ml.
- solution de  $KNO_3$  0,1 M : 50 ml.
- n-propanol : 1 ml.

Un faible courant d'azote parcourt le tube pendant 30 secondes puis celui-ci est bouché hermétiquement pour permettre l'anaérobiose complète. Après 30 minutes d'incubation à 30° C et à l'obscurité la réaction est stoppée par l'addition de 1 ml d'une solution à 0,2 % de sulfanilamide dans HCl 6N et la révélation de la coloration se fait par 1 ml d'une solution aqueuse de N-naph-tyl - 1 éthylène diamine dichlorhydrate (580 mg/100ml). En présence de nitrite , il apparaît une coloration rose dont l'intensité est lue au spectrophotomètre à 540 nm.

Afin de connaître la quantité de nitrite présent , une gamme étalon est établie de 0,01  $\mu$  mole à 0,1  $\mu$  mole de nitrite ainsi que la courbe étalon des densités optiques en fonction de la concentration en nitrite.

Pour chaque échantillon une série de 3 mesures est effectuée, à raison de 3 dosages pour chaque mesure.

b) Dosage *in situ*.

Cette méthode permet d'évaluer l'activité réelle de réduction du nitrate en évitant l'incubation dans un milieu liquide (JONES et SHEARD, 1978 ; ROBIN et Coll., 1983 b).

L'échantillon est introduit dans un tube avec un bouchon en caoutchouc pour assurer l'étanchéité. Deux aiguilles creuses permettent le balayage d'azote à la pression de 0,15 Bar pendant 5 minutes. L'obscurité est assurée par une feuille d'aluminium entourant le tube.

Après incubation dans l'azote gazeux et à l'obscurité pendant 60 minutes, l'addition de 4 ml d'eau distillée portée à ébullition et le maintien du tube durant au moins 1 minute dans un bain-marie bouillant permettent d'extraire le nitrite dont le dosage s'effectue selon la méthode décrite ci-dessus.

c) Dosage *in vitro*.

α) Activité NADH ou NADPH - Nitrate réductase.

Une aliquote d'extrait enzymatique brut (0,1 ml) est ajoutée au milieu d'incubation suivant :

- 1 ml du tampon d'extraction
- 0,1 ml de  $\text{KNO}_3$  0,1M
- 0,1 ml de NADH ou NADPH (1mg/ml).

L'incubation est réalisée à l'obscurité et à 30° C pendant 30 minutes. Puis le dosage du nitrite s'effectue selon le processus habituel.

β) Activité méthyl-viologène - Nitrate réductase.

Une aliquote d'extrait enzymatique brut (0,1 ml) est ajoutée au milieu d'incubation suivant :

- 1 ml du tampon d'extraction
- 0,1 ml de  $\text{KNO}_3$  0,1 M

- 0,1 ml de méthyl-viologène (12,8 mg/100 ml de tampon)

- 0,1 ml de dithionite de sodium (10 mg/ml de  $\text{CO}_3 \text{HNa}$  0,1 M).

Puis incubation à 30° C et à l'obscurité pendant 30 minutes et agitation des tubes à la fin du temps d'incubation pour obtenir la forme oxydée du méthylviologène (incolore) alors que sa forme réduite est bleue. Puis le nitrite est dosé par la méthode décrite précédemment.

## 2) Dosage des protéines

Les échantillons sont tout d'abord lyophilisés pendant 48 heures puis broyés au mortier avec un pilon. Les protéines sont extraites à partir d'une aliquote de 100 mg selon le protocole de la page suivante .

De cette solution, 1 ml est prélevé pour effectuer le dosage des protéines par la méthode de LOWRY (1951).

A 1 ml de la solution protéique sont ajoutés 3 ml du mélange d'une solution de tartrate (50 ml) ( $\text{CO}_3 \text{Na}_2$  anhydre : 2 g ; tartrate de K et Na : 20 mg ; Na OH 0,1 N : 100 ml) et d'une solution de sulfate de cuivre (1 ml) ( $\text{SO}_4 \text{Cu}$ ,  $5\text{H}_2\text{O}$  : 0,5 g ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré : 1 goutte ; eau distillée : 100 ml). Les solutions sont agitées et laissées 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

# PROTOCOLE D'EXTRACTION DES PROTEINES

100 mg de matériel lyophilisé



20 ml d'acétone à 80 % (solubilisation des pigments)  
Agitation 10 min. puis centrifugation (10.000 g, 10 min.)



Culot repris par 10 ml de TCA à 10 %  
Précipitation une nuit en chambre froide puis centrifugation  
(10.000 g, 10 min.)



Culot remis en suspension dans 10 ml d'éthanol à 80 %  
saturé en acétate de sodium (élimination de l'acidité)  
pendant 10 min. puis centrifugation (10.000 g, 10 min.)



Culot repris dans 10 ml d'alcool absolu. Laisser reposer pen-  
dant 10 min. puis centrifugation (10.000 g, 10 min.)



Séchage du culot



Dissolution dans 5 ml de Na OH 1 N  
Bain-marie à 80° C pendant 30 min.



Centrifugation et récupération du surnageant qui contient les  
protéines. Rincage du culot, par deux fois, par de l'eau distil-  
lée et les eaux de rincage sont ajoutées au surnageant. Le tout  
est ajusté à 50 ml de façon à ce que le titre final de la soude  
soit de 0,1 N.

Puis 0,3 ml de réactif de Folin dilué de moitié dans de l'eau distillée sont introduits. Après agitation immédiate, puisque le réactif de Folin est instable à pH alcalin et peut donc être détruit avant d'avoir agi avec le complexe protéine-cuivre, le tout est laissé 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Les absorbances sont mesurées à 750 nm.

Le calcul de la concentration en protéines des échantillons est effectué à partir d'une gamme étalon de sérum albumine bovine à 50 µg/ml, pour la solution mère.

### 3) Dosage du nitrate

Le dosage du nitrate est effectué selon la méthode de YOUNG (1973). Il consiste en une réduction quantitative du nitrate en nitrite par de la poudre de zinc métallique en milieu ammoniacal.

300 mg de tissus lyophilisés et broyés sont mis en suspension dans 6 ml d'eau distillée et portés au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. 3 ml de la solution sont prélevés, auxquels sont ajoutés 6 ml de  $\text{NH}_4 \text{OH}$  2,2 N ainsi que 90 mg de poudre de zinc (Merck 8789). Après une agitation vigoureuse de 3 minutes, le zinc est décanté et 3 prélèvements de 2 ml de la solution sont effectués afin de doser le nitrite selon la méthode précédente. Chaque dosage est répété 3 fois.

Tableau 1 : Activité de la nitrate réductase de plantules récoltées en champ à différents stades de développement.

Critères	Activité NR dans					
	Racines secondaires	Racines pivotantes		Feuilles externes	Feuilles internes	cotylédons
26è jour 3 feuilles R <sub>c</sub> ø : 2 mm LR : 2,8 cm		0,506 ± 0,082		0,064 ± 0,018	0,268 ± 0,056	0,096 ± 0,026
40è jour 6 feuilles R <sub>c</sub> ø : 4,23 mm LR : 6,5 cm	0,507 ± 0,112	0,145 ± 0,018		0,319 ± 0,048	0,436 ± 0,052	
53è jour 10 feuilles R <sub>c</sub> ø : 6,51 mm LR : 7,6 cm		0,170 ± 0,028		0,419 ± 0,042	0,682 ± 0,032	
62è jour 13 feuilles R <sub>c</sub> ø : 10,8 mm LR : 11,8 cm		collet	pointe			
		0,051 ± 0,012	0,035 ± 0,006	0,423 ± 0,068	0,600 ± 0,086	
120è jour fin d'année de végétation R <sub>c</sub> ø : 3 cm LR : 16 cm	0,237 ± 0,024	0,020 ± 0,002	0,010 ± 0,002	0,396 ± 0,060	0,539 ± 0,056	

L'activité enzymatique est exprimée en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$  et représentée par la moyenne. L'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n=9).

R<sub>c</sub> ø : Diamètre de la racine au collet

LR : Longueur de la racine

# RESULTS

## I - L'ENDIVE EN CHAMP.

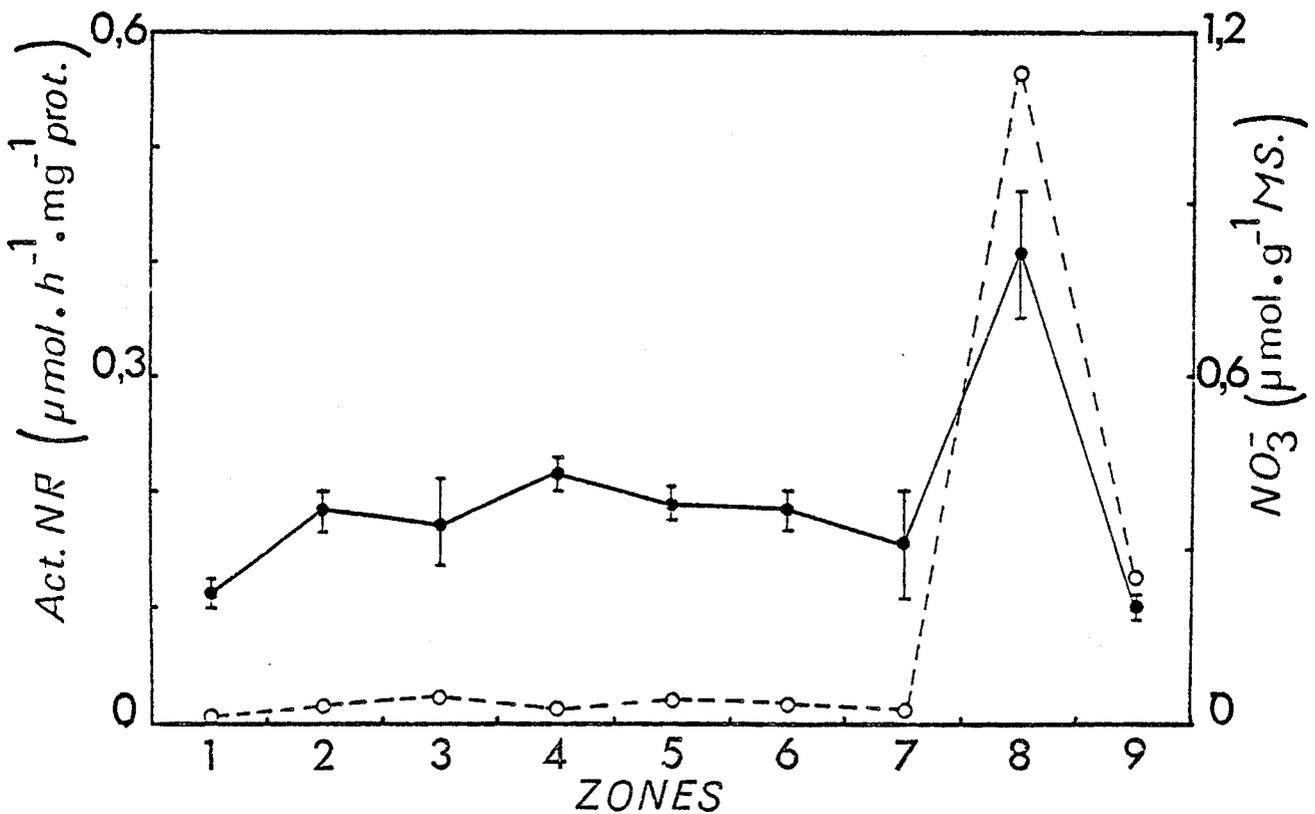
### 1) Activité de la nitrate réductase dans les différents stades des plantes en champ.

Les plantes, récoltées en champ juste avant les expériences sont lavées à l'eau distillée. Des échantillons de 6 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur sont prélevés dans les racines et de 6 mm de diamètre dans les feuilles, à raison d'environ 800 mg pour les racines et 200 mg pour les feuilles vertes. L'activité de la nitrate réductase est mesurée à différents stades de développement des plantes : stade 3 feuilles (racine non conique, non tubérisée ; 26<sup>e</sup> jour), stade 6 feuilles (40<sup>e</sup> jour), stade 10 feuilles (53<sup>e</sup> jour), stade 13 feuilles (62<sup>e</sup> jour) et stade fin d'année de végétation (120<sup>e</sup> jour). A partir du 40<sup>e</sup> jour, la racine est bien tubérisée et les caractéristiques morphologiques sont données dans le tableau 1.

Dans les racines pivotantes, l'activité enzymatique diminue avec l'âge et la maturité de la plante. Dans les racines secondaires jeunes, l'activité mesurée est toujours supérieure à celle de la racine tubérisée (5 à 10 fois plus élevée). Les feuilles vertes, les plus jeunes (internes) ont toujours plus d'activité que les plus âgées (externes) alors que les cotylédons présents dans les jeunes plantes (26<sup>e</sup> jour) ont une activité faible mais supérieure à celle des feuilles âgées et inférieure à celle des feuilles jeunes. De plus dans le cas des feuilles, l'activité de réduction augmente avec l'âge et la maturité des plantes pour se stabiliser à un taux élevé, en fin de première année de végétation.

Nous remarquons donc que seuls les tissus jeunes présentent une forte activité enzymatique, que ce soit dans les racines ou dans les feuilles. De plus, lorsque les racines ne présentent plus qu'une faible activité de la nitrate réductase, les feuilles, quant à elles, sont très actives. Il existe donc un relais dans la réduction nitrique entre les racines et les feuilles, puisqu'à une forte activité dans les racines correspond une faible activité dans les feuilles et inversement.

Fig. 1 : Activité de la nitrate réductase (—●—) et teneur en nitrate (---○---) d'une racine de *C. intybus* en fin de première année de végétation.



Les mesures sont effectuées dans des explants prélevés à différents niveaux de la racine. Le chiffre 1 représente la pointe de la racine, le chiffre 9 la région du collet. L'activité enzymatique est représentée par la moyenne et l'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n=9).

TABLEAU 2 : *Activité de la nitrate réductase et teneur en nitrate des feuilles vertes d'endive en fin de première année de végétation.*

Matériel	Activité NR	
	$\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$ )	( $\mu\text{mol NO}_2^-.\text{h}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{prot.}$ )
Feuilles externes		
partie distale	0,066	1,68 $\pm$ 0,40
partie proximale	0,016	0,94 $\pm$ 0,20
Feuilles internes		
partie distale	0,067	1,58 $\pm$ 0,30
partie proximale	0,062	1,18 $\pm$ 0,40

Les résultats de l'activité enzymatique sont exprimés par la moyenne et l'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n = 9).

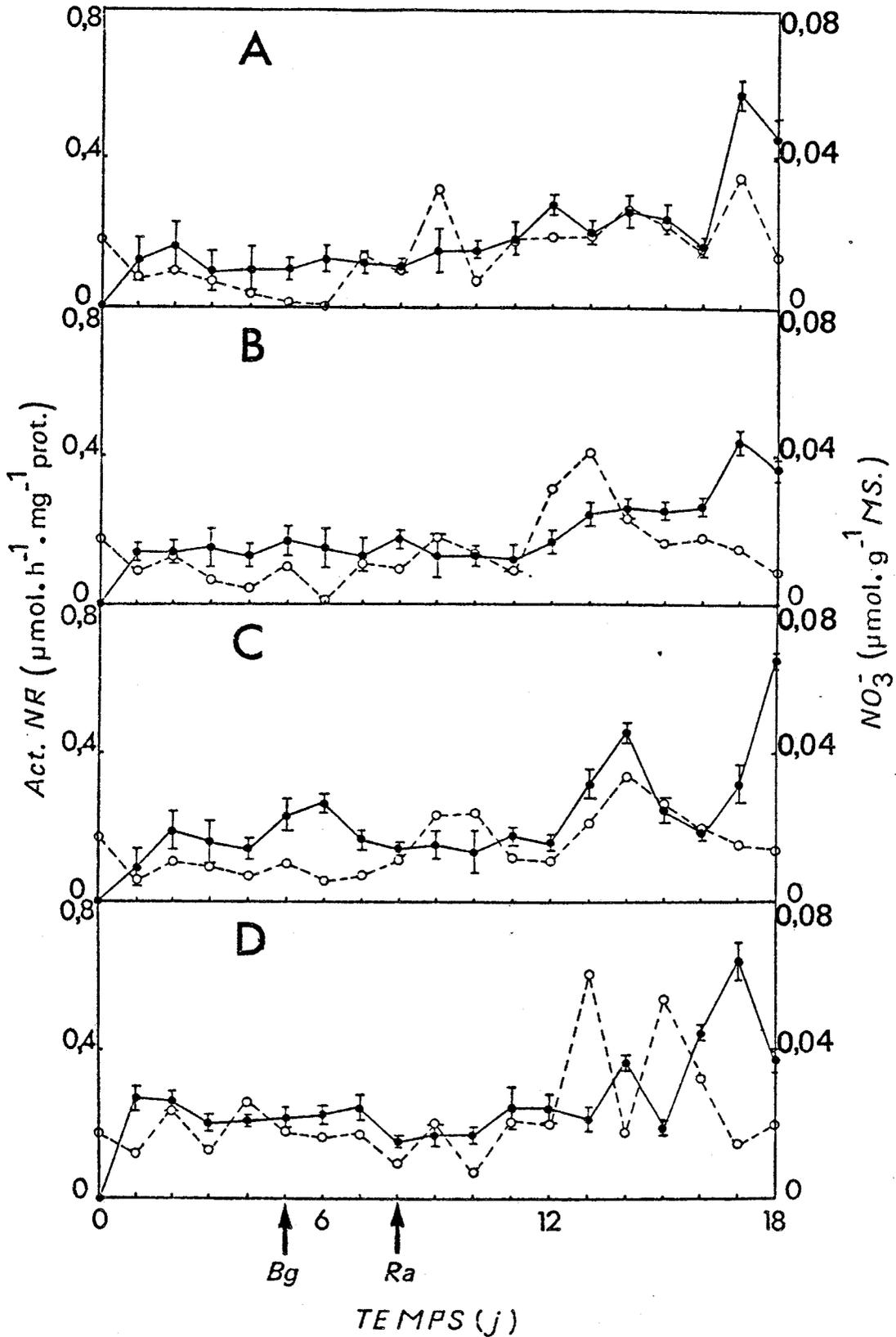
2) Activité de la nitrate réductase et teneur en nitrate dans les plantes en fin de première année de végétation.

Les racines sont lavées, rincées à l'eau distillée puis coupées en tranches de 2 à 3 cm d'épaisseur. Dans chaque zone, des cylindres de 6 mm de diamètre, sont prélevés à l'aide d'un trocart puis découpés en disque de 2 mm d'épaisseur (LIN et KAO, 1979). Dans ces racines l'activité de la nitrate réductase est faible et uniformément répartie, sauf dans la zone la plus proche du collet où elle est 4 fois plus importante. Le dosage du nitrate, effectué dans les mêmes zones, montre que sa teneur est élevée là où l'activité de réduction du nitrate est la plus forte (fig. 1). Il existe donc dans la racine tubérisée, une relation étroite entre la quantité de nitrate qu'elle contient et l'activité de la nitrate réductase.

Les feuilles, après être lavées sont réparties en deux lots, le premier constitué par les plus externes donc les plus âgées, le second par les plus internes, plus jeunes. Dans chacun de ces lots, 10 disques de 6 mm de diamètre sont prélevés au hasard, soit dans la partie proximale des feuilles (pétiole et portion du limbe la plus proche du collet) soit dans la partie distale de la lame foliaire. Dans ces feuilles vertes, l'activité de réduction du nitrate est globalement équivalente dans les feuilles jeunes et dans les feuilles âgées. Elle est cependant toujours plus élevée dans la partie distale que proximale (tableau 2). Le nitrate, par contre, est plus abondant dans les limbes jeunes que dans les limbes âgés et dans la partie distale que dans la partie proximale des feuilles âgées.

Donc, dans les tissus foliaires comme dans les racines tubérisées, l'activité de la nitrate réductase est la plus intense là où le contenu en nitrate est le plus élevé. Cependant l'activité de la nitrate réductase est environ 6 fois plus importante dans les feuilles que dans les racines ( $1,3$  et  $0,2 \mu \text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  Protéines, respectivement) bien que la teneur en nitrate de ces dernières soit  $0,05$  et  $0,166 \mu \text{mol. NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1}$  MS, respectivement.

Fig. 2 : Activité de la nitrate réductase (—●—) et teneur en nitrate (---○---) de racines d'endive soumises au forçage.



Les racines ont été coupées en 4 parties (A : zone du collet ; B : partie médiane supérieure ; C : partie médiane inférieure ; D : pointe de la racine). Les flèches (Bg) et (Ra) indiquent le moment de l'apparition soit des bourgeons étiolés soit des racines secondaires. L'activité enzymatique est représentée par la moyenne et l'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n=9).

## II - L'ENDIVE EN FORCAGE.

### 1) Activité de la nitrate réductase et teneur en nitrate au cours du forçage, dans les racines pivotantes.

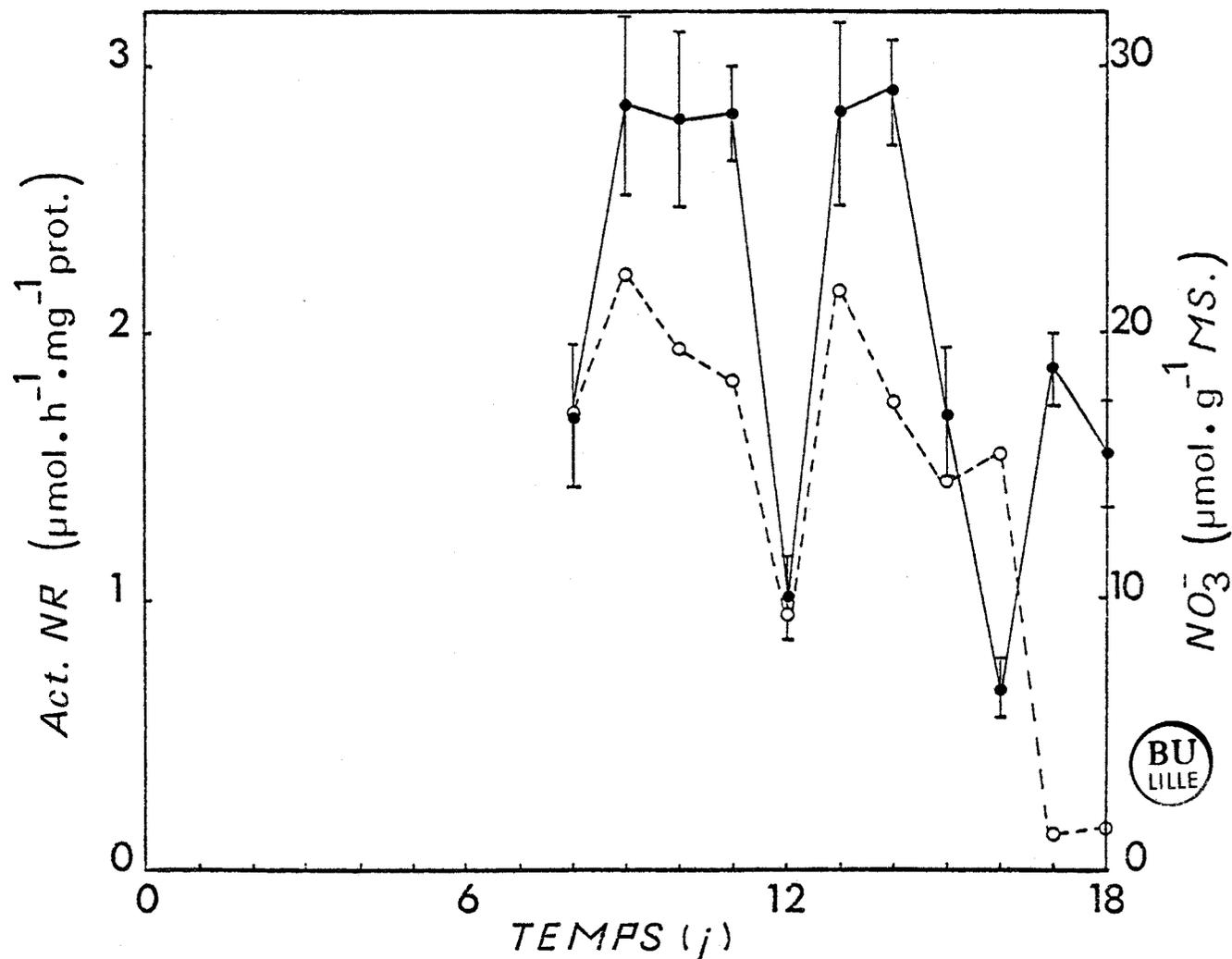
Au cours de l'arrachage les plantes sont défoliées. Les racines sont conservées, soit dans un hangar à la température ambiante, soit dans une chambre froide maintenue à 4° C. Dans ces conditions, l'activité de la nitrate réductase devient nulle et la teneur en nitrate est faible (0,017  $\mu$  mol.  $\text{NO}_3^-$ .  $\text{g}^{-1}$  MS). Entre l'arrachage et la mise en forçage, la teneur en nitrate baisse environ de 90 %. Cette perte est vraisemblablement liée aux traumatismes que constituent l'arrachage et l'ablation des feuilles. On sait en effet qu'une fuite importante du nitrate apparaît lors de l'ablation de la partie aérienne de la plantule de blé (MINOTTI et JACKSON, 1970).

Après leur mise en forçage, les racines pivotantes sont prélevées chaque jour à la même heure, rincées à l'eau distillée et découpées en 4 tronçons sur lesquels sont prélevés des disques comme décrit précédemment.

L'activité de réduction du nitrate apparaît dès les premiers jours dans toute la racine mais surtout dans la pointe qui trempe constamment dans la solution nutritive (fig. : 2 A, B, C et D). Elle se maintient ensuite à un taux sensiblement constant pendant une dizaine de jours. Elle augmente globalement vers la fin du forçage et présente des oscillations dans la pointe racinaire (fig. 2 D). Quant au nitrate, sa teneur reste approximativement constante dans la moitié inférieure de la racine pendant les 7 premiers jours du forçage (fig. 2 C et D). Puis elle manifeste des fluctuations particulièrement nettes dans la zone de la pointe (fig. 2 D). Dans la partie supérieure de la racine, la teneur en nitrate a tendance à diminuer pendant les 6 premiers jours puis elle augmente ensuite en présentant de légères oscillations.

Les premiers jours du forçage de la racine tubérisée semblent donc s'accompagner d'une redistribution du nitrate dans la zone proche du collet, là où le bourgeon étiolé va se différencier. L'activité de la nitrate réductase n'est cependant pas sensiblement modifiée durant cette période, avec toutefois une mise en place de la nitrate réductase dans la pointe racinaire dès le premier jour.

Fig. 3 : Activité de la nitrate réductase (—●—) et teneur en nitrate (---○---) des racines secondaires dont la différenciation s'effectue lors du forçage.



L'activité enzymatique est représentée par la moyenne et l'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n=9).

TABLEAU 3 : *Distribution du nitrate dans les feuilles du bourgeon étiolé.*

Matériel	Teneur en $\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS)							
	5-11j	12j	13j	14j	15j	16j	17j	18j
partie distale	nd <sup>a</sup>	0,193	0,226	0,078	0,114	0,118	0	0
partie proximale	nd	0,245	0,694	0,144	0,182	0,209	0,118	0,064

<sup>a</sup> nd, non détectable

Il est par ailleurs remarquable que les oscillations de la teneur en nitrate et de l'activité de réduction surviennent peu de temps après l'apparition des premières racines secondaires.

2) Activité de la nitrate réductase et teneur en nitrate au cours du forçage dans les racines secondaires.

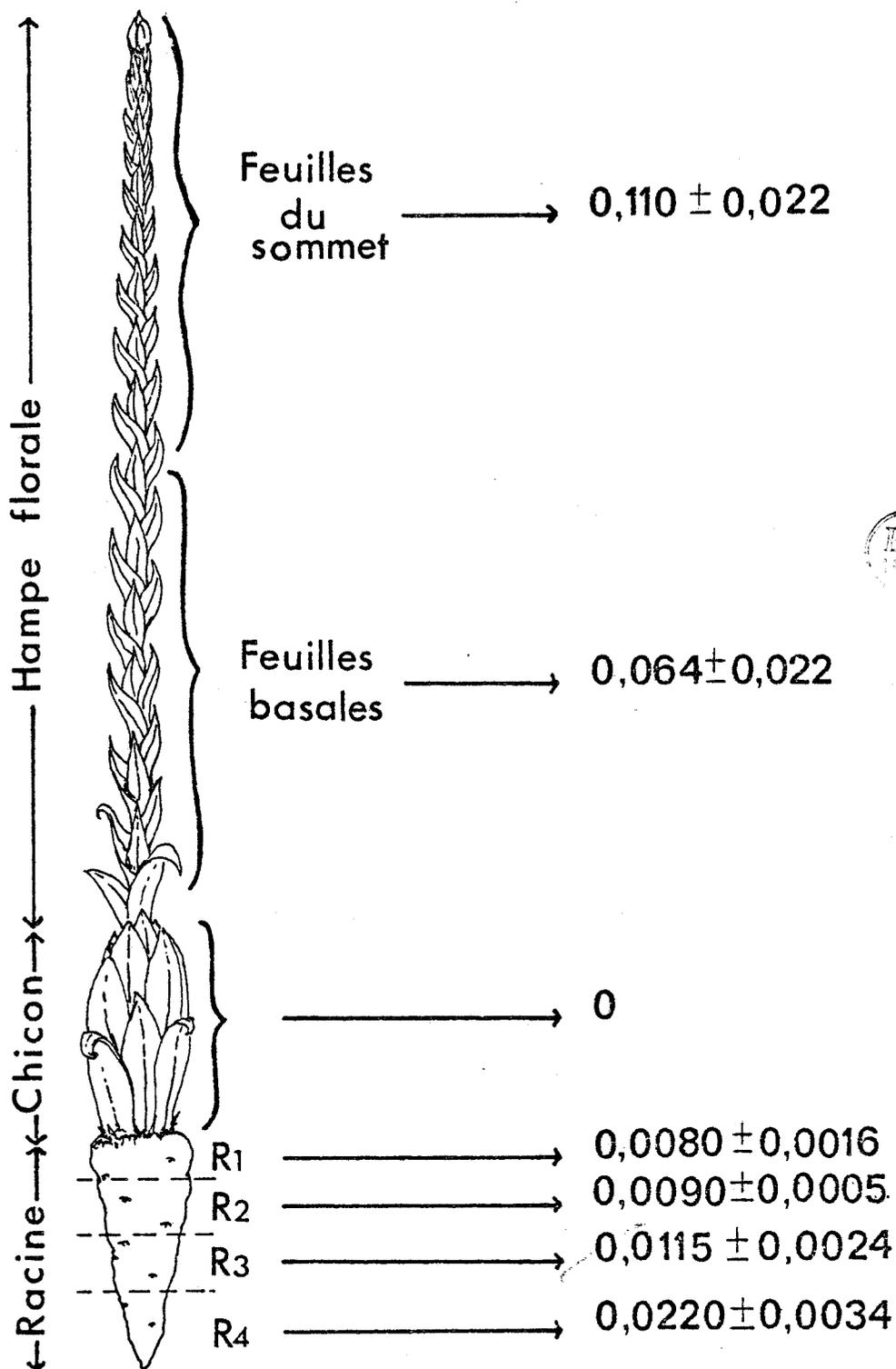
Dans les racines secondaires, qui apparaissent le long de la racine pivotante vers le 8<sup>e</sup> jour de la culture, l'activité de la nitrate réductase et la teneur en nitrate sont immédiatement très élevées (fig. 3). Dans ces jeunes racines secondaires, la fonction d'absorption est donc rapidement mise en place. Ici les variations de la teneur en nitrate, qui est 750 fois plus élevée que dans la racine pivotante, s'accompagnent de fluctuations de l'activité de la nitrate réductase, selon une périodicité sensiblement régulière.

3) Activité de la nitrate réductase et teneur en nitrate au cours du forçage dans les bourgeons étiolés

Dans les feuilles du bourgeon étioilé qui se développe à partir du 5<sup>e</sup>me jour de forçage, l'activité de réduction du nitrate est nulle tant dans les feuilles âgées que jeunes. Le transfert à la lumière de plantes ayant subi 18 jours de forçage provoque le verdissement des feuilles en 48 heures mais l'activité de la nitrate réductase reste nulle. Pour ce qui est du nitrate, les feuilles étioilées n'en contiennent pas en quantité décelable pendant les 7 premiers jours du développement puis elles en accumulent pendant quelques jours, surtout dans la partie proximale qui est épaisse et succulente. A la fin du forçage, la teneur en nitrate diminue dans l'ensemble de la feuille et surtout dans la partie distale (tableau 3).

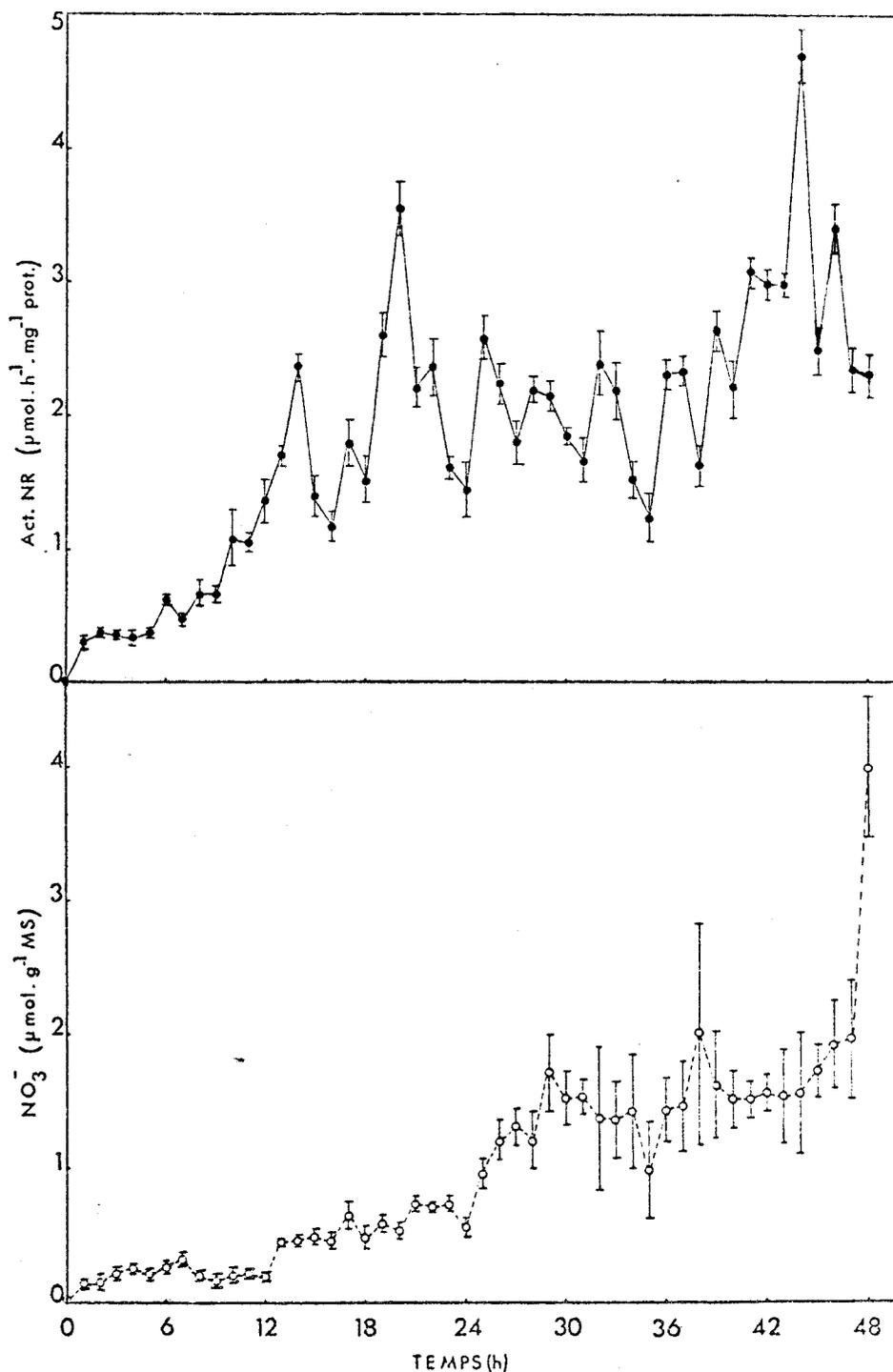
L'analyse de la répartition des ions nitriques dans les divers organes de la plante soumise au forçage montre qu'ils sont donc nettement plus abondants dans les racines secondaires ( $15 \mu \text{mol. NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$ ) que dans la racine pivotante ( $0,02 \mu \text{mol. NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$ ) ou les feuilles ( $0,1 \text{ à } 0,2 \mu \text{mol. NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$ ).

Schéma 1 : *Activité de la nitrate réductase dans une racine, forcée munie de son bourgeon étioilé , remise à la lumière.*



L'activité enzymatique est exprimée en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$  et représentée par la moyenne. L'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n=9).

Fig. 4 : Activité de la nitrate réductase (—●—) et teneur en nitrate (---○---) d'explants racinaires cultivés in vitro pendant 48 heures.



L'activité enzymatique et les taux de nitrate sont représentés par leur moyenne et les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5 % (n=9).

4) Activité de la nitrate réductase d'une plante provenant du forçage et comportant une hampe florale.

Des racines munies de leur chicon sont mises en serre et alimentées par une solution à  $3\text{g.l}^{-1}$  de nitrate de chaux, pendant 3 mois environ. A la fin de cette période, la hampe florale est bien développée. Les résultats obtenus sont représentés par le schéma 1.

Dans les racines, découpées en 4 tronçons comme précédemment, l'activité de la nitrate réductase est très faible et décroît de la pointe, trempant dans la solution nutritive, vers le collet.

Les feuilles qui constituaient le chicon sont devenues vertes et ne présentent aucune activité de réduction du nitrate.

Pour la hampe florale, 2 lots sont considérés : les feuilles de la base et celles du sommet de la hampe florale. Ces feuilles sont dures et rugueuses. L'activité enzymatique est deux fois plus élevée dans les feuilles du sommet (plus jeunes) que dans les feuilles de la base. De plus cette activité dans ces deux lots est respectivement 4 et 7 fois plus élevée que dans les racines. Donc à une faible activité de réduction du nitrate dans les racines correspond une forte activité dans les feuilles jeunes de la hampe florale.

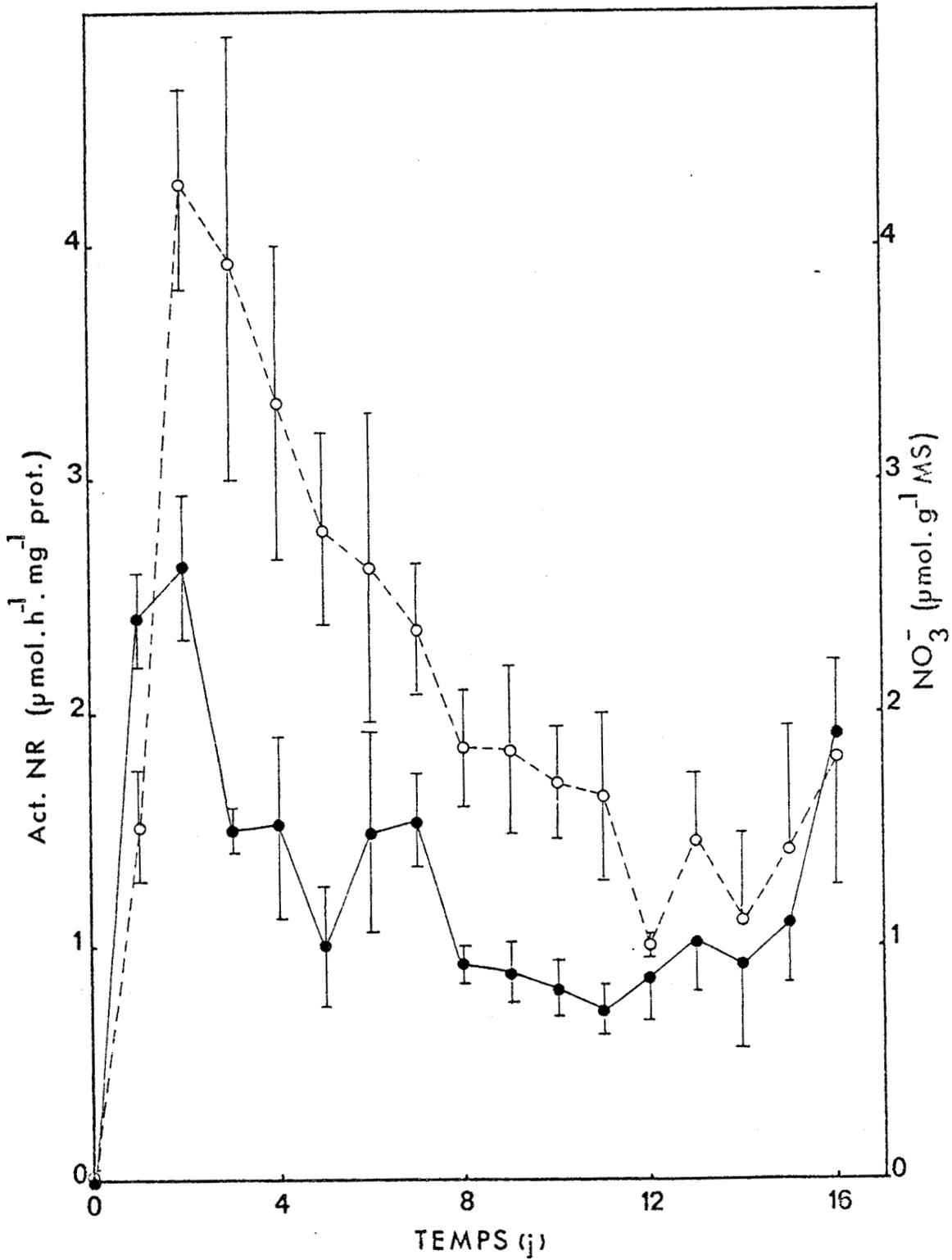
III - FRAGMENTS RACINAIRES CULTIVES IN VITRO.

1) Evolution de l'activité de la nitrate réductase et de la teneur en nitrate pendant les 48 premières heures de culture.

Des explants calibrés sont prélevés sur des racines ayant séjournées en chambre froide, ne présentant donc plus d'activité.

Leur mise en culture *in vitro* provoque dès la première heure l'apparition de l'activité de la nitrate réductase qui reste relativement stable pendant 6 à 7 heures puis augmente de façon importante jusqu'à la 14ème heure (fig. 4). Puis elle oscille selon une périodicité irrégulière et présente des maximums vers la 20ème et la 44ème heure. Considérée pendant une période de 48 heures, l'activité augmente globalement.

Fig. 5 : Activité de la nitrate réductase (—●—) et teneur en nitrate (---○---) d'explants racinaires cultivés in vitro pendant 16 jours.



L'activité enzymatique et les taux de nitrate sont représentés par leur moyenne et les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5 % (n=9)

Quant à la teneur en nitrate, elle reste faible pendant les 12 premières heures puis augmente légèrement jusqu'à la 14<sup>ème</sup> heure, pour devenir beaucoup plus importante pendant les 24 heures suivantes. L'évolution du taux de nitrate semble s'effectuer en 3 périodes successives qui pourraient correspondre à la mise en place de mécanismes d'absorption de l'ion nitrique.

Il faut remarquer qu'une faible teneur en nitrate suffit à provoquer l'apparition d'une activité de la nitrate réductase importante pendant la première phase de la culture. Mais qu'ensuite cette activité même si elle présente quelques oscillations, reste relativement stable malgré un taux de nitrate plus élevé. Pourtant dans les premières heures le nitrate a tendance à s'accumuler et l'activité de réduction est plus importante.

## 2) Evolution de l'activité de la nitrate réductase et de la teneur en nitrate pendant 16 jours de culture.

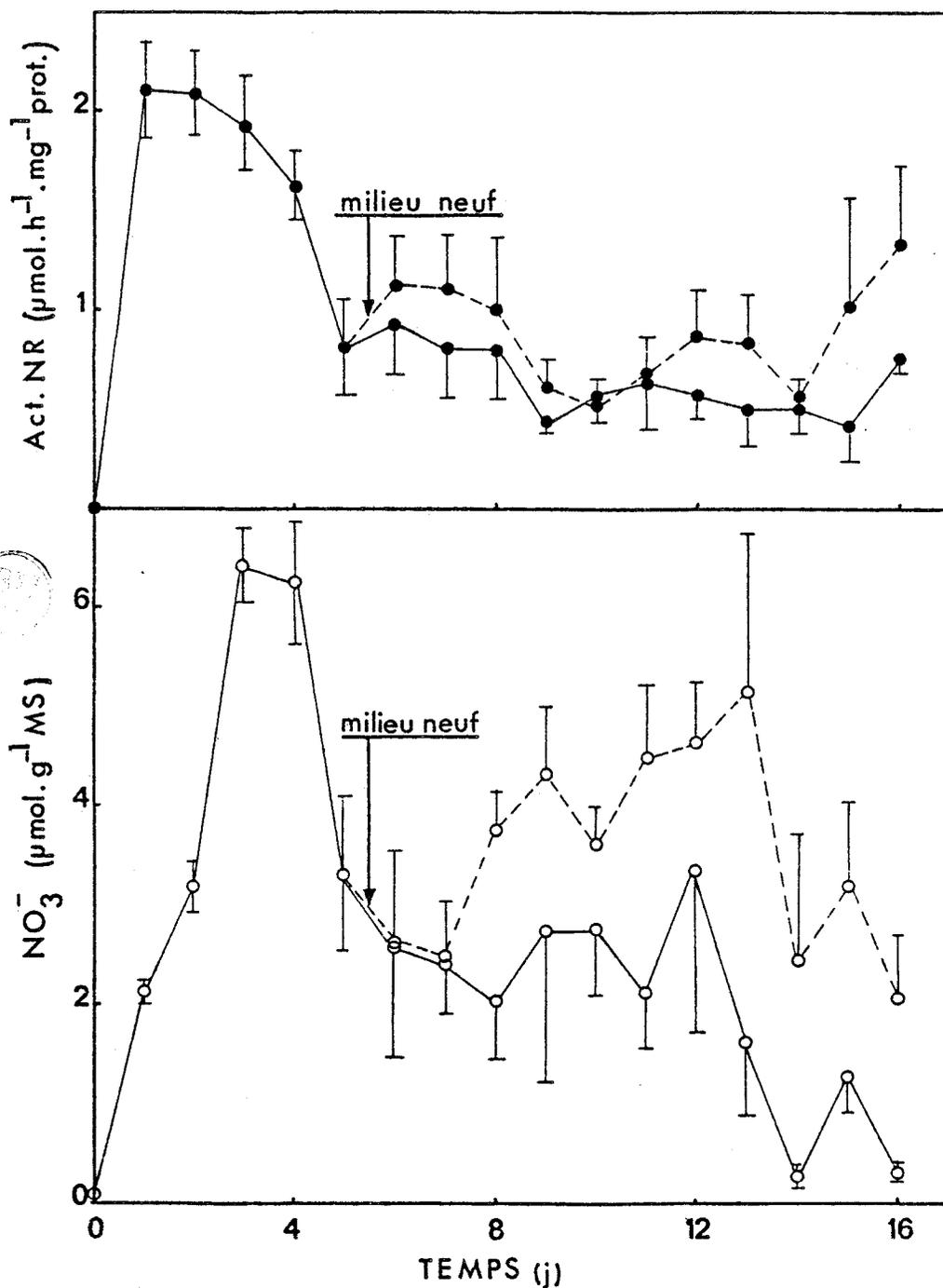
Des explants sont prélevés tous les jours à la même heure afin d'éviter les fluctuations qui ont été observées auparavant.

On s'aperçoit (fig. 5) que l'activité est maximale au 2<sup>ème</sup> jour de culture, puis qu'elle décroît très rapidement jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour. Elle reste ensuite relativement stable jusqu'à 14 jours de culture pour augmenter au 16<sup>ème</sup> jour.

En ce qui concerne le nitrate, sa teneur est maximale au 2<sup>ème</sup> jour puis tend à décroître régulièrement jusqu'au 16<sup>ème</sup> jour. Globalement l'activité de la nitrate réductase suit la teneur en nitrate qui ne s'accumule pas dans les explants.

On peut cependant remarquer qu'à 24 heures, le taux de l'activité de la nitrate réductase est supérieur à la teneur en nitrate du tissu alors que par la suite la courbe de la teneur en nitrate passe toujours au dessus de celle de l'activité, sauf en fin de culture.

Fig. 6 : Activité de la nitrate réductase (●) et teneur en nitrate (○) d'explants racinaires cultivés in vitro pendant 16 jours et transplantés au 5ème jour sur un milieu neuf (---) ou non (—).



L'activité enzymatique et les taux de nitrate sont représentés par leur moyenne et les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5 % (n=9).

3) Expérience de réinduction de l'activité de la nitrate réductase après 5 jours de culture.

Les explantats sont cultivés pendant 5 jours sur le milieu de HELLER (1953) de façon à provoquer l'apparition de l'activité de réduction puis ils sont transplantés à une période où cette activité est en baisse (Fig.6).

Alors que la teneur en nitrate ne se modifie pas pendant 2 jours, l'activité de la nitrate réductase augmente dans les 24 heures qui suivent le transfert, et se maintient pendant 3 jours avant de diminuer. Elle augmente de nouveau vers la fin de la culture alors que le taux de nitrate augmente dans les tissus transplantés.

On observe donc une phase de latence apparente dans l'augmentation de la teneur en nitrate alors que l'activité augmente très rapidement. Dans ces conditions expérimentales, l'entrée du nitrate ne semble pas s'effectuer par palliers successifs comme nous l'avons remarqué précédemment. Ceci peut être dû au fait que les explants sont transférés dans un milieu neuf sans subir de traumatismes.

4) Comparaisons des expériences faites sur les fragments racinaires.

Les tissus de la racine d'endive ne constituent pas des centres d'accumulation du nitrate lorsqu'ils sont cultivés *in vitro* (Fig. 4, 5 et 6). En effet on remarque que l'évolution de l'activité de réduction suit de façon parallèle la teneur en nitrate. Cependant nous avons vu que dans certains cas (Fig. 5), la teneur en nitrate est supérieure à l'activité de réduction à un moment donné. Pourtant il semble bien que chez l'endive, il ne se constitue pas de pool d'accumulation du nitrate, non accessible à la réduction puisqu'en fin de culture l'activité excède la teneur en nitrate. D'autre part au moment de la mise en culture, de très faibles taux de nitrate suffisent à induire des activités importantes. Il apparaît donc que l'activité de la nitrate réductase soit liée aux flux d'entrée de nitrate plus qu'à sa teneur globale. Ceci rejoint

Tableau 4 : Pourcentage de cals et bourgeons néoformés sur des explants foliaires, cultivés in vitro, en fonction des conditions de stérilisation.

	Stérilisation (Conditions)	Temps (min)	Milieu de culture	Cals (%)	Bourgeons (%)
hypochlorite de calcium	70g/l	25	HELLER	0	0
		90g/l	25	HELLER	0
	150g/l	20	HELLER	43	0
			HELLER	43	0
			HELLER	56	0
		40	HELLER	35	17
			M.S.	40	33
		10+5 (alc)	HELLER	20	8
	M.S.		31	17	
	20+5 (alc)		HELLER	20	12
		M.S.	33	17	
	40+5 (alc)	HELLER	41	17	
		M.S.	57	28	
200g/l		15	HELLER	10	4
	30	HELLER	13	4	
	45	HELLER	35	25	
hypchlorite de calcium	150g/l	40	HELLER	55	15
Chlorure mercurique	1°/∞	5	HELLER	47	7
Alcool + hypochlorite de calcium	70 %	5	M.S.	62	27
	150g/l	40			

Les Pourcentages sont calculés sur 48 échantillons.

M.S. : milieu de MURASHIGE et SKOOG

les observations de SHANER et BOYER (1976 a) et de HEIMER et FILNER (1971). De la même façon, les expériences de transplantation après 5 jours de culture indiquent là encore que de faibles modifications de la teneur en nitrate amènent une reprise de l'activité de réduction. Comme l'entrée du nitrate ne semble pas s'effectuer par paliers, on peut penser que les systèmes d'absorption nitrique restent en place et sont stimulés par la transplantation .

L'absorption du nitrate pendant les premières heures de la culture constitue vraisemblablement un phénomène très complexe. Elle pourrait exiger la synthèse des systèmes d'absorption. Cela demanderait à être vérifié par des expériences faisant appel à l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique.

D'une façon générale, il apparaît bien que chez l'endive le nitrate constitue l'inducteur de l'activité de la nitrate réductase. Cependant là encore pour déterminer si l'on a affaire à une synthèse il faudrait utiliser des inhibiteurs de la traduction et de la transcription ou recourir à des études immunologiques.

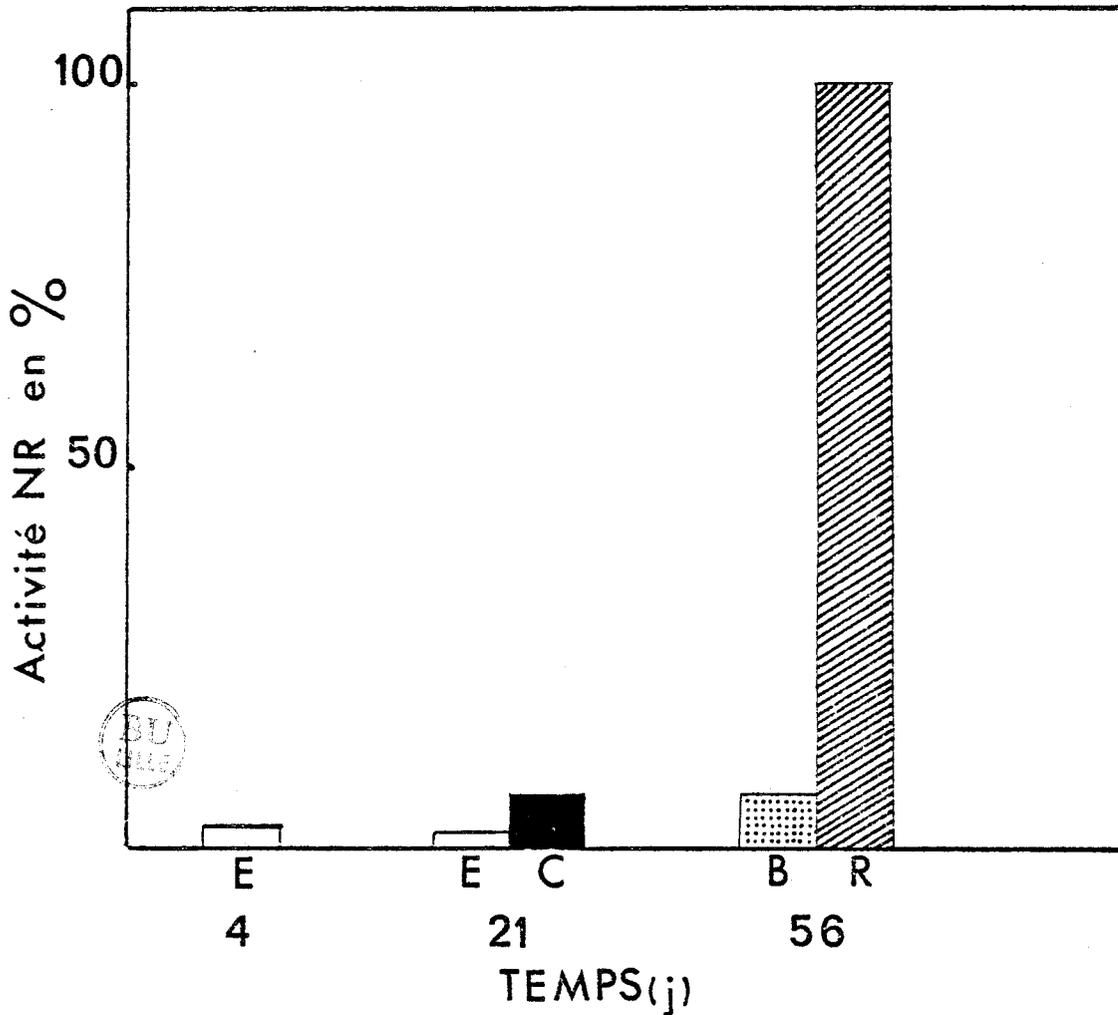
#### IV - FRAGMENTS DE FEUILLES ETIOLEES CULTIVES IN VITRO.

Nous avons vu précédemment que les feuilles étiolées obtenues au cours du forçage ne présentent pas d'activité de la nitrate réductase. Comme des tissus foliaires peuvent être mis en culture et présenter des phénomènes d'organogénèse, nous avons voulu voir si ces fragments étaient susceptibles d'être le lieu de réduction du nitrate ou si cette activité de réduction se retrouvait dans les organes néoformés.

##### 1) La stérilisation.

Bien que la méthode de préparation et de mise en culture de fragments de feuilles soit classique au laboratoire (VASSEUR, 1979 a et b), les difficultés rencontrées pour renouveler les expériences avec la variété zoom nous ont amenés à préciser les techniques pour ce matériel (Tableau 4).

Fig. 7 : Activités de la nitrate réductase, exprimées en pourcentage, à différents stades de la culture in vitro d'explants de feuilles étiolées d'endive.



4ème jour : stade explantat (E) ; 21ème jour : stade cal avec l'explantat (E)  et le cal (C)  ; 56ème jour : stade bourgeon (B) et racine (R) :  Bourgeon  Racine.

100 % d'activité correspond à  $3,629 \mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF.}$

Schéma 2 : Localisation du cal et du bourgeon néoformés dans des explants de feuilles étiolées, mis en culture.

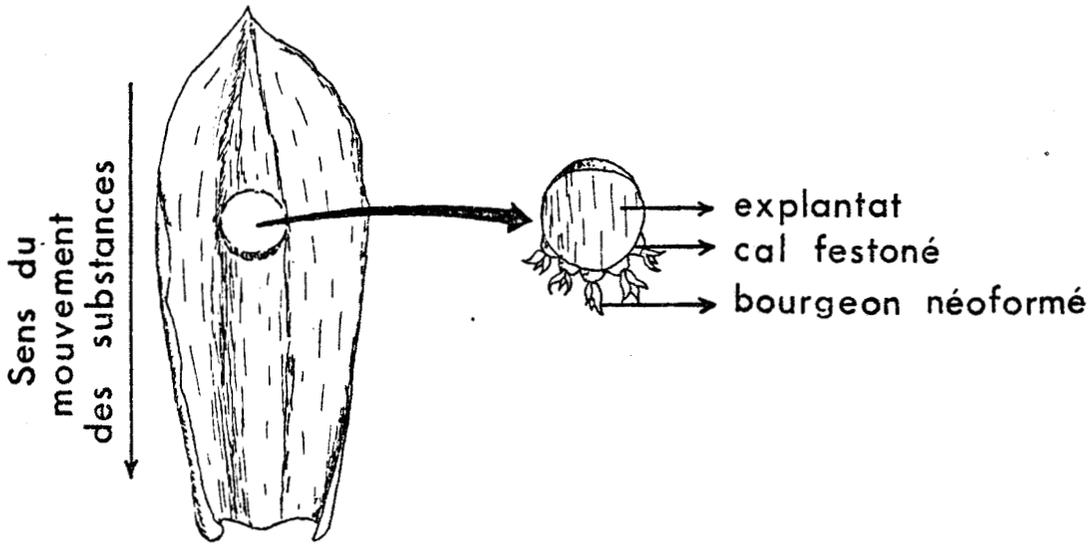
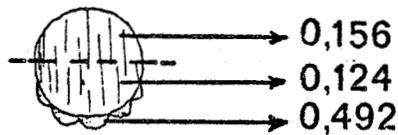


Schéma 3 : Activité de la nitrate reductase dans les différentes zones d'explantats foliaires munis d'un cal.



L'activité enzymatique est exprimée en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  MF.

Les concentrations habituelles d'hypochlorite de calcium ne donnant pas de résultats satisfaisants, nous avons essayé différentes concentrations d'hypochlorite de calcium et différents temps de stérilisation, ainsi que d'autres désinfectants et d'autre milieu de culture.

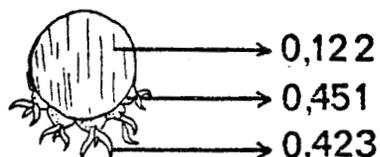
Des solutions de chlorure mercurique à 1°/°. provoquent la nécrose des tissus et d'autre part des traitements par l'éthanol à 70 % suivis par des bains d'hypochlorite permettent d'obtenir des cals mais freinent l'apparition des bourgeons. Finalement l'utilisation de l'hypochlorite de calcium à 150 g.l<sup>-1</sup> pendant 40 minutes donnent les meilleurs résultats lorsque les explantats sont cultivés sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962).

2) Activité de la nitrate réductase à différents stades dans les explantats foliaires cultivés *in vitro*.

Les difficultés que nous avons rencontrées pour la culture des fragments foliaires, ne nous ont pas permis de suivre l'évolution de l'activité de la nitrate réductase au cours d'un cycle de culture. Nous avons donc analysé l'activité dans les explantats, les cals, les bourgeons et les racines néoformés, à trois stades différents (Fig. 7).

Après 4 jours de culture (stade "explantat") l'activité est mesurée dans les disques foliaires : elle est présente mais très faible (Fig. 7). Au 21ème jour de culture un cal apparaît dans la partie proximale de l'explantat, (schéma 2). L'activité est en général plus élevée dans le cal néoformé que dans l'explantat foliaire (Fig. 7). En plus, les disques sont divisés en 3 parties : le cal, la moitié proximale et la moitié distale de l'explant (schéma 3). L'activité est la plus importante dans le cal néoformé et demeure sensiblement identique dans les 2 parties du disque initial. Après 56 jours de culture, des bourgeons et des racines se sont différenciés à partir des cals qui se nécrosent. C'est dans les racines néoformées que l'activité de la nitrate réductase est la plus importante (Fig. 7). Cependant, dans les feuilles des bourgeons néo-

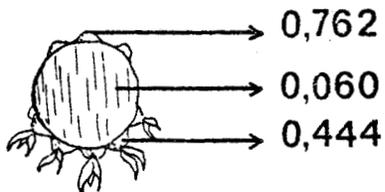
Schéma 4 : *Activité de la nitrate réductase dans les différentes parties d'explantats munis d'un cal et de bourgeons néoformés.*



L'activité enzymatique est exprimée en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  MF.



Schéma 5 : *Activité de la nitrate réductase dans les cals organogènes et non organogènes produits par des explants foliaires.*



L'activité enzymatique est exprimée en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  MF.

formés, apparaît une faible activité de la nitrate réductase, sensiblement égale à celle que l'on observe dans les cals au 21ème jour. Ce même phénomène est retrouvé lors de l'apparition des bourgeons sur les cals (Schéma 4).

Dans certains cas sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962), nous avons noté, en plus des cals qui se développent normalement dans la partie proximale de l'explant, l'apparition de cals dans la partie distale. Ces cals ne donnent jamais naissance à des bourgeons ni à des racines. Ils présentent une activité de la nitrate réductase importante (Schéma 5) qui est 1,7 fois plus élevée que celle du cal portant des bourgeons.

En conclusion, on remarquera que les fragments de feuilles ne présentant normalement pas d'activité de la nitrate réductase, en acquièrent lorsqu'ils sont excisés et transplantés sur un milieu contenant du nitrate. Cependant l'activité est toujours la plus forte dans les tissus jeunes et néoformés, ce qui rejoint les observations d'EVANS et NASON (1953) qui avaient montré que les tissus jeunes et métaboliquement actifs possèdent la plus grande capacité de réduire le nitrate.

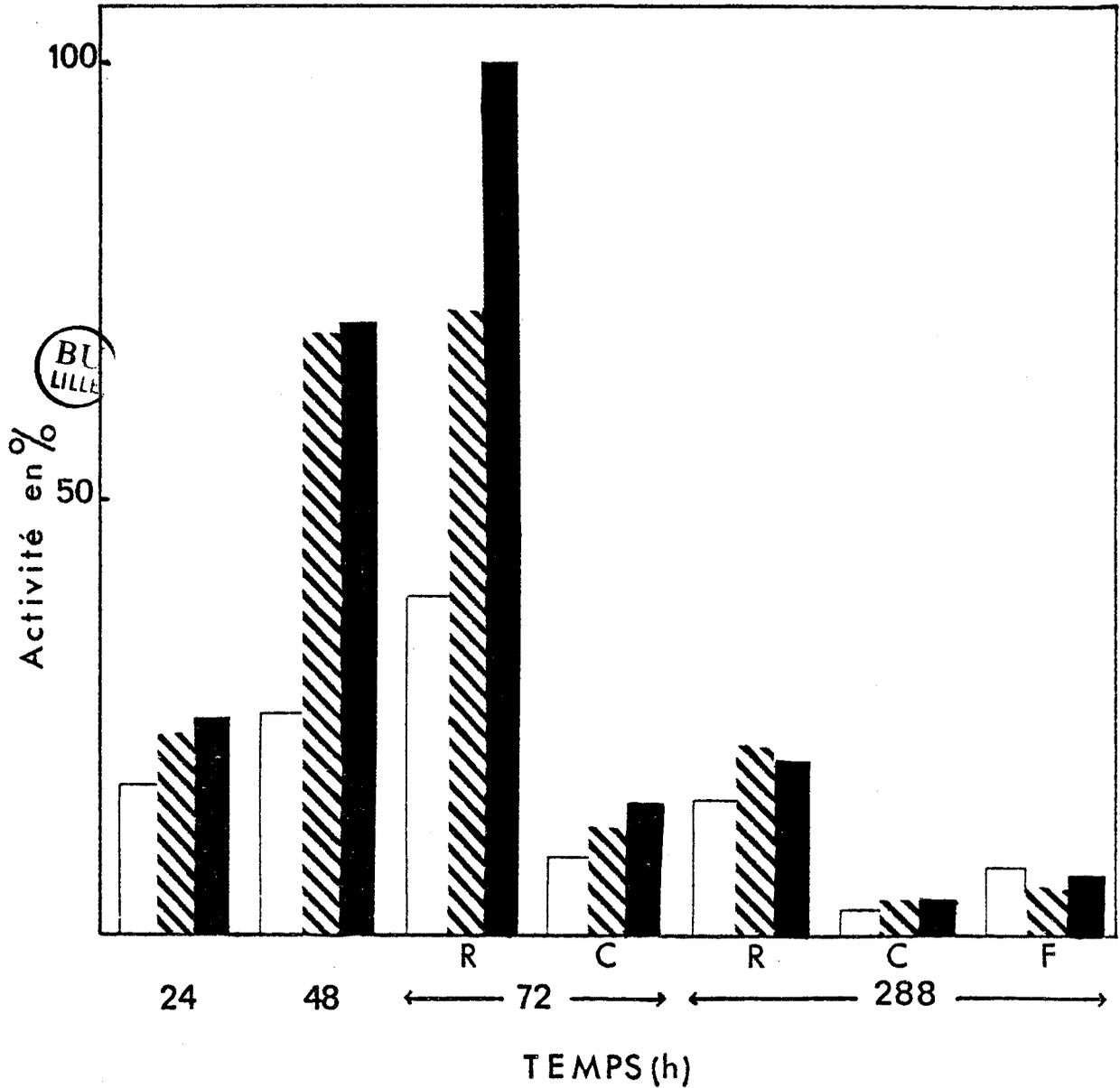
De plus parmi les organes néoformés, ce sont les racines qui ont l'activité la plus forte puisqu'elle est 14 fois supérieure à celle des bourgeons.

#### V - ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE DANS LES GRAINES ET LES PLANTULES D'ENDIVES.

Dans la mesure où l'activité de la nitrate réductase est importante dans les racines néoformées et dans les racines secondaires qui apparaissent sur la racine principale au cours du forçage, nous avons voulu voir comment l'activité se répartirait dans les différents organes qui se différencient lors de la germination d'une graine.

Comme il a été indiqué dans le chapitre Matériel et Méthodes, plusieurs solutions ont été utilisées pour l'imbibition des graines et le développement des plantules, à savoir une solution de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $4 \text{H}_2\text{O}$ , identique à celle utilisée pour le forçage,

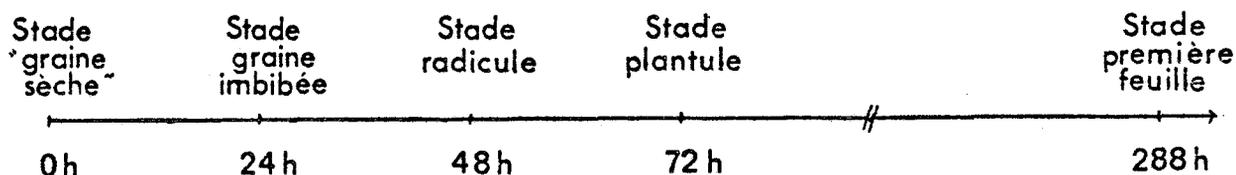
Fig. 8 : Activité de la nitrate réductase dans des graines et des plantules d'endive soumises à différentes solutions.



témoin eau ;       solution de HELLER ;  
 solution de Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O (3g. l<sup>-1</sup>)  
 24 h : stade graine imbibée ; 48 h : stade radicule ;  
 72 h : stade plantule ; 288 h : stade première feuille.  
 R : racine      C : cotylédon      F : feuille.  
 100 % d'activité correspond à 1,367 μmol. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. h<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup> MF.

une solution de HELLER (milieu des cultures *in vitro* des fragments racinaires) enfin de l'eau distillée qui sert de témoin.

Lors de la culture nous observons différents stades selon le schéma suivant :



Le stade plantule est caractérisé par le développement des cotylédons, l'apparition de l'hypocotyle, l'élongation et la ramification de la radicule.

Les graines non imbibées ne présentent aucune activité de la nitrate réductase qui apparaît après 24 h d'imbibition (Fig. 8). Quelle que soit la solution d'imbibition utilisée, l'activité est sensiblement égale mais cependant légèrement plus faible pour l'eau. Ceci montre que l'entrée d'eau seule dans la graine suffit à déclencher l'activité de réduction qui doit vraisemblablement s'effectuer aux dépens du nitrate endogène. En effet l'apport d'ions nitriques dans la solution n'augmente que très faiblement l'activité de la nitrate réductase.

Lors des stades ultérieurs, la situation se modifie beaucoup. En effet, lorsque la radicule se développe (stade radicule) l'apport de nitrate exogène provoque un accroissement important de l'activité. Cet effet favorable du nitrate se retrouve au stade suivant où les cotylédons se déploient (stade plantule). A ce moment, cependant l'activité reste essentiellement localisée dans les racines, quelque soit la solution nutritive utilisée. Au stade première feuille qui est caractérisé par l'apparition des deux premières feuilles qui se développent en présence des cotylédons, l'activité reste plus

importante dans les racines, et la nature de la solution nutritive joue un rôle moins important.

La comparaison des activités aux stades radicule, plantule et première feuille, montre qu'elle est toujours plus importante dans les racines. Cependant au stade plantule l'apport d'une solution de nitrate de calcium provoque l'activité maximale alors qu'au stade radicule il n'existe aucune différence entre la solution de nitrate de calcium et la solution de HELLER. La différence de comportement entre la radicule et la racine ramifiée pourrait s'expliquer par la teneur différente en nitrate des deux solutions. La solution de HELLER étant en effet plus riche en nitrate, il se peut qu'il y ait un effet de saturation de l'enzyme par le substrat, plus net au stade plantule qui possède un système racinaire ramifié. Dans ces conditions, la solution de nitrate de calcium ne serait pas saturante ou moins saturante. Au stade radicule au contraire, le nombre de sites de réduction du nitrate est vraisemblablement plus réduit et les deux solutions pourraient exercer un effet de saturation sur l'enzyme. On pourrait aussi expliquer la différence de comportement par des phénomènes d'interactions ioniques dans la mesure où la solution de HELLER est plus riche en ions que la solution de nitrate de calcium.

Au cours du développement de la plantule lorsque les racines et les cotylédons vieillissent l'activité de la nitrate réductase diminue dans les deux types d'organes et de façon très spectaculaire dans les racines. A ce stade (stade première feuille) on voit apparaître l'activité dans les feuilles. Ceci montre qu'une partie du nitrate est transloquée dans le système foliaire où elle est réduite. A ce stade il existe donc deux systèmes de réduction qui cohabitent dans deux organes différents.

#### VI - COMPARAISON DE L'ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE DANS DES PLANTULES ET DES JEUNES PLANTS NEOFORMES.

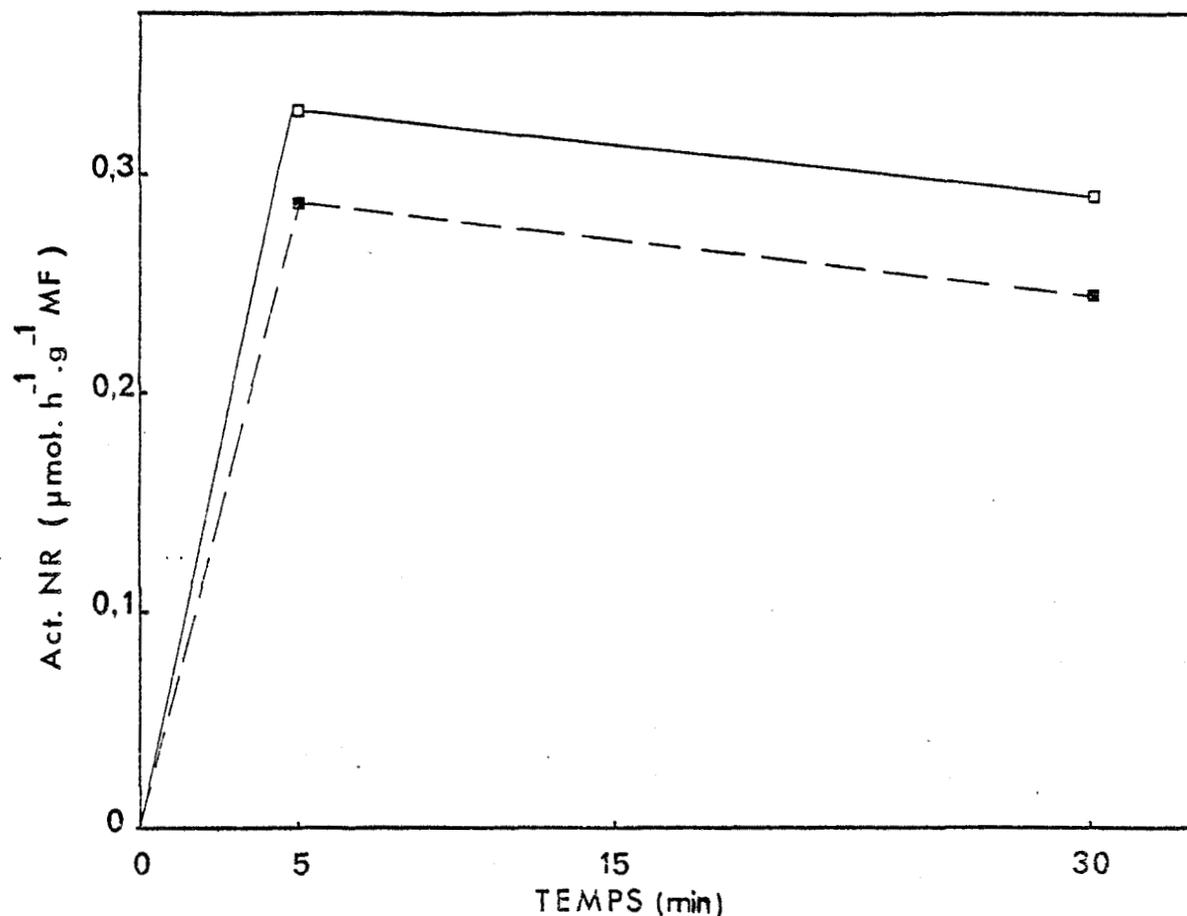
Nous avons vu jusqu'à présent que l'essentiel des activités dans les tissus jeunes était souvent localisé au niveau des racines. Nous avons donc comparé l'activité de réduction dans des plantules issues de germinations et dans des jeunes plants qui

Tableau 5 : Activité de la nitrate réductase dans les plantules et les jeunes plants néoformés. Comparaison des méthodes *in vivo* et *in situ*.

		Méthode " <i>in situ</i> "	Méthode " <i>in vivo</i> "
Plantes provenant de feuilles étiolées cultivées <i>in vitro</i>	Feuilles	0,028 ± 0,004	0,035 ± 0,006
	Racines	0,122 ± 0,018	0,391 ± 0,024
Plantules provenant de germination de graines	Feuilles cotylédonnaires	0,152 ± 0,012	0,049 ± 0,003
	Racines	0,396 ± 0,020	0,655 ± 0,034
Plantes provenant d'explantats racinaires cultivés <i>in vitro</i>	Feuilles	0,027 ± 0,004	0,069 ± 0,001
	Racines	0,068 ± 0,001	0,105 ± 0,016

L'activité enzymatique est exprimée en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$  et représentée par la moyenne. L'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n=9).

Fig. 9 : Activité de la nitrate réductase, mesurée *in vivo*, en présence (---■---) ou en absence (—□—) de propanol, en fonction de la durée d'incubation.



se différencient à partir de tissus de feuilles ou de racines cultivés *in vitro*.

Dans les plantules ou les plants issus de feuilles étiolées, l'activité de la nitrate réductase demeurent toujours plus élevée dans les racines. Cependant alors que les activités dans les feuilles sont sensiblement identiques, celles des racines sont plus faibles lorsqu'elles sont néoformées (Tableau 5). Dans les plants issus d'explants racinaires, l'activité de la nitrate réductase est toujours plus élevée dans les racines que dans les feuilles.

Mais l'activité de réduction du nitrate des racines de graines mises à germer est toujours plus forte que celle mesurée dans les racines des plantes néoformées.

De plus nous avons voulu voir si l'activité mesurée reflétait la situation réelle dans ces différents organes. En effet, par la méthode *in vivo* on apporte du nitrate supplémentaire dans la solution d'incubation. De plus, l'addition de propanol au milieu d'incubation peut provoquer des mélanges de nitrate localisé dans des compartiments différents en modifiant la perméabilité des systèmes membranaires. Des mesures d'activité *in vivo* en présence ou en absence de propanol ne nous ont pas permis de déceler de différences significatives de l'activité après des périodes d'incubation de différentes durées (Fig. 9).

Donc le propanol ne modifie pas l'activité mesurée *in vivo*. Afin de vérifier si l'apport du nitrate avait une action importante nous avons procédé à la méthode de mesure de l'activité dite *in situ* (cf. Matériel et Méthodes). Dans ces conditions, on s'aperçoit que l'activité mesurée dans les racines est plus faible que celle mesurée *in vivo*. Il apparaît donc que le potentiel d'activité réductrice est plus élevé dans les racines. Assez curieusement, les feuilles cotylédonnaires ont une activité plus importante par la méthode *in situ* que par la méthode *in vivo*. Ce fait expérimental qui a été observé à plusieurs reprises reste incompréhensible pour l'instant.

## VII - ACTIVITE *IN VITRO* - PROTOCOLE D'EXTRACTION DE LA NITRATE REDUCTASE ET ESSAIS DE PURIFICATION.

Dans le but d'étudier la localisation de l'enzyme

Tableau 6 : Influence de divers P.V.P sur la stabilité de l'activité de la nitrate réductase.

Présence dans Tp $\text{PO}_4^{=}$ 100mM pH7,5 de	Activité NADH- NR	Activité NADPH- NR
Polyclar AT	0,262	0,340
PVP soluble	0,174	0,251
Polyvinylpyrrolidon K25	0,136	0,176

Les activités enzymatiques sont exprimées en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ .  
le P.V.P. soluble est en solution à 25 %.

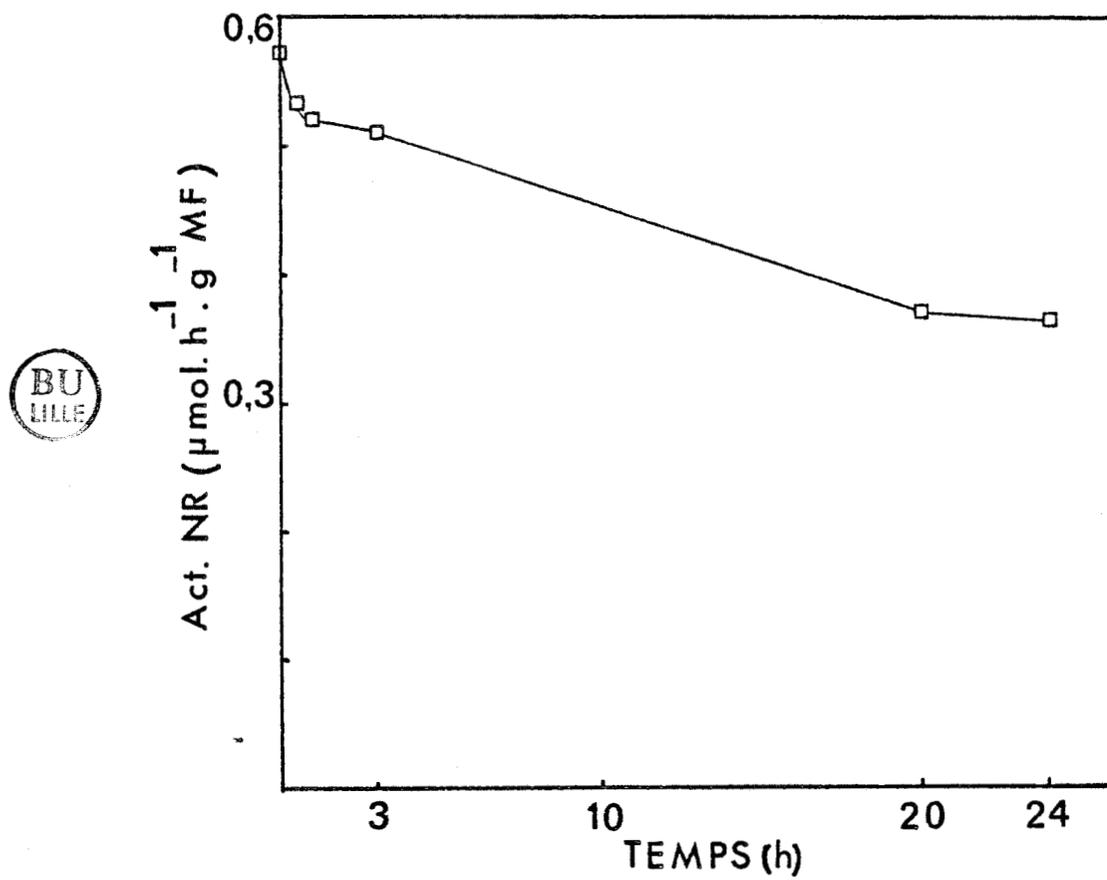


Tableau 7 : Influence du polyclar ajouté à divers moments de l'extraction sur les activités NADH ou NADPH nitrate réductase.

Présence du Polyclar	Activité NADH-NR	Activité NADPH-NR
au moment du broyage	0,082	0,157
dans le tampon d'extraction	0,087	0,137

Les activités enzymatiques sont exprimées en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ .

Fig. 10 : Mesure de la stabilité de la nitrate réductase à 4° C.



dans les différents organes au cours de la différenciation, nous avons tenté de procéder à la purification de la nitrate réductase selon un protocole mis au point pour l'enzyme du silène (POULLE, 1979).

### 1) Essais préliminaires.

Dans un premier temps nous avons utilisé le tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 à raison de 1 ml de tampon par gramme de matière fraîche. Après une centrifugation de 20 minutes à 7 000 g, l'activité de la nitrate réductase mesurée *in vitro* selon le procédé, décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes, n'est pas décelable. Aussi avons-nous tenté de stabiliser l'enzyme par l'addition de  $\beta$ -mercaptoéthanol (10 mM), de cystéine (1 mM) ou de caséine (3 %) qui se sont révélées être sans effets.

Comme les extraits cellulaires prennent très rapidement une coloration brune, nous avons pensé que l'enzyme pouvait être inactivée par des produits d'oxydation des phénols présents dans la plante. On sait en effet que les quinones peuvent contracter des liaisons covalentes avec les protéines et inactiver les enzymes (SRIVASTAVA et VAN HUUSTEE, 1977). Aussi avons-nous essayé différents types de polyvinylpyrrolidone qui possède des propriétés anti-oxydantes ou qui inhibe l'oxydation des phénols. Il apparaît à la lecture du tableau 6, que le Polyclar AT (insoluble) donne les meilleurs résultats, qu'il soit ajouté lors du broyage ou dans le tampon d'extraction (Tableau 7). Et, en effet, l'activité de réduction NADH- dépendante reste relativement stable pendant 24 heures (Fig. 10).

Après avoir réussi à stabiliser l'activité de la nitrate réductase d'extraits totaux par le polyclar nous avons étudié la spécificité du donneur d'électrons pour l'activité de l'enzyme. Il apparaît que la nitrate réductase fonctionne à la fois avec le NADH et le NADPH (Tableau 6) et que l'activité NADPH est même légèrement supérieure à l'activité NADH.

L'addition de polyclar insoluble dans les extraits rend difficile les opérations ultérieures de purification, aussi

Tableau 8 : Influence de  $NH_4NO_3$  et de la glutamine sur l'activité de la nitrate réductase.

Présence dans Tp $PO_4^-$ 100 mM pH' 7,5 de	Activité NADH-NR
Polyclar seul	0,062
$NH_4NO_3$ 0,1 M avec polyclar	0,063
Glutamine 0,1 M sans polyclar	0,050
Glutamine 0,1 M avec polyclar	0,208

Les activités enzymatiques sont exprimées en  $\mu\text{mol. h}^{-1} . \text{g}^{-1} \text{MF}$ .

Fig. 11 : Activités NADH (---○---) NADPH (—▽—) et MV (—□—) des extraits en fonction du pH du tampon d'extraction.

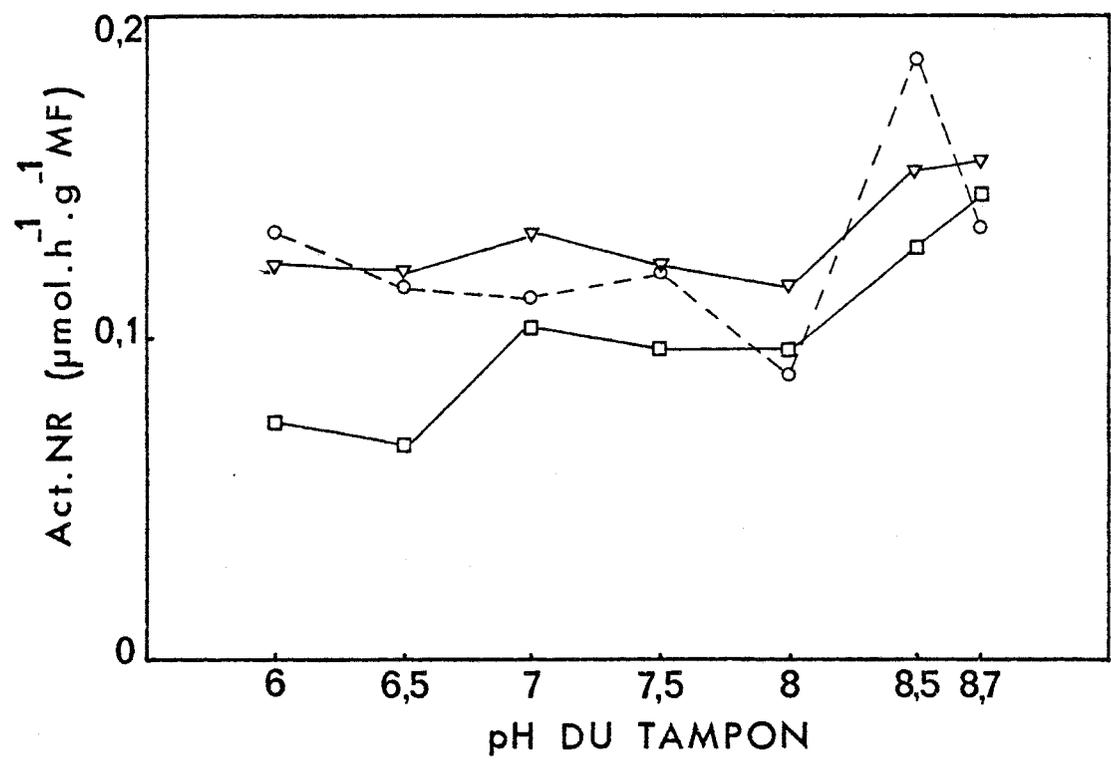


Fig. 12 : Activités NADH (-□-) NADPH (—▽—) et MV (—○—) des extraits en fonction de la concentration molaire du tampon phosphate d'extraction.

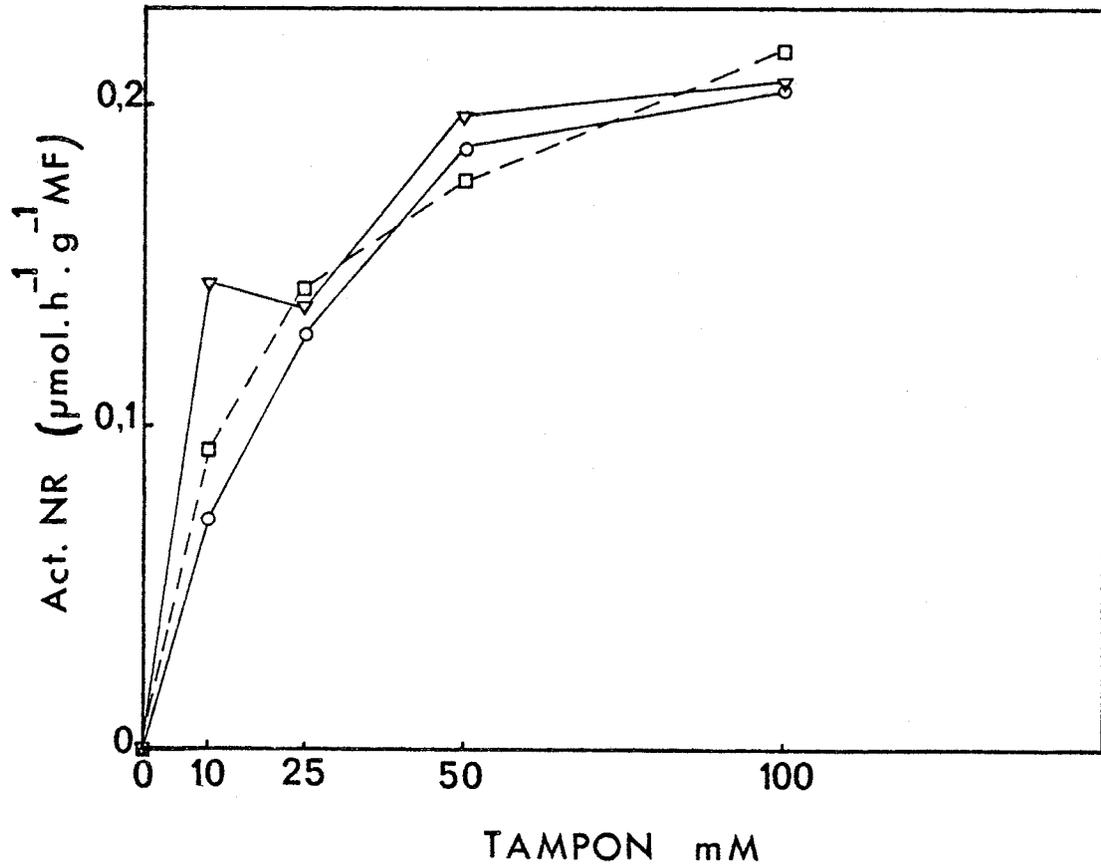


Tableau 9 : Influence de l'EDTA (1mM) et du FAD (10 $\mu$ M) sur les activités NADH, NADPH, MV- nitrate réductase des extraits confectionnés dans le tampon phosphate 50 mM pH 8,5, en présence de polyclar.

Conditions d'extraction	Activité NADH- NR	Activité NADPH- NR	Activité MV- NR
Tp PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> 50mM pH 8,5	0,074	0,087	0,227
Tp PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> 50mM pH 8,5 + EDTA 1mM + FAD 10 $\mu$ M	0,113	0,108	0,170

BU  
LILLE

Les activités enzymatiques sont exprimées en  $\mu$ mol.  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> . h<sup>-1</sup> . g<sup>-1</sup> MF.

avons-nous essayé d'incorporer des molécules solubles qui seraient susceptibles de stabiliser l'enzyme. La présence de  $\text{NH}_4$  ( $\text{NO}_3$ ) n'a aucun effet alors que la glutamine (0,1 M) ne protège l'enzyme qu'en présence de polyclar (Tableau 8). Par ailleurs l'EDTA (1 mM) et le FAD (10  $\mu\text{M}$ ) n'ont aucun effet de protection.

## 2) Modifications des conditions d'extraction.

L'instabilité de l'enzyme nitrate réductase peut également être due au fait que le broyage des tissus libère des protéases qui se trouvent normalement dans des compartiments cellulaires distincts des sites de réduction du nitrate. Or on sait que l'essentiel de l'activité protéasique des tissus des végétaux supérieurs est lié à la présence de protéases dont l'activité se situe à des pH acides ou proche de la neutralité. Aussi avons-nous utilisé des tampons d'extraction ayant un pH basique compatible avec l'activité de la nitrate réductase. Ainsi KUO et Coll. (1982) ont utilisé avec succès un tampon Tris HCl pH 8,5 qui stabilise l'enzyme de l'orge. L'emploi de ce tampon n'améliore pas la stabilité de la nitrate réductase de l'endive si on ne lui ajoute pas de polyclar ; d'autre part il provoque l'apparition de composés verdâtres différents des chlorophylles qui gênent considérablement la mesure de l'activité de la nitrate réductase. Aussi avons-nous modifié le pH du tampon phosphate, que nous avons amené à 8,5 puisque c'est à cette valeur que les activités NADH et NADPH sont maximales (Fig. 11).

Par ailleurs, des modifications de la concentration ionique du tampon phosphate ont été réalisées. L'activité est sensiblement identique pour des concentrations comprises entre 50 et 100 mM (Fig. 12). Aussi avons-nous utilisé pour la suite de notre travail, le tampon phosphate 50 mM pH 8,5 auquel nous avons ajouté de l'EDTA (1 mM), du FAD (10  $\mu\text{M}$ ) et du polyclar (5 %) qui donne de bonnes activités NADH- et NADPH- nitrate réductase (Tableau 9).

Enfin nous avons étudié quel était le volume optimum de tampon phosphate qu'il fallait utiliser par unité de poids de

Fig. 13 : Influence du rapport volume tampon/ masse de tissu sur les activités NADH (—○—), NADPH (-□-), MV (—▽—).

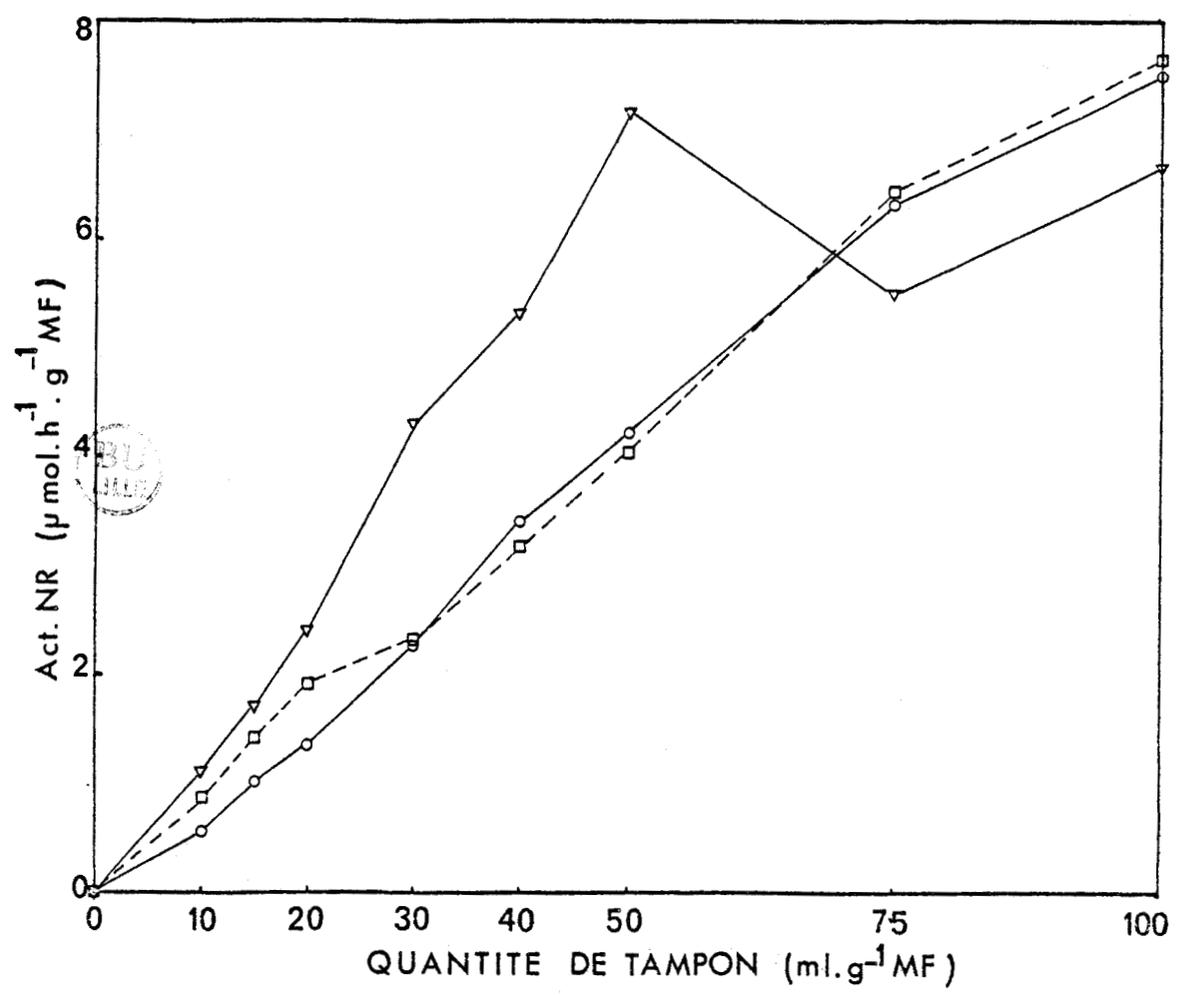
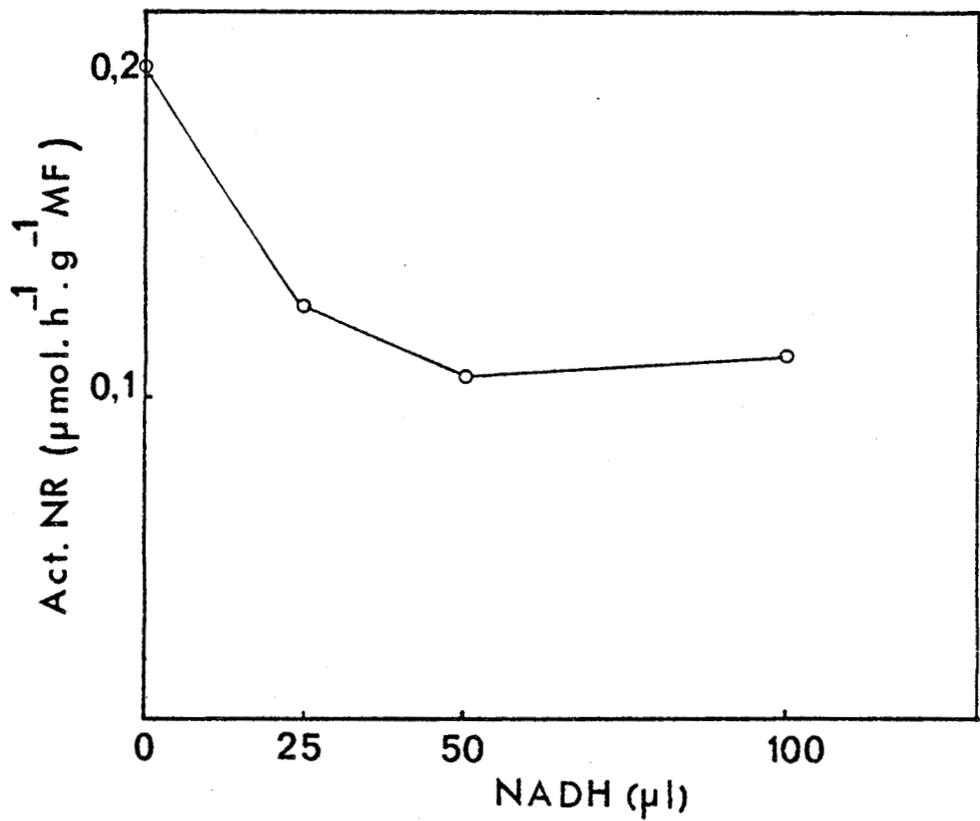


Fig. 14 : Activité NADH des extraits en fonction de la concentration de NADH dans le milieu réactionnel.



tissus broyés. Nous avons constaté que les quantités sont très importantes et pour des raisons de commodité de manipulation nous avons procédé à des extractions qui utilisent 5 volumes de tampon par gramme de matière fraîche (Fig. 13).

### 3) Les donneurs d'électrons.

#### a) Le NADH.

Comme la nitrate réductase de l'endive ne présente pas de spécificité stricte vis à vis des donneurs d'électrons et qu'elle semble accepter aussi bien le NADH que le NADPH, nous avons recherché la concentration optimale de nucléotides pyridiniques dans le milieu d'incubation. L'activité la plus élevée est obtenue sans addition de NADH (Fig. 14). L'addition de NADH exogène au milieu d'incubation provoque donc une diminution de l'activité apparente de réduction. Il semble enfin que la nitrate réductase de l'endive dispose de suffisamment de NADH endogène pour réduire le nitrate fourni.

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons mesuré l'activité d'extraits cellulaires soumis ou non à une incubation de 30 minutes. Le protocole suivant a été adopté :

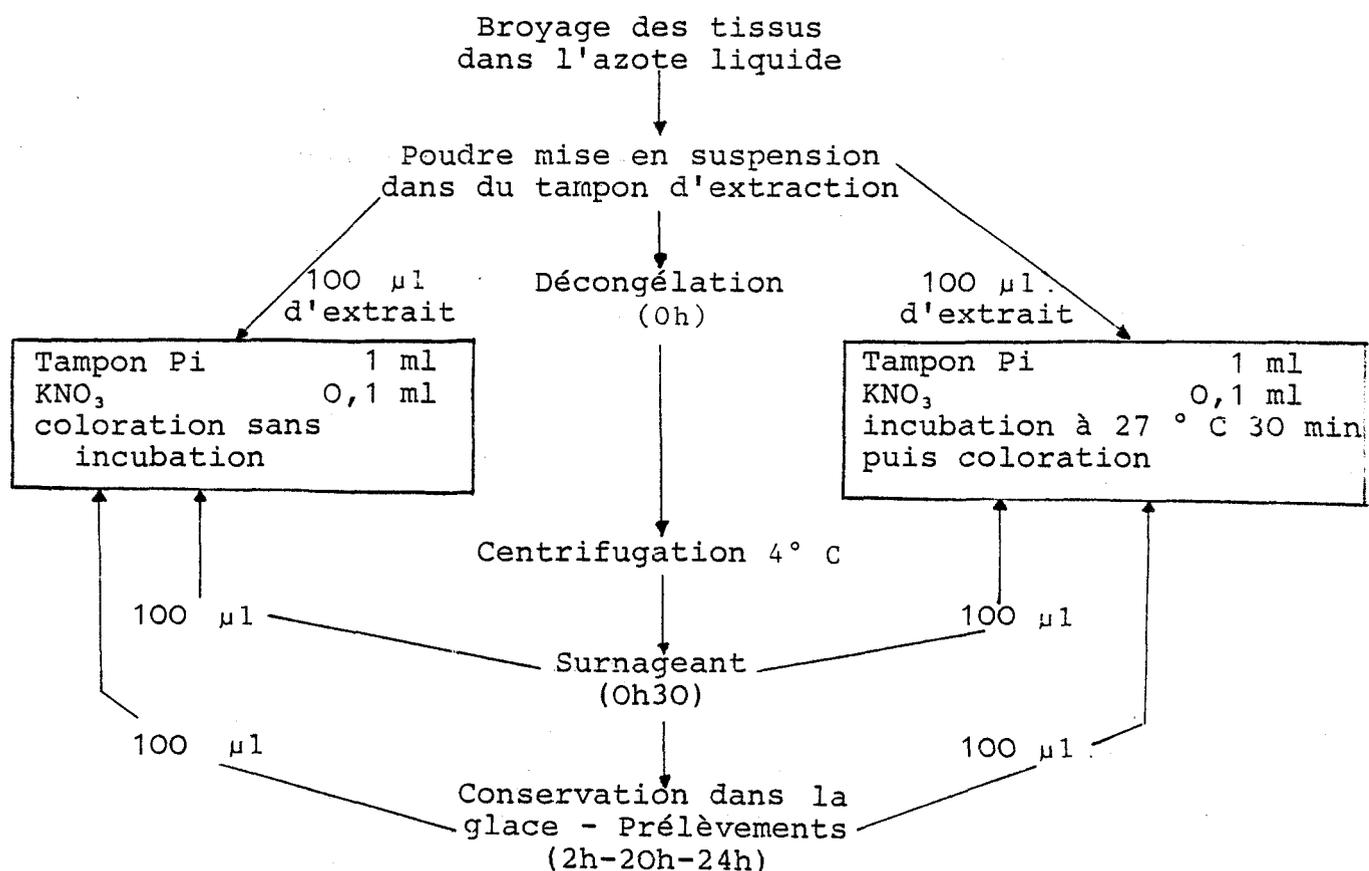
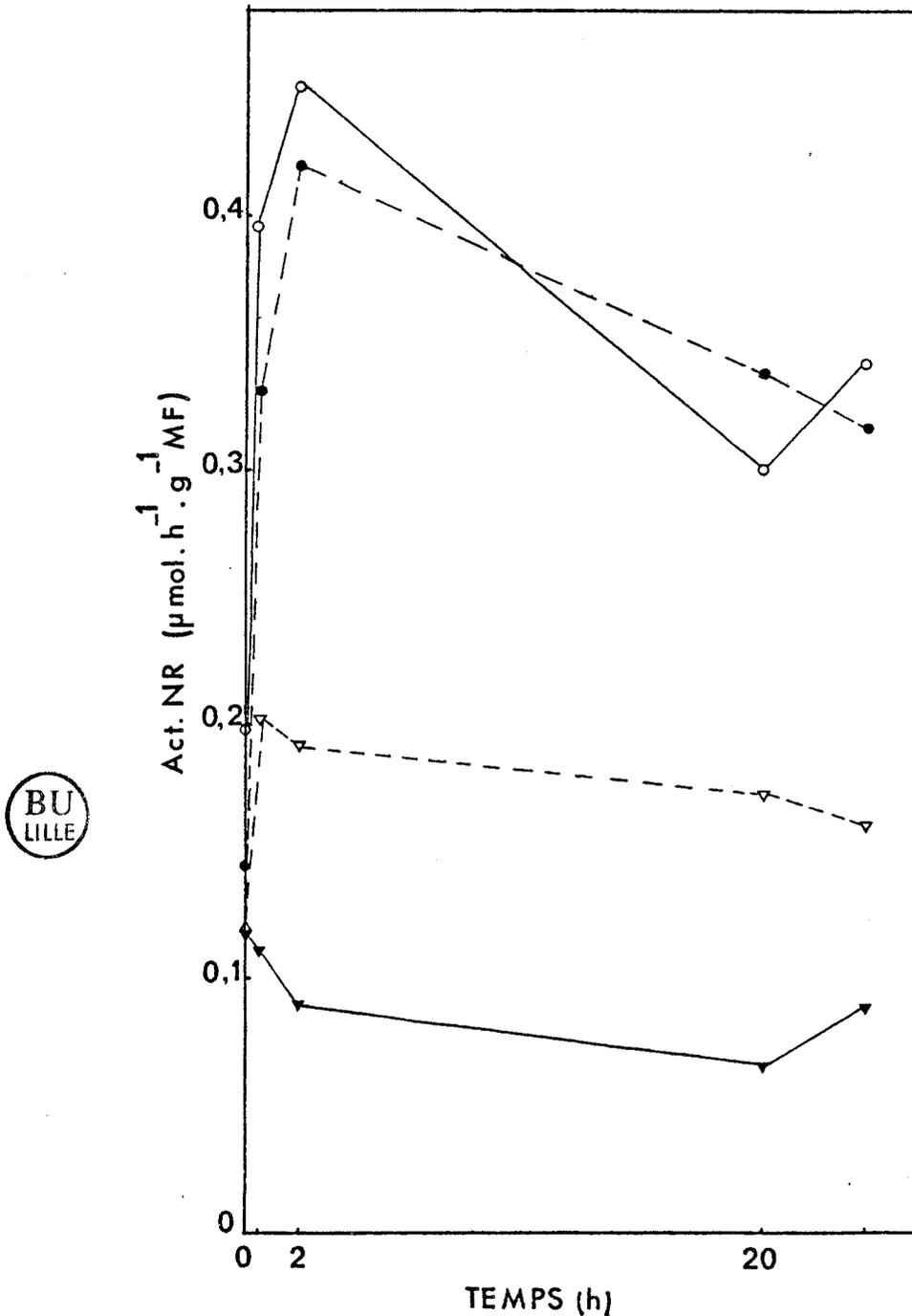


Fig. 15 : Influence de l'incubation et du NADH sur l'activité NADH- nitrate réductase.



(—○—) Activité NADH- nitrate réductase en absence de NADH dans le milieu réactionnel et sans incubation ;  
 (---●---) Activité NADH- nitrate réductase en absence de NADH dans le milieu réactionnel et avec incubation ; (---▽---)  
 Activité NADH- nitrate réductase en présence de 0,025 ml de NADH dans le milieu réactionnel et avec incubation ; (—▼—)  
 Activité NADPH- nitrate réductase, des extraits après décongélation (0<sup>H</sup>), après centrifugation (0<sup>H</sup>30) et ensuite dans le temps.

Il apparaît que dès la décongélation, une coloration rose se développe, elle correspond à une activité d'environ  $0,2 \mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  MF (Fig. 15). Deux éventualités sont envisageables : ou bien cette coloration correspond à la présence de nitrite endogène, ou bien elle est le reflet d'une activité de la nitrate réductase qui se déroule pendant la phase de décongélation. Or le broyage des tissus directement dans les réactifs du nitrite ou dans un tampon en présence d'alcool déhydrogénase et d'acétaldéhyde ne provoquent pas de coloration rose ; de même quand nous avons étudié l'activité de la nitrate réductase par la méthode *in vivo*, nous n'avons jamais mis en évidence, dans les témoins non incubés, de nitrite endogène à de telles concentrations. Il faut donc admettre lors des processus de broyage, que le mélange du contenu de divers compartiments cellulaires met en présence l'enzyme, des donneurs d'électrons et du substrat, permettant ainsi l'amorce de la réaction pendant la phase de décongélation. Cette réaction se poursuit d'ailleurs pendant la centrifugation puisque l'on observe à la fin une activité correspondant à  $0,4 \mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  MF. Lorsque le surnageant est maintenu au froid, l'activité continue de croître encore légèrement puis elle diminue ensuite lentement.

Lorsque des aliquotes sont prélevées aux mêmes stades (décongélation, centrifugation, conservation), introduites dans le mélange de réaction, puis mises en incubation, l'activité de la nitrate réductase évolue de la même façon que précédemment, mais elle est toujours plus faible. La température relativement élevée de l'incubation provoque donc une diminution de l'activité enzymatique.

Par ailleurs l'addition d'une solution de NADPH ( $100 \mu\text{M}$ ) ou de NADH ( $25 \mu\text{M}$ ) dans le milieu d'incubation d'extraits prélevés aux mêmes stades que ceux décrits précédemment, réduit considérablement l'activité enzymatique apparente (Fig. 15).

Or le NADH en particulier est susceptible d'interférer avec la coloration du nitrite (HEWITT et NICHOLAS, 1964), ce qui constitue une source d'erreur dans l'estimation de l'activité de la

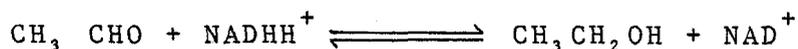
Tableau 10 : Activité NADH des extraits, avec ou sans incubation, en présence ou absence de NADH, avec ou sans addition d'ADH et d'acétaldéhyde à la fin de l'incubation.



		Conditions	Activité NADH- NR
sans incubation	avec NADH	sans ADH + acétaldéhyde	0,532
		avec ADH + acétaldéhyde	5,616
	sans NADH	sans ADH + acétaldéhyde	1,936
		avec ADH + acétaldéhyde	5,738
avec incubation (30 min)	sans NADH	sans ADH + acétaldéhyde	0,091
		avec ADH + acétaldéhyde	0,485
	avec NADH	sans ADH + acétaldéhyde	0,345
		avec ADH + acétaldéhyde	0,480

Les activités enzymatiques sont exprimées en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MF}$ .

nitrate réductase. L'élimination de cette interaction est rendue possible par l'addition d'acétaldéhyde et d'alcool déhydrogénase à la fin de l'incubation, juste avant la coloration du nitrite. L'alcool déhydrogénase (A.D.H.) catalyse en effet la réaction suivante :



Cette réaction est instantanée et élimine donc l'excès de NADH. Le  $\text{NAD}^+$  n'interfère pas avec la coloration.

Aussi afin d'éviter l'excès de NADH et de mesurer l'activité réelle de la nitrate réductase, de l'A.D.H. et de l'acétaldéhyde ont été ajoutés dans les différents extraits. Les résultats sont reportés dans le tableau 10. Il est possible de constater une fois encore que le NADH interfère effectivement avec la coloration puisque l'addition de 50  $\mu\text{l}$  de NADH ( $1 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) diminue apparemment l'activité de trois fois. Mais le point essentiel est que les extraits non soumis à l'incubation renferment une quantité importante de NADH. En effet l'addition d'acétaldéhyde et d'A.D.H. augmente considérablement la valeur de l'activité puisque l'on passe de 1,9 à 5,7  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  MF.

De plus, au cours des 30 minutes d'incubation, une quantité importante de NADH endogène est utilisée (diminution de l'activité d'un facteur de 10) dans des réactions autres que celle de la réduction du nitrate. En effet, l'apport de NADH ne restaure pas l'activité présente dans les extraits non incubés.

En définitive pendant la période d'incubation, interviennent à la fois une déstabilisation de la nitrate réductase et une oxydation du NADH.

#### b) Le NADPH.

En ce qui concerne la spécificité de la nitrate réductase de l'endive, nous avons voulu savoir si l'enzyme était capable de recevoir des électrons et du NADH et du NADPH ou bien si le NADPH était déphosphorylé puis transformé en NADH qui

Tableau 11 : Comparaison des activités d'extraits d'endive et de la nitrate réductase purifiée d'épinard, employés seuls ou en mélange.

Extraits	Activité NADH-NR	Activité NADPH-NR.
Feuilles d'Épinard	84,583	0
Feuilles d'Endive	0,782	0,900
Feuilles d'Épinard + Feuilles d'Endive	3,791	1,006

Les activités enzymatiques sont exprimées en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MF}$ .

Tableau 12 : Comparaison des activités d'extraits provenant soit de l'apex racinaire, soit du collet, soit de fragments de feuilles jeunes ou âgées ainsi que de leurs mélanges.



Extraits	Activité NADH- NR	Activité NADPH- NR
Racine pointe (Rp)	0,161	0,254
Racine au niveau du collet (Rc)	0,311	0,338
Feuilles externes (Fe)	1,392	1,306
Feuilles internes (Fi)	1,223	1,440
Rp + Fe	0,800	0,660
Rp + Fi	0,892	0,816
Rc + Fe	0,846	0,854
Rc + Fi	0,821	0,730

Les activités enzymatiques sont exprimées en  $\mu\text{mol. NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MF}$

serait alors le véritable donneur d'électrons.

Dans cette optique, le protocole expérimental suivant a été utilisé : l'activité NADH et NADPH est mesurée

- (1) dans une préparation purifiée d'épinard
- (2) dans un extrait de feuilles d'endive
- (3) dans un mélange comprenant de l'extrait de feuilles d'endive et de préparation d'épinard.

Or la nitrate réductase de l'épinard n'est active qu'en présence de NADH, ce qui est vérifié dans le tableau 11. Dans ces conditions si l'extrait de feuilles d'endive contient une phosphatase qui aboutit à la transformation du NADPH en NADH, on doit observer un accroissement considérable de l'activité NADPH lorsque les deux enzymes d'épinard et d'endive sont en mélange. L'enzyme d'épinard étant en effet très active, elle doit utiliser immédiatement le NADH qui serait formé et l'activité mesurée dans ces conditions sera nettement plus importante que celle mesurée lorsque la nitrate réductase d'endive est seule dans le milieu réactionnel. Les résultats reportés dans le tableau 11 montrent qu'il n'en est rien. Il semble donc que les feuilles d'endive possèdent une nitrate réductase capable d'utiliser aussi bien le NADH que le NADPH comme donneur d'électrons.

#### 4) Recherche d'inhibiteurs.

Comme la mesure *in vitro* de l'activité de la nitrate réductase est bien mise au point, nous avons voulu savoir si la disparition de l'activité enzymatique dans les racines était un phénomène lié simplement à l'évolution physiologique des tissus, ou si au cours de cette évolution, la modification de cette activité n'était pas le fait de l'apparition d'un inhibiteur.

Nous avons donc préparé des extraits de fragments de racine prélevés soit dans la région apicale soit dans la région du collet, ainsi que de fragments de feuilles jeunes et âgées. Les activités de chaque extrait ainsi que celles de mélanges d'extraits foliaires et racinaires ont été mesurées (Tableau 12).

L'activité la plus importante est présente dans les feuilles aussi bien lorsque le NADH ou le NADPH sont les donneurs

d'électrons. L'activité la plus faible est celle de la partie apicale de la racine. Lorsque des mélanges d'extrait de racine -extrait de feuille sont effectués, l'activité est toujours inférieure à la somme des deux activités. On peut donc penser qu'il existe un inhibiteur de l'activité de la nitrate réductase dans les racines et que cet inhibiteur est capable de freiner l'activité de la nitrate réductase foliaire. La nature de cet inhibiteur reste bien entendu inconnue.

Cependant, l'interprétation de ces résultats doit amener à beaucoup de prudence. En effet, outre l'éventualité de la présence d'un inhibiteur, on peut penser qu'avec les extraits racinaires on introduit soit des NADH ou NADPH oxydases, soit des composés phénoliques en grande quantité, susceptible d'être oxydés. De telles expériences demanderaient à être renouvelées avec des extraits enzymatiques au moins partiellement purifiés.

#### 5) Essais de purification.

Comme l'extraction de la nitrate réductase de l'enzyme est rendue possible grâce à la présence du polyclar, nous avons tenté de la purifier. Mais malheureusement l'activité enzymatique est perdue soit après la précipitation au sulfate d'ammonium soit lors de la purification par chromatographie d'affinité ou d'adsorption. Ainsi toutes les tentatives de purification de l'enzyme ont échoué par suite de la perte de l'activité de la nitrate réductase.

## DISCUSSION

### I - MESURE DE L'ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE : ASPECTS METHODOLOGIQUES.

La mesure de l'activité de la nitrate réductase peut s'effectuer selon plusieurs méthodes dont aucune n'est vraiment satisfaisante en soi.

En effet la méthode *in vitro* qui utilise des broyats tissulaires ne rend pas nécessairement compte de la vitesse de réduction du nitrate dans le tissu (BRUNETTI et HAGEMAN, 1976) puisqu'elle met en contact les composants de la réaction enzymatique qui peuvent être localisés dans des compartiments cellulaires différents. A la condition d'avoir pris les précautions nécessaires pour éviter toute inactivation (SCHRADER et Coll., 1974 ; PURVIS et TISCHLER, 1976 ; LEONG et SHEN, 1982) elle représente en fait la capacité de réaction maximale de l'enzyme présente dans les cellules.

La méthode de mesure *in vivo* effectuée sur des fragments d'organes (FERRARI et VARNER, 1971 ; JAWORSKI, 1971) donne de la réaction de réduction une image un peu plus réelle. Elle permet d'évaluer le nitrite formé dans les tissus maintenus en anaérobiose dans un milieu d'incubation liquide (HEUER et PLAUT, 1978 ; LAWRENCE et HERRICK, 1982) et à l'obscurité.

Quant à la méthode dite *in situ*, elle permet apparemment d'évaluer l'activité réelle de la nitrate réductase en évitant l'incubation dans un milieu liquide (JONES et SHEARD, 1978 ; ROBIN et Col., 1983 b).

Dans ce travail, l'activité de la nitrate réductase a été mesurée en utilisant essentiellement la méthode *in vivo*. En effet, nous avons vu précédemment que le broyage des tissus d'endive était suivi d'une inactivation très rapide de l'activité de réduction. Cette inactivation peut être attribuée à plusieurs facteurs. Elle pourrait en effet être due à la libération d'un inac-

tivateur. Nous avons en effet montré que le mélange d'extraits racinaires et foliaires présentait une activité inférieure à celle qui résulte de la somme des deux activités partielles (Tabl. 12, p. 89). Cependant comme l'activité des deux extraits est supérieure à celle de l'extrait racinaire seul, nous pensons que ce sont essentiellement les racines qui contiennent l'inactivateur. L'inactivation touche aussi bien l'activité NADH : que NADPH : nitrate réductase. Pour WALLACE (1973 a et 1975), il existe un système d'inactivation spécifique de la nitrate réductase. La nature de l'inactivateur reste cependant indéterminée.

De plus, l'inactivation peut également être liée à l'oxydation du latex ou des polyphénols qui sont en grande quantité dans les divers tissus de l'endive. En effet en absence de toute protection contre les phénomènes oxydatifs, les extraits brunissent très rapidement. Nous avons aussi montré que le seul protecteur vraiment efficace de l'activité de la nitrate réductase est le Polyclar (Tabl. 6, p. 75). Aussi toutes les tentatives de purification de l'enzyme ont-elles échouées puisque la perte de l'activité NADH ou NADPH : nitrate réductase est définitive dès l'étape de précipitation par le sulfate d'ammonium. Par ailleurs la stabilisation de l'enzyme par le Polyclar exclut toute tentative de purification de l'enzyme par chromatographie d'affinité ou d'adsorption, puisque le Polyclar colmate les colonnes.

La nature du matériel étudié nous a donc interdit d'utiliser la méthode *in vitro*. Il faut cependant noter que l'activité potentielle de la nitrate réductase de l'endive est plus élevée que son activité réelle *in vivo*. En effet, l'activité mesurée *in vitro* est 10 fois supérieure dans les racines et 4 et 2 fois dans les feuilles internes et externes respectivement (Tabl. 1, p. 46 et Tabl. 2, p. 89). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par WALLACE (1975), chez le maïs où l'activité mesurée *in vitro* est 5 fois plus élevée que celle mesurée *in vivo*. Par contre chez le soja (HATAM, 1978) et le silène (POULLE, 1979) les résultats sont inverses.

Par ailleurs, l'une des critiques avancées à l'encontre de la méthode *in vivo* est l'incorporation du propanol au milieu d'incubation. Le propanol a en effet été utilisé parce qu'il modifie la perméabilité membranaire, ce qui permet un meilleur efflux des nitrites formés. Cependant il peut aussi provoquer une fuite de nitrate du pool de stockage vacuolaire vers le pool métabolique en modifiant la perméabilité du tonoplaste (FERRARI et Coll., 1973 ; JONES et SHEARD, 1977 ; LIN et KAO, 1979 ; LAWRENCE et HERRICK, 1982) ce qui se traduit par un accroissement de l'activité de réduction. Or dans les divers tissus d'endive, l'apport de propanol au milieu d'incubation, dans nos conditions de mesure, ne modifie pas l'activité (Fig. 9, p. 73) ce qui est en accord avec d'autres travaux (SUBBALAKSMI et Coll., 1979 ; YONEYAMA, 1981).

Enfin nos résultats montrent que chez les plantules l'activité mesurée *in vivo* est supérieure à celle mesurée *in situ* (Tabl. 5, p.73). Cette différence pourrait être attribuée soit à un défaut d'hydratation lors de l'emploi de la seconde méthode, soit à un apport de nitrate dans le milieu d'incubation lorsque la mesure est effectuée *in vivo*.

## II - SPECIFICITE DU DONNEUR D'ELECTRONS POUR LA NITRATE REDUCTASE DE CICHORIUM INTYBUS.

Pour ce qui est de la spécificité du donneur d'électrons, l'enzyme extraite, tant des racines que des feuilles, est bispécifique : elle peut utiliser aussi bien le NADH H<sup>+</sup> que la NADPH. Selon WELLS et HAGEMAN (1974) l'activité dite NADPH : nitrate réductase serait un artefact lié à une activité phosphatase qui transformerait le NADPH en NADH qui serait en fait le véritable donneur d'électrons. Or dans les tissus de l'endive nous avons montré la coexistence des deux types d'activité (Tabl. 11, p. 89) qui sont, par ailleurs toutes deux stimulées par l'EDTA (1 mM) et le FAD (10 µM) (Tabl. 9, p. 80). Or JOLLY et Coll. (1976) ont montré que le FAD stimule l'activité NADPH : nitrate réductase mais non celle liée au NADH. Par ailleurs, ces auteurs montrent que la présence de cystéine dans le tampon d'extraction inhibe l'activité

NADH-dépendante, mais est nécessaire à l'activité NADPH : nitrate réductase. Chez l'endive, l'absence de cystéine ne modifie pas l'activité NADPH-dépendante.

Par ailleurs les activités NADH ou NADPH : nitrate réductase varient selon le stade de développement d'un organe. Ainsi chez le soja la NADH : nitrate réductase est très active dans les jeunes cotylédons alors que l'activité NADPH-dépendante prédomine au cours du vieillissement de ces cotylédons. Chez l'endive, les deux types d'activité ne se modifient pas au cours du vieillissement des feuilles alors que dans la racine tubérisée l'activité NADPH : nitrate réductase est la plus importante dans les parties matures (Tabl. 12, p.89).

Enfin il semble que les tissus d'endive contiennent suffisamment de NADH pour que la réaction de réduction du nitrate puisse s'effectuer, puisque les activités mesurées, en absence de NADH exogène, sont supérieures à celles mesurées en sa présence. Ce qui montre bien que le NADH peut interférer avec la coloration du nitrite, qui peut-être abaissée d'un facteur 6. (Fig. 15, p.85).

### III - ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE AU COURS DES DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT DE CICHORIUM INTYBUS.

Au cours de la germination des graines d'endive, l'activité de la nitrate réductase apparaît dès l'imbibition et augmente jusqu'au stade plantule (Fig. 8, p. 70). A ce stade, l'activité des racines est d'ailleurs supérieure à celle des radicules, alors que chez d'autres espèces, l'activité de réduction n'est détectable dans les racines qu'avant leur élongation (RADIN, 1974).

Par ailleurs lorsque les feuilles apparaissent, les racines conservent toujours une activité élevée jusqu'à la tubérisation complète. Pourtant dès que le processus de tubérisation se met en place les feuilles présentent une activité qui va croissante (Tabl. 1, p. 46). Donc lors des processus de maturation et de vieillissement de l'endive, les feuilles prennent progressivement

le relais de la réduction nitrique. Des résultats identiques ont été décrits chez le citron (BAR-AKIVA et SAGIV, 1967), le soja et le tournesol (WEISSMAN, 1972), le maïs (WALLACE, 1973 b ; ASLAM et OAKS, 1976) et chez le coton (RADIN, 1974 et 1975).

A la fin de la première année de végétation, alors que la plante est constituée d'une rosette de feuilles vertes et d'une racine tubérisée, l'activité est très faible dans la majeure partie de cette racine sauf dans la région sous le collet et forte dans les feuilles (Fig.1, p.48). La situation est d'ailleurs identique dans les jeunes plants de 62 jours à un moment où la tubérisation est commencée (Tabl.1, p.46). Cette observation est en contradiction avec les résultats obtenus chez le maïs (WALLACE, 1973 b ; GASPARIKOVA et Coll., 1978 ; OAKS et STULEN, 1980) où la réduction du nitrate s'effectue essentiellement dans la partie apicale de la racine. Il faut cependant remarquer que, lorsqu'une racine tubérisée est mise en forçage, c'est dans la partie apicale que se développe d'abord l'activité de la nitrate réductase. Lorsque des racines secondaires apparaissent c'est là que s'effectuera l'essentiel de la réduction (Fig. 1, p.51 et Fig.3, p. 53).

Lorsqu'au cours du développement, les feuilles effectuent à leur tour la réduction du nitrate, ce sont toujours les plus jeunes qui présentent l'activité la plus intense (Tabl. 2, p. 49). De la même façon ce sont les plus jeunes limbes, apparus sur la hampe florale, qui renferment la plus forte activité de la nitrate réductase (Schéma 1, p. 56). Ces résultats corroborent ceux obtenus chez le *Xanthium* (WALLACE et PATE, 1967), chez le blé (SIMMONS et MOSS, 1978 ; HALLAM et BLACKWOOD, 1979), chez le concombre (BLAHOVA et SEGETA, 1980) chez le mil (NGAMBI et Coll., 1981) ou chez le pois chiche (EVANS, 1982) où l'activité est toujours la plus intense dans les feuilles jeunes.

De plus dans les feuilles de la rosette c'est toujours dans la partie distale que l'activité est la plus importante (Tabl.2, p. 49). Or cette partie du limbe est essentiellement formée

de mésophylle qui reçoit une quantité de lumière importante. Or on sait que la lumière stimule l'activité de la nitrate réductase (CANDELA et Coll., 1957 ; AMINDARI et Coll., 1978 ; KATO, 1980). Par ailleurs c'est dans le mésophylle que s'effectuent les réactions de la photosynthèse, qui est un processus important dans la fourniture des nucléotides réduits. On sait, en effet que chez le maïs, la nitrate réductase est localisée dans le mésophylle (NEYRA et HAGEMAN, 1978).

L'activité de réduction du nitrate n'est par contre jamais décelable dans les tissus foliaires d'un bourgeon étiolé. Cette absence d'activité pourrait être attribuée au manque de lumière qui, chez certaines espèces, est nécessaire à l'activité enzymatique (BEEVERS et HAGEMAN, 1969 ; KLEPPER et Coll., 1971 ; RAO et RAINS, 1976 b ; TRAVIS et Coll., 1970 a et b). Or le transfert du bourgeon étiolé à la lumière n'amène pas l'apparition de l'activité lors du verdissement des limbes. On peut alors supposer que la nitrate réductase existe dans les feuilles étiolées sous une forme inactive, ou qu'elle est inhibée par un inactivateur. A moins que le transfert qui s'effectue à la fin de la période de forçage induise le verdissement des tissus matures qui seraient dans l'incapacité de réduire le nitrate. Pourtant même dans les feuilles internes qui sont en principe les plus jeunes, on ne détecte jamais d'activité de la nitrate réductase. Une autre explication pourrait être que ces feuilles étiolées qui contiennent des quantités d'eau, de glucose et divers produits de polymérisation du fructose, constituent en fait un organe de réserve. Dans ces conditions et comme dans le cas de la racine tubérisée, l'apparition d'une fonction de réserve inhiberait l'expression de l'activité de la nitrate réductase en modifiant l'utilisation des potentiels énergétiques ou en faisant varier le potentiel hydrique (SHANER et BOYER, 1976 b).

A ce moment du forçage, la réduction du nitrate s'effectue dans les racines secondaires jeunes et prive, du moins à certains moments, les feuilles étiolées d'ions nitriques.

En résumé, il est clair que l'activité de la nitrate réductase est toujours la plus intense dans les tissus jeunes alors

que les organes de réserve (cotylédons, racines tubérisées, feuilles étiolées) en sont partiellement ou totalement dépourvus. Pourtant la mise en culture *in vitro* d'explants issus soit de racines tubérisées soit de feuilles étiolées permet le déclenchement d'une activité dans ces tissus. Par ailleurs on a vu que dans les plantes néoformées c'est au niveau des racines que l'on observe l'activité la plus élevée.

#### IV - ACTIVITE DE LA NITRATE REDUCTASE ET MODIFICATION DES METABOLISMES. PROBLEME DE L'INDUCTION.

La culture *in vitro* de tissus racinaires ou foliaires provoque donc l'apparition d'une activité de la nitrate réductase plus ou moins élevée. La durée de la phase de latence d'environ 6 heures (Fig. 4, p. 57) est du même ordre de grandeur que celle observée dans des cellules de soja (OAKS, 1974), de tabac (FILNER, 1966) ou de silène (POULLE, 1979), pour lesquelles elle est de 3, 6 et 8 heures. Comme par ailleurs le transfert d'explants sur un milieu neuf après 5 jours de culture (Fig. 6, p. 61) provoque une légère élévation du taux d'activité, on peut penser que l'enzyme est soit synthétisée, soit activée lors de la mise en culture. Ce qui pose le problème de l'induction de la nitrate réductase et de la nature de son inducteur éventuel, qui est un phénomène extrêmement complexe chez les végétaux supérieurs. Nous avons vu en effet que pour certains auteurs, le nitrate constitue l'inducteur primaire de l'enzyme, alors que pour d'autres il induit un activateur qui transforme l'apoenzyme inactive en enzyme active. Comme nous n'avons pas effectué d'études qui utilisent des inhibiteurs soit de la transcription soit de la traduction, nous ne pouvons pas répondre directement à la question posée à savoir synthèse ou activation. Cependant l'inhibition des graines par de l'eau distillée ou par une solution de nitrate permet l'apparition très rapide de l'activité de réduction (Fig.8, p. 70). Les ARN messagers de la nitrate réductase, tout comme ceux d'autres enzymes, pourraient donc exister dans les graines sèches, d'autant plus que la présence de nitrate exogène dans la solution d'imbibition n'augmente

pas beaucoup l'activité. On peut donc penser que pendant les premières heures qui suivent l'imbibition, une partie du nitrate stocké sert de substrat à l'enzyme. Au stade plantule, par contre la composition de la solution nutritive joue un rôle plus déterminant. En effet la fourniture de nitrate et de calcium, qui augmente l'activité de la nitrate réductase (DAVIDIAN et SALSAC, 1979), déclenche une activité plus importante que si une solution nutritive plus complexe (solution de HELLER) est fournie. Dans ce cas il semble que des interactions ioniques provoqueraient une activité moindre. Par ailleurs la solution de HELLER contient plus de nitrate (64 mM) que la solution de Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (3 mM). Un effet de saturation de l'enzyme par le substrat pourrait alors avoir lieu lorsque les racines sont en contact avec la solution de HELLER.



Par ailleurs, nos observations montrent des relations très variables entre l'activité de la nitrate réductase et la teneur en nitrate des divers organes étudiés. Bien que *Cichorium intybus* ne soit pas une plante qui accumule des quantités importantes de nitrate comme peut le faire l'épinard par exemple, la racine tubérisée est l'organe qui en contient le plus à la fin de la première année de végétation, surtout dans la région située sous le collet. Cependant à ce stade ce sont les feuilles qui présentent la plus forte activité enzymatique. Il apparaît donc qu'à une teneur élevée de nitrate ne correspond pas obligatoirement une activité importante. Cette observation faite également par OAKS et BIDWELL (1970), FERRARI et Coll. (1973), EZETA et JACKSON (1975), SHANER et BOYER (1976 a) et ADAMOWICZ (1980), suggère qu'une partie du nitrate emmagasiné dans certains tissus est inaccessible à la réduction. Par contre dans les feuilles vertes, l'activité de réduction est la plus élevée, là où la teneur en nitrate est la plus forte, c'est-à-dire dans les parties distales des feuilles.

Lorsque les racines sont mises en forçage, la racine pivotante trempe dans une solution de nitrate de calcium (Fig. 2, p. 51). L'activité de la nitrate réductase se développe dès les premiers jours dans toute la racine, mais surtout dans sa pointe,

alors que la teneur en nitrate n'augmente pas à ce moment. Donc la fourniture de nitrate et de calcium permet soit l'induction soit la stimulation de l'enzyme. Cela corrobore les observations de PAULSEN et HARPER (1968), RAO et RAINS (1976 a), SASAKAWA et YAMAMOTO (1977 b), DAVIDIAN et SALSAC (1979) et OAKS et STULEN (1980) pour qui le nitrate est l'inducteur de l'activité de la nitrate réductase. Dans le cas de l'endive comme la teneur globale du nitrate n'est pas affectée, il semblerait que ce soit le flux et non la teneur tissulaire en nitrate qui amène l'apparition de l'activité enzymatique (HEIMER et FILNER, 1971 ; SHANER et BOYER, 1976 a).

Dans les jeunes racines qui se développent au cours du forçage (Fig. 3, p. 53), la teneur en nitrate augmente dès le début de leur formation mais l'activité de réduction ne permet pas d'utiliser la quantité absorbée, dont une fraction serait donc transloquée dans la racine pivotante. En effet dans la racine pivotante, la teneur en nitrate augmente dès que les jeunes racines apparaissent (8ème jour). Par ailleurs une partie du nitrate passe dans le bourgeon qui en accumule à un certain moment dans la partie proximale des feuilles étiolées, lorsque la teneur en nitrate des racines secondaires baisse (Tabl. 3, p. 54).

Ces résultats ainsi que l'observation des teneurs en nitrate des explantats cultivés *in vitro*, confirment donc que plus que la teneur c'est le flux de nitrate qui déclenche l'activité de réduction.

Cependant en plus des variations du flux nitrique, d'autres facteurs semblent intervenir dans la régulation enzymatique. Nous avons vu que l'activité de la nitrate réductase semble être sensible à la tubérisation de la racine et à l'apparition de la succulence des feuilles étiolées et qu'elle pourrait être en relation avec le métabolisme des hydrates de carbone. On sait en effet que l'activité de la nitrate réductase d'un organe est régulée par sa composition en glucides (MINOTTI et JACKSON, 1970 ; ASLAM et Coll., 1976). D'autre part en cas de déficience en sucre, les racines

de coton l'utilisent préférentiellement pour leur croissance plutôt que pour la réduction du nitrate (RADIN et Coll., 1978). Or chez l'endive, des modifications du métabolisme glucidique apparaissent au cours du forçage (FIALA et Coll., 1983). En effet dans la racine forcée, il semble que se mette en place une dégradation des glucides par la voie des pentoses phosphates qui pourraient donc générer du NADPH nécessaire à la réduction du nitrate.

Par ailleurs l'excision de fragments racinaires ou foliaires en vue de leur culture *in vitro* peut amener des modifications du métabolisme des carbohydrates, d'autant plus que les feuilles étiolées sont riches en glucose (FIALA et Coll., 1983), et que le glucose associé au nitrate peut dans certains cas stimuler l'activité de la nitrate réductase (ASLAM et OAKS, 1975).

Autrement dit la mise en place de flux nitrique et les modifications métaboliques susceptibles de fournir des nucléotides réduits sont sans doute des facteurs importants dans le fonctionnement de la nitrate réductase dans les divers tissus de l'endive.

## V - LES OSCILLATIONS.

Nous avons vu que la teneur en nitrate ainsi que l'activité de la nitrate réductase des racines en forçage et des fragments racinaires cultivés *in vitro* montrent des oscillations significatives sans périodicité régulière (Fig. 2, p. 52 et Fig. 4, p. 57). Dans les racines en forçage, il existe une assez bonne corrélation entre les modifications du taux de nitrate et de l'activité de réduction. Ces fluctuations, nous les avons constamment retrouvées au cours de notre travail.

Or les phénomènes oscillatoires décrits dans d'autres travaux sont souvent de type circadien (ROTH-BEJERAMO et LIPS, 1970 b ; DUKE et Coll., 1978 ; GODLEWSKA et ROGOZINSKI, 1981 ; GODLEWSKA, 1982) ou ultradien (STEER, 1974 et 1976) mais ont tous été décrits pour des feuilles. Pour ROTH-BEJERAMO et LIPS (1970)

les fluctuations quotidiennes de l'activité de la nitrate réductase seraient influencées par les modifications du rapport cytokinine-gibbérellines lors des alternances jour-nuit. Pour STEER (1974) elles seraient liées à la photosynthèse. Dans l'endive ces explications ne sont pas satisfaisantes du moins lors du forçage puisque les plantes sont alors maintenues à l'obscurité.

Les oscillations observées dans les racines secondaires ressemblent à un phénomène de relaxation cyclique quasi périodique tel qu'il a été défini par TONNELAT (1978). Même si leur nombre est limité, elles pourraient être le reflet d'activités métaboliques différentes dans les organes étudiés. En effet BURRIS (1959) et SAWHNEY et Coll. (1978) montrent que la régulation de la nitrate réductase est sous la dépendance de l'état énergétique des tissus étudiés. Par ailleurs JOLIVET et Coll. (1976) ont montré que le pouvoir réducteur des racines de *Cichorium intybus* décroît pendant la période de croissance et lors de la conservation. Par contre la variation du pouvoir réducteur augmente au cours du forçage. Ces modifications sont sans doute à relier aux variations du métabolisme des carbohydrates.

Les raisons des oscillations pourraient donc être dues à des variations du pouvoir réducteur et/ou à une régulation des phénomènes d'absorption du nitrate.

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La nitrate réductase de *Cichorium intybus* est bis-spécifique pour le donneur d'électrons et correspond à la NAD(P)H : nitrate réductase, dont la stabilité est assez faible. D'une façon générale, il apparaît bien que chez l'endive, le nitrate constitue l'inducteur de l'activité de la nitrate réductase comme l'ont montré les travaux de CANDELA et Coll. (1957), HEWITT et AFRIDI (1959), HAGEMAN et FLESHER (1960), AFRIDI et HEWITT (1964), BEEVERS et Coll. (1965), SHEN (1969), AMINDARI et Coll. (1978) et ceux de LEWIS et Coll. (1982). De plus il semble que chez *Cichorium intybus*, la totalité du nitrate ne soit pas soumise à la réduction. Cette observation s'inscrit bien dans le schéma proposé par FERRARI et Coll. (1973) qui admettent l'existence de deux pools nitriques cellulaires, l'un vacuolaire inaccessible à la réduction, l'autre cytoplasmique ou métabolique constituant la fraction réductible. On peut donc penser que certains tissus de *Cichorium intybus*, ceux de la racine tubérisée en particulier, mais aussi ceux des feuilles étiolées sont constitués de cellules contenant des ions nitriques qui contribueraient essentiellement au maintien de l'équilibre ionique et seraient ainsi distraits du pool des ions réductibles. Il apparaît aussi que la teneur en nitrate d'un organe donné de *Cichorium intybus* ne constitue pas le facteur déterminant de l'apparition ou de la variation de l'activité de la nitrate réductase. Or les travaux de SHANER et BOYER (1976 a) ont montré que l'activité de la nitrate réductase est régulée non par la teneur mais par le flux de nitrate. Même si cette relation entre absorption, flux et activité de réduction du nitrate n'est pas toujours exactement vérifiée (REED et HAGEMAN, 1980 a et b), elle semble applicable au moins aux racines secondaires de *Cichorium intybus* apparues lors du forçage. Cette hypothèse, qui ne repose que sur l'analyse de variations du taux de nitrate intratissulaire pendant le forçage, demanderait cependant à être vérifiée par des mesures de flux. Enfin, il résulte de nos travaux,

que la nitrate réductase est très active dans les jeunes racines non tubérisées (racines de plantules, racines secondaires des racines pivotantes du champ ou mises en forçage, racines néoformées) et lorsqu'elles deviennent des organes de réserve, les feuilles prennent le relais dans la réduction du nitrate. Et donc comme EVANS et NASON (1953), la nitrate réductase est une enzyme des tissus jeunes et métaboliquement actifs.

Chez l'endive la nitrate réductase accepte les électrons et du NADH et du NADPH. Ces deux activités ne sont pas spécifiques d'un organe déterminé puisqu'elles se retrouvent aussi bien dans les racines que dans les feuilles. Alors que chez l'épinard la nitrate réductase des feuilles semble être différente de celle des racines (FERRARIO et Coll., 1983), nous ne savons pas actuellement si les deux activités mises en évidence chez l'endive correspondent à une ou deux espèces moléculaires distinctes. Enfin, les racines semblent contenir un inhibiteur capable de modifier l'activité dans les feuilles. La nature de cet inhibiteur nous est pour l'instant inconnue, mais il est vraisemblablement une des causes de l'échec de la purification de la nitrate réductase de *Cichorium intybus*.

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

- ADAMOWICZ S., 1980. - Mise en évidence des "pools" de nitrates par la méthode de mesure *in vivo* de la nitrate réductase. *Physiol. vég.*, 18, 453-561.
- AFRIDI M.M.R.K. et HEWITT E.J., 1964. - The inductible 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. exp. Bot.*, 15 (44), 251-271.
- AGARWALA S.C., SHARMA C.P., FAROOQ S. et CHATTERJEE C., 1978. - Effect of molybdenum deficiency on growth and metabolism of corn plants raised in sand culture. *Can. J. Bot.*, 56, 1905-1908.
- AMINDARI S., DIRR M.A. et SPLITTSTOESSER W.F., 1978. - Induction of nitrate reductase in pumpkin seedlings. *Plant & Cell Physiol.*, 19, 299-302.
- ANDERSON L.A. et SMILLIE R.M., 1966. - Binding of chloramphenicol by ribosomes from chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 535-539.
- ANDERSON J.W., 1968. - Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, 7, 1973-1978.
- ASHLEY D.A., JACKSON W.A. et VOLK R.J., 1975. - Nitrate uptake and assimilation by wheat seedlings during initial exposure to nitrate. *Plant Physiol.*, 55, 1102-1106.
- 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, 588-591.

ASLAM M., 1977. - Presence of heat-inducible nitrate reductase inhibitor(s) in corn root tip.

*Plant Sci. Lett.*, 9, 89-92.

ASLAM M., OAKS A. et BOESEL I., 1978. - Effect of L-canavanine on nitrate reductase in corn roots.

*Plant Physiol.*, 62, 693-695.

ASLAM M., HUFFAKER R.C., RAINS D.W. et RAO K.P., 1979. - Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings.

*Plant Physiol.*, 63, 1205-1209.

ASLAM M., 1982. - Differential effect of tungsten on the development of endogenous and nitrate-induced nitrate reductase activities in soybean leaves.

*Plant Physiol.*, 70, 35-38.

ATKINS C.A. et CANVIN D.T., 1975. - Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves : effects of inhibitors.

*Planta*, 123, 41-51.

BAHNS M. et GARRETT R.H., 1980. - Demonstration of *de novo* synthesis of *Neurospora crassa* nitrate reductase during induction.

*J. Biol. Chem.*, 225, 690.

- BAKKER N. et VAN HASSELT P.R., 1982. - Photooxidative utilization of nitrate reductase during chilling.  
*Physiol. Plant.*, 54, 414-418.
- BAR-AKIVA A. et SAGIV J., 1967. - Nitrate reductase in the citrus plant : properties, assay conditions and distribution within the plant.  
*Physiol. Plant.*, 20, 500-506.
- BARDZIK J.M., MARSH H.V. et HAVIS J.R., 1971. - Effects of water stress on the activities of three enzymes in maize seedlings.  
*Plant Physiol.*, 47, 828-831.
- BARNETT N.M. et NAYLOR A.W., 1966. - Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress.  
*Plant Physiol.*, 41, 1222-1230.
- 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 sulfhydryl level.  
*Biochim. 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. Plant Physiol.*, 20, 495-522.
- BEN-ZIONI A., ITAI C. et VAADIA Y., 1967. - Water and salt stress, kinetin and protein synthesis in tobacco leaves.  
*Plant Physiol.*, 42, 361-365.

BEN-ZIONI A., VAADIA Y. et LIPS S.H., 1970 a. - Correlations between nitrate reduction, protein synthesis and malate accumulation.

*Physiol. Plant.*, 23, 1039-1047.

BEN-ZIONI A., VAADIA Y. et LIPS S.H., 1970 b. - Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot.

*Physiol. Plant.*, 24, 288-290.

BLAHOVA M. et SEGETA V., 1980. - Nitrate reductase activity in the course of cucumber leaf ontogenesis.

*Biologia Pl.*, 22, (3), 176-182.

BLEVINS D.G., LOVE R.H. et STAPLES L., 1976. - Nitrate reductase in barley roots under steril, low oxygen conditions.

*Plant Physiol.*, 57, 458-459.

BLEVINS D.G., BARNETT N.M. et FROST W.B., 1978 a. - Role of potassium and malate in nitrate uptake and translocation by wheat seedlings.

*Plant Physiol.*, 62, 784-788.

BLEVINS D.G., HIATT A.J., LOWE R.H. et LEGETT J.E., 1978 b. - Influence of K on the uptake, translocation, and reduction of nitrate by barley seedlings.

*Agron. J.*, 70, 393-396.

BONNER J., 1950. - Plant biochemistry.

*Academic Press New York* p: 222-224.

BRUNETTI N. et HAGEMAN R.H., 1976. - Comparaison of *in vivo* and *in vitro* assays of nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings.

*Plant Physiol.*, 58, 583-587.

- BUCZEK J., 1976. - The role of light in the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in cucumber seedlings. *Acta Soc. Biol. Pol.* 65, 77-92.
- BUCZEK J., KOWALINSKA E. et KUCZERA K., 1980. - Reduction of nitrates in *Cucumis sativum* L. seedlings. I. Influence of tungsten and vanadium on absorption and reduction of nitrates. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 49, 259-267.
- BURRIS R.H., 1959. - Nitrogen nutrition. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 10, 301-329.
- BUTZ R.G. et JACKSON W.A., 1977. - A mechanism from nitrate transport and reduction. *Phytochemistry*, 16, 409-417.
- BUVAT R., 1944-45. - Recherches sur la différenciation des cellules végétales. *Thèse Paris*, 228 p.
- CAMPBELL W.H. et SMARRELLI J., 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.
- CANVIN D.T. et ATKINS C.A., 1974. - Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves : effects of light, carbon dioxide and oxygen. *Planta*, 116, 207-224.

- CARELLI M.L.C. et MAGALHAES A.C., 1981. - Development of nitrate reductase activity in green tissues of soybean seedlings (*Glycine max* L. Merr.).  
*Z. Pflanzenphysiol.*, 104, 17-24.
- CHATTERJEE S.R., POKHRIYAL T.C. et ABROL Y.P., 1980. - *In vivo* nitrate reductase activity in barley (*Hordeum vulgare* L.) during ear development.  
*J. Exp. Bot.*, 31, 281-287.
- CHEN T.M. et RIES S.K., 1969. - Effect of light and temperature on nitrate uptake and nitrate reductase activity in rye and oat seedlings.  
*Can. J. Bot.*, 47, 341-343.
- CLEMENT C.R., HOPPER M.J. et JONES L.H.P., 1978. - The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution.  
*J. Exp. Bot.*, 29, 453-464.
- COÏC V., LESAIN C. et LE ROUX F., 1961. - Comparaison de l'influence de la nutrition nitrique et ammoniacale combinée ou non avec une déficience en acide phosphorique sur l'absorption et le métabolisme des anions-cations et plus particulièrement des acides organiques chez le maïs. Comparaison du maïs et de la tomate quant à l'effet de la nature de l'alimentation azotée.  
*Ann. Physiol. vég.*, 3, 141-163.
- COUPE M., CHAMPIGNY M.L. et MOORE A., 1967. - Sur la localisation intracellulaire de la nitrate réductase dans les feuilles et les racines d'orge.  
*Physiol. vég.*, 5, 271-291.
- CUMBUS I.P. et NYE P.H., 1982. - Root zone temperature effects on growth and nitrate absorption in rape (*Brassica napus* cv. Emerald).  
*J. Exp. Bot.*, 33, 1138-1146.

- DATTA N., RAO L.V.M., GUHA-MUKHERJEE S. et SOPORY S.K., 1981. - Regulation of nitrate reductase activity by ammonium in wheat.  
*Plant Sci. Lett.*, 20, 305-313.
- DAVIDIAN J.C. et SALSAC L., 1979. - Interaction anions-cations ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ) et influence sur l'induction de l'activité nitrate réductase dans les racines excisées de maïs.  
*Physiol. vég.*, 17, 375-385.
- DAVIES D.D. et PATIL K.D., 1975. - The control of NAD specific malic enzyme from cauliflower bud mitochondria by metabolites.  
*Planta*, 126, 197-211.
- DEANE-DRUMMOND C.E. et CLARKSON D.T., 1979. - Effect of shoot removal and malate on the activity of nitrate reductase assayed *in vivo* in barley roots (*Hordeum vulgare* cv. Midas).  
*Plant Physiol.*, 64, 660-662
- DEANE-DRUMMOND C.E., CLARKSON D.T. et JOHNSON C.B., 1980. - The effect of differential root and shoot temperature on the nitrate reductase activity assayed *in vivo* and *in vitro* in roots of *Hordeum vulgare* (barley).  
*Planta*, 148, 455-461.
- DEANE-DRUMMOND C.E., 1982. - Mechanism for nitrate uptake into barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Fergus) seedlings grown at controlled nitrate concentrations in the nutrient medium.  
*Plant Sci. Lett.*, 24, 79-89.
- DHINDSA R.S. et CLELAND R.E., 1975. - Water stress and protein synthesis. I. Differential inhibition of protein synthesis.  
*Plant Physiol.*, 55, 778-781.

- DODDEMA H., HOFSTA J.J. et FEENSTRA W.J., 1978. - Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. I. Effect of nitrogen source during growth on uptake of nitrate and chlorate. *Physiol. Plant.*, 43, 343-350.
- DUKE S.H., FRIEDRICH J.W., SCHRADER L.E. et KOUKKARI W.L., 1978. - Oscillations in the activities of enzymes of nitrate reduction and ammonia assimilation in *Glycine max* and *Zea mays*. *Physiol. Plant.*, 42, 269-276.
- EAGLESHAM A.R.J. et HEWITT E.J., 1971. - The regulation of nitrate reductase activity from spinach (*Spinacea oleracea* L.) leaves by thiol compounds in the presence of adenosine-5-diphosphate. *FEBS Letters*, 16, 315-318.
- EVANS H.J. et NASON A., 1953. - Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.*, 28, 233-254.
- EVANS J., 1982. - Nitrate reductase activity in chickpea : a preliminary investigation. *Int. Chickpea Newsl*, 6, 22-23.
- EZETA F.N. et JACKSON W.A., 1975. - Nitrate translocation by detopped corn seedlings. *Plant Physiol.*, 56, 148-156.
- 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.

FERRARIO S., HIREL B. et GADAL P., 1983. - Immuno chemical characterization of nitrate reductase from spinach leaves and roots.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55, 598.

FIALA V., BOMSEL J.L., MONEGER R., TESNIERE C. et JOLIVET E., 1983. - Composition biochimique et qualité commerciale du chicon d'endive : influence de l'état physiologique de la racine et des conditions de forçage.

Dans : *La qualité du chicon. 7ème Biennale Internationale de l'endive* p. G1-G13.

FIDO R.T., HEWITT E.J., NOTTON B.A., JONES O.T.G. et NASRULHAO-BOYCE A., 1979. - Haem of spinach nitrate reductase : low temperature spectrum and mid point potentiel.

*FEBS Letters*, 99, 180-182.

FILNER P., 1966. - Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells.

*Biochim. Biophys. Acta*, 118, 299-310.

FUNKHOUSER E.A. et RAMADOSS C.S., 1980. - Synthesis of nitrate reductase in *Chlorella*. II. Evidence for synthesis in ammonium-grown cells.

*Plant Physiol.*, 65, 944-948.

FUNKHOUSER E.A., SHEN T.C. et ACKERMANN R., 1980. - Synthesis of nitrate reductase in *Chlorella*. I. Evidence for an inactive protein precursor.

*Plant Physiol.*, 65, 939-943.

GASPARIKOVA O., PSENAKOVA T. et NIZNANSKA A., 1978. - Location of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamate dehydrogenase in the *Zea mays* root.

*Biologia*, 33, 35-42.

GAUDINOVA A., 1982. - The effect of leaf insertion on nitrate reductase and glutamine synthetase activity and NO<sub>3</sub>-N content in *Pisum sativum*.

*Biol. Plant.*, 24, 468-470.

- GAUTHERET R.J., 1959. - La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation.  
*Masson et Cie, Paris.*
- GENEVES L., 1972. - Biologie cellulaire.  
*Ed. Dunod Paris, Tome I, 323-324.*
- GODLEWSKA A.E. et ROGOZINSKI J., 1981. - Circadian fluctuation of nitrate reductase activities in seedlings of some winter cereals.  
*Acta Physiol. Plant., 3; 43-49.*
- GODLEWSKA E.A., 1982. - Circadian fluctuation of nitrate reductase activity of some spring cereals.  
*Acta Physiol. Plant., 4, 123-127.*
- GUERRERO M.G., VEGA J.M. et LOSADA M., 1981. - The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation.  
*Ann. Rev. Plant Physiol., 32, 169-204.*
- 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., REED A.J., FEMMER R.A., SHERRARD J.H. et DALLING M.J., 1980. - Some new aspects of the *in vivo* assay for nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Reevaluation of nitrate pool sizes.  
*Plant Physiol., 65, 27-32.*
- HALLAM R. et BLACKWOOD G.C., 1979. - Nitrate reductase activity in wheat (*Triticum sativum* L.). Distribution throughout the leaves.  
*New Phytol., 82, 407-416.*

- HARRIS P. et WHITTINGTON W.J., 1983. - Effects of temperature, levels of nitrate supply and duration of light and growth on nitrate reductase activity in *Agrostis tenuis* and *Agrostis stolonifera*.  
*New Phytol.*, 93, 193-201.
- HATAM M., 1978. - Comparaison of *in vivo* and *in vitro* assays for nitrate reductase activity determination in soybean tissues.  
*Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, (3), 315-318.
- HE W.Z., ZHAO W.E. et TANG Y.W., 1982. - Studies on nitrate reductase. I. Isolation and characteristics of nitrate reductase-inactivating proteins.  
*Acta Phytophysiologia Sinica*, 8, 59-66.
- HEIMER Y.M., WRAY J.L. et FILNER P., 1969. - The effect of tungstate on nitrate assimilation in higher plant tissues.  
*Plant Physiol.*, 44, 1197-1199.
- HEIMER Y.M. et FILNER P., 1970. - Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells. II. Properties of a variant cell line.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 215, 152-165.
- HEIMER Y.M. et FILNER P., 1971. - Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 230, 362-372.
- HELLER R., 1953. - Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*.  
*Thèse Paris 223 p. et Ann. Sci. Nat. Bot.*, 11ème sér., 14, 1-223.
- HEUER B. et PLAUT Z., 1978. - Reassessment of the *in vivo* assay for nitrate reductase in leaves.  
*Physiol. Plant.*, 43, 306-312.

- HEUER B., PLAUT Z. et FEDERMAN E., 1979. - Nitrate and nitrite reduction in wheat leaves as affected by different types of water stress.  
*Physiol. Plant.*, 46, 318-323.
- HEWITT E.J. et AFRIDI M.M.R.K., 1959. - Adaptive synthesis of nitrate reductase in higher plants.  
*Nature*, 183, 57-58.
- HEWITT E.J. et NICHOLAS D.J.D., 1964. - Enzymes of inorganic nitrogen metabolism.  
*In : Modern Methods of Pflanzenanalyse 7. Band. Volume VII, 67-172, Springer-Verlag Berlin Göttingen, Heidelberg.*
- HEWITT E.J., 1975. - Assimilatory nitrate-nitrite reduction.  
*Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, 73-100.
- HSIAO T.C., 1970. - Rapid changes in levels of polyribosomes in *Zea mays* in response to water stress.  
*Plant Physiol.*, 46, 281-285.
- INGLE J.K., JOY K.W. et HAGEMAN R.H., 1966. - The regulation of activity of the enzymes involved in the assimilation of nitrate by higher plants.  
*Biochem. J.*, 100, 577-588.
- INGLE J., 1968. - Nucleic acid and protein synthesis associated with the induction of nitrate reductase activity in radish cotyledons.  
*Biochem. J.*, 108, 715-723.
- 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, 120-127.
- JAWORSKI E.G., 1971. - Nitrate reductase assay in intact plant tissues.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 1274-1279.

- JOLIVET E. , LEFEBVRE S. et DE CONINCK B., 1976. - Détermination de l'état physiologique de la racine tubérisée de Chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* L.) par son pouvoir réducteur à l'égard du 2.6-dichlorophenol-indophenol : application au repérage de la période optimale de forçage.  
*Physiol. vég.*, 14, 849-863.
- JOLLY S.A., CAMPBELL W. et TOLBERT N.E., 1976. - NADPH - and NADH-nitrate reductases from soybean leaves.  
*Arch. Bioch. Biophys.*, 174, 431-439.
- JOLLY S.O. et TOLBERT N.E., 1978. - NADH : nitrate reductase inhibitor from soybean leaves.  
*Plant Physiol.*, 62, 197-203.
- JONES R.W. et SHEARD R.W., 1977. - Conditions affecting *in vivo* nitrate reductase activity in chlorophyllous tissues.  
*Can. J. Bot.*, 55, 896-901.
- JONES R.W. et SHEARD R.W., 1978. - Accumulation and stability of nitrite in intact aerial leaves.  
*Plant Sci. Lett.*, 11, 285-291.
- JORDAN W.R. et HUFFAKER R.C., 1972. - Influence of age and light on the distribution and development of nitrate reductase in greening barley leaves.  
*Physiol. Plant.*, 26, 296-301.
- 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.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 350, 162-170.
- KANNANGARA C.G. et WOOLHOUSE H.W., 1967. - The role of carbon dioxide, light and nitrate in the synthesis and degradation of nitrate reductase in leaves of *Perilla frutescens*.  
*New Phytol.*, 66, 553-561.

- KATO T., 1980. - Nitrogen assimilation by a citrus tree. 2. Assimilation of labelled ammonium and nitrate by leaves in light and dark.  
*Physiol. Plant.*, 50, 304-308.
- KIRKBY E.A. et ARMSTRONG M.J., 1980. - Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate assimilation in the shoot of castor oil plants.  
*Plant Physiol.*, 65, 286-290.
- 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.
- KNYPL J.S., 1977. - Hormonal control of nitrate assimilation : do phytohormones and phytochrome control the activity of nitrate reductase.  
*In : Nitrogen assimilation of plants. Proc. VI Long Ashton Symp., Academic Press Inc./London/Ltd Plubishes, 541-556.*
- KNYPL J.S. et JANAS K.M., 1979. - Light and molybdenum requirements for substrate induction of nitrate reductase in cotyledons of lettuce, *Lactuca sativa* L.  
*Biol. Plant*, 21, 214-219.
- KUO T., KLEINHOF S. A. et WARNER R.L., 1980. - Purification and partial characterization of nitrate reductase from barley leaves.  
*Plant Sci. Lett.*, 17, 371-381.
- KUO T. , WARNER R.L. et KLEINHOF S. A., 1982. - *In vitro* stability of nitrate reductase from barley leaves.  
*Phytochemistry*, 21, 531-533.

- LAWRENCE J.M. et HERRICK H.E., 1982. - Media for *in vivo* nitrate reductase assay of plant tissues.  
*Plant Sci. Lett.*, 24, 17-26.
- LEFEBVRE R., 1977. - Influence de l'anaérobiose sur le bourgeonnement des tissus de racine d'endive (*Cichorium intybus* L.)  
*Rev. Cyt. Biol. vég.*, 40, 185-291.
- LEONG C.C. et SHEN T.C., 1982. - Occurrence of nitrate reductase inhibitor in rice plants.  
*Plant Physiol.*, 70, 1762-1763.
- LEWIS O.A.M., JAMES D.M. et HEWITT E.J., 1982. - Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Mazurka) in response to nitrate and ammonium nutrition.  
*Ann. Bot.*, 49, 39-49.
- LIN W.H. et KAO C.H., 1979. - Factors affecting *in vivo* nitrate reductase activity in triticale.  
*Physiol. Plant.*, 48, 361-364.
- LIPS S.H., 1975. - Enzyme content of plant microbodies as affected by experimental procedures.  
*Plant Physiol.*, 55, 598-601.
- LOOMIS W.D. et BATAILLE J., 1966. - Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes.  
*Phytochemistry*, 5, 423-438.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951. - Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
*J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MACKOWN C.T., VOLK R.J. et JACKSON W.A., 1982. - Nitrate assimilation by decapitated corn root systems : effects of ammonium during induction.  
*Plant Sci. Lett.*, 24, 295-302.

- MALDONADO J.M., NOTTON B.A. et HEWITT E.J., 1978. - Inhibitory effects of ferrocytochrome c on NADH-nitrate reductase activity in spinach (*Spinacea oleracea* L.)  
*Plant Sci. Lett.*, 13, 143-150.
- MARETZKI A. et DE LA CRUZ A. 1967. - Nitrate reductase in sugar cane tissues.  
*Plant & Cell Physiol.*, 8, 605-611.
- MARTINOIA E., HECK U. et WIEMKEM A., 1981. - Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves.  
*Nature*, 289, 292-294.
- MATSUMOTO H., TERAOKA K. et KAWASAKI T., 1980. - Repression of nitrate reductase in cucumber leaves by calcium deficiency.  
*Plant & Cell Physiol.*, 21, 183-191.
- MENGEL K., ROBIN P. et SALSAC L., 1983. - Nitrate reductase activity in shoots and roots of maize seedlings as affected by the form of nitrogen and the pH of the nutrient solution.  
*Plant Physiol.*, 71, 618-622.
- MIFLIN B.J., 1967. - Distribution of nitrate and nitrite reductase in barley.  
*Nature*, 214, 1133-1134.
- MIFLIN B.J., 1968. - Separation of barley root mitochondria into different fractions by density gradient centrifugation.  
*Biochem. J.*, 108, 49.
- MIFLIN B.J., 1970 a. - Nitrite and nitrate reductase systems in barley roots.  
*Rev. Roum. Biochim.*, 7, 53-60.
- MIFLIN B.J., 1970 b. - Studies on the sub-cellular location of particulate nitrate and nitrite reductase, glutamic dehydrogenase and other enzymes in barley roots.  
*Planta*, 93, 160-170.

- MINOTTI P.L. et JACKSON W.A., 1970. - Nitrate reduction in the roots and shoots of wheat seedlings.  
*Planta*, 95, 36-44.
- MORGAN M.A., JACKSON W.A. et VOLK R.J., 1972. - Nitrate absorption and assimilation in raygrass as influenced by calcium and magnesium.  
*Plant Physiol.*, 50, 485-490.
- MORGAN M.A., VOLK R.J. et JACKSON W.A., 1973. - Simultaneous influx and efflux of nitrate during uptake by perennial raygrass.  
*Plant Physiol.*, 51, 267-272.
- MORILLA C.A., BOYER J.S. et HAGEMAN R.H., 1973. - Nitrate reductase activity and polyribosomal content of corn (*Zea mays* L.) having low leaf water potentials.  
*Plant Physiol.*, 51, 817-824.
- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.  
*Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- NAIK M.S. et NICHOLAS D.J.D., 1982. - Regulation of nitrate reduction in wheat leaves.  
*J. Biosci.*, 4, 1-6.
- NEYRA C.A. et HAGEMAN R.H., 1975. - Nitrate uptake and induction of nitrate reductase in excised corn roots.  
*Plant Physiol.*, 56, 692-695.
- NEYRA C.A. et HAGEMAN R.H., 1978. - Pathway for nitrate assimilation in corn (*Zea mays* L.) leaves. Cellular distribution and energy sources for nitrate reduction.  
*Plant Physiol.*, 62, 618-621.
- NGAMBI J.M., AMBLARD P., BISMUTH E. et CHAMPIGNY M.L., 1981. - Etude des activités enzymatiques nitrate réductase et glutamine synthétase liées à l'assimilation des nitrates chez un mil, *Pennisetum americanum* 23 DB.  
*Can. J. Bot.*, 59, 1050-1055.

- 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.
- NICHOLAS J.C., HARPER J.E. et HAGEMAN R.H., 1976 a. - Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). I. Effects of light and temperature. *Plant Physiol.*, 58, 731-735.
- NICHOLAS J.C., HARPER J.E. et HAGEMAN R.H., 1976 b. - Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). II. Energy limitations. *Plant Physiol.*, 58, 736-739.
- NOTTON B.A. et HEWITT E.J., 1971. - Incorporation of radioactive molybdenum into protein during nitrate reductase formation and effect of molybdenum on nitrate reductase and diaphorase activities of spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Plant & Cell Physiol.*, 12, 465-477.
- NOTTON B.A., GRAF L., HEWITT E.J., POREY R.C., 1974. - The role of molybdenum in the synthesis of nitrate reductase in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *bobrytis* L.) and spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, 52, 45-58.
- NOTTON B.A., FIDO R.J. et HEWITT E.J., 1977. - The presence of functional haem in a higher plant nitrate reductase. *Plant. Sci. Lett.*, 8, 165-170.
- NOTTON B.A., FIDO R.J., WATSON E.F. et HEWITT E.J., 1979. - Presence of haem in the tungsten analogue of nitrate reductase and its relationship to dehydrogenase function. *Plant Sci. Lett.*, 14, 85-90.
- NOTTON B.A. et HEWITT E.J., 1979. - Structure and properties of higher plant nitrate reductase, specially *Spinacea oleracea*. In *nitrogen Assimilation of Plants*, Hewitt and Cutting Academic Press, p : 227-244.

- OAKS A. et BIDWELL G.S., 1970. - Compartmentation of intermediary metabolites.  
*Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21, 43-66.
- 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 culture of soybean cells.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 372, 122-126.
- OAKS A., ASLAM M. et BOESEL I.L., 1977. - Ammonium and amino acids as regulators of nitrate reductase in corn roots.  
*Plant Physiol.*, 59, 391-394.
- OAKS A., STULEN I. et BOESEL I.L., 1979. - Influence of amino acids and ammonium on nitrate reduction in corn seedlings.  
*Can. J. Bot.*, 57, 1824-1829.
- OAKS A. et STULEN I., 1980. - Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots.  
*Planta*, 148, 477-484.
- OJI Y. et IZAWA G., 1969 a. - Effects of univalent cations on the formation of nitrate reductase and nitrite reductase in rice seedlings.  
*Plant & Cell Physiol.*, 10, 665-674.
- OJI Y. et IZAWA G., 1969 b. - Flavin nucleotide nitrate reductase from broad bean leaves.  
*Plant & Cell Physiol.*, 10, 743-750.
- ORIHUEL-IRANZO B. et CAMPBELL W.H., 1980. - Development of NAD(P)H : and NADH : nitrate reductase activities in soybean cotyledons.  
*Plant Physiol.*, 65, 595-599.

- PALMER C.E., 1979. - Development of *in vivo* nitrate reductase activity in tuber slices of *Solanum tuberosum* L.  
*Z. Pflanzenphysiol.*, Bd. 93, S. 201-205.
- PALMER C.E., 1981. - Influence of abscissic acid on nitrate accumulation and nitrate reductase activity in potato tuber slices.  
*Plant & Cell Physiol.*, 22, 1541-1551.
- PALMER C.E., 1982. - Abscissic acid stimulation of nitrate reductase activity in potato tuber slices : effect of inhibitors of protein and nucleic acid synthesis.  
*Plant & Cell Physiol.*, 23, 301-308.
- PANEQUE A., DEL CAMPO F.F., RAMIREZ J.M. et LOSADA M., 1965. - Flavin nucleotide nitrate reductase from spinach.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 109, 79-85.
- PANEQUE A. et LOSADA M., 1966. - Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with  $\text{NADH}_2$  and  $\text{NADPH}_2$ .  
*Biochim. Biophys. Acta*, 128, 202-204.
- PAULET P. et NITSCH J.P., 1964. - La néoformation de fleurs sur culture *in vitro* de racines de *Cichorium intybus* L. Etude physiologique.  
*Ann. Physiol. vég.*, 6, 333-345.
- PAULSEN G.M. et HARPER J.E., 1968. - Evidence for a role of calcium in nitrate assimilation in wheat seedlings.  
*Plant Physiol.*, 43, 775-780.
- PFLÜGER R. et WIEDEMANN R., 1977. - Der Eingluß monovalenter Kationen auf die Nitratreduktion von *Spinacea oleracea* L.  
*Z. Pflanzenphysiol.*, 85, 125-133.
- PLAUT Z., 1974. - Nitrate reductase activity of wheat seedlings during exposure to and recovery from water stress and salinity.  
*Physiol. Plant.*, 30, 212-217.

- PORATH J., CARLSSON J., OLSSON I. et BELFRAGE G., 1975. - Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionating. *Nature*, 258, 598-599.
- POULLE, M., 1979. - Etude de la NADH : nitrate reductase d'une suspension cellulaire de *Silene alba* : caractérisation, induction et purification. *Thèse 3è cycle Univ. Lille 1*.
- POULLE M. et RAMBOUR S., 1979. - Mise en évidence de l'induction de la nitrate réductase dans une suspension cellulaire de *Silene alba*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 289, 1105-1108.
- PURVIS A.C. et TISCHLER C.R., 1976. - *In vitro* studies of nitrate reductase activity in cotton cotyledons. *Plant Physiol.*, 58, 95-99.
- PURVIS A.C., TISCHLER C.R. et FUNKHOUSER E.A., 1980. - The nitrate reductase stabilizing factor in cotton seeds. *Physiol. Plant.*, 48, 389-394.
- RADIN J.W., 1973. - *In vivo* assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. Effect of oxygen and ammonium. *Plant Physiol.*, 51, 332-336.
- RADIN J.W., 1974. - Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. *Plant Physiol.*, 53, 458-463.
- RADIN J.W., 1975. - Differential regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of cotton plants. *Plant Physiol.*, 55; 178-182.
- RADIN J.W., 1977. - Amino acid interactions in the regulation of nitrate reductase induction in cotton root tips. *Plant Physiol.*, 60, 467-469.

- RADIN J.W., 1978. - A physiological basis for the division of nitrate assimilation between roots and leaves.  
*Plant Sci. Lett.*, 13, 21-25.
- RADIN J.W., PARKER L.L. et SELL C.R., 1978. - Partitioning of sugar between growth and nitrate reduction in cotton roots.  
*Plant Physiol.*, 62, 550-553.
- RAINS D.W., SCHMID W.E. et EPSTEIN E., 1964. - Absorption of cations by roots. Effects of hydrogen ions and essential role of calcium.  
*Plant Physiol.*, 39, 274-278.
- RAMARAO C.S., SRINIVASAN et NAIK M.S., 1981 a. - Inhibition of *in vivo* dark anaerobic nitrate reduction by succinate, malonate and D-malate.  
*Plant. Sci. Lett.*, 20, 219-223.
- RAMARAO C.S., SRINIVASAN et NAIK M.S., 1981 b. - Origin of reductant for reduction of nitrate and nitrite in rice and wheat leaves *in vivo*.  
*New Phytol.*, 87, 517-525.
- RAO K.P. et RAINS D.W., 1976 a. - Nitrate absorption by barley. I. Kinetics and energetics.  
*Plant Physiol.*, 57, 55-58.
- RAO K.P. et RAINS D.W., 1976 b. - Nitrate absorption by barley. II. Influence of nitrate reductase activity.  
*Plant Physiol.*, 57, 59-62.
- REDINBAUGH M.G. et CAMPBELL W.H., 1981. - Purification and characterization of NAD(P)H : nitrate reductase and NADH : nitrate reductase from corn roots.  
*Plant Physiol.*, 68, 115-120.
- REDINBAUGH M.G., MAHONY W.B. et CAMPBELL W.H., 1982. - Purification and the molecular weight of nitrate reductase.  
*Plant Physiol.*, 69 S, 643.

- REDINBAUGH M.G. et CAMPBELL W.H., 1983. - Purification of squash NADH-nitrate reductase by zinc chelate affinity chromatography. *Plant Physiol.*, 71, 205-207
- REED A.J. et HAGEMAN R.H., 1980 a. - Relationship between nitrate uptake, flux and reduction and the accumulation of reduced nitrogen in maize (*Zea mays* L.). I. Genotypic variation. *Plant Physiol.*, 66, 1179-1183.
- REED A.J. et HAGEMAN R.H., 1980 b. - Relationship between nitrate uptake, flux and reduction and the accumulation of reduced nitrogen in maize (*Zea mays* L.). II. Effect of nutrient nitrate concentration. *Plant Physiol.*, 66, 1184-1189.
- RELIMPIO A.M., APARICIO P.J., PANEQUE A. et LOSADA M., 1971. - Specific protection against inhibitors of the NADH-nitrate reductase complex from spinach. *FEBS Letters*, 17, 226-230.
- RHODES P.R. et MATSUDA K., 1976. - Water stress, rapid polyribosome reductions and growth. *Plant Physiol.*, 58, 631-635.
- RITENOUR G.L., JOY K.W., BUNNING J. et HAGEMAN R.H., 1967. - Intracellular localization of nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamic acid dehydrogenase in green leaf tissues. *Plant Physiol.*, 42, 233-237.
- ROBIN P., 1979. - Etude de quelques conditions d'extraction de la nitrate réductase des racines et des feuilles de plantes de maïs. *Physiol. vég.*, 17 (1), 45-54.

ROBIN P., BLAYAC D. et SALSAC L., 1979. - Influence de l'alimentation nitrique sur la teneur en nitrate et l'activité nitrate réductase des racines et des feuilles de plantules de maïs.

*Physiol. vég.*, 17 (1), 55-66.

ROBIN P., CONEJERO G., PASSAMA L. et SALSAC L., 1983 a. - Evaluation de la fraction métabolisable du nitrate par la mesure *in situ* de sa réduction.

*Physiol. vég.*, 21, 115-122.

ROBIN P., CONEJERO G., TRANCHANT J.P., PASSAMA L. et SALSAC, 1983 b. - Mesure de la réduction du nitrate dans les feuilles intactes.

*Physiol. vég.*, 21, 123-128.

ROTH-BEJERAMO N. et LIPS S.H., 1970 a. - Hormonal regulation of nitrate reductase activity in leaves.

*New Phytol.*, 69, 165-169.

ROTH-BEJERAMO N. et LIPS S.H., 1970 b. - Seasonal characteristics of the daily fluctuation in nitrate reductase activity.

*Physiol. Plant.*, 23, 530-535

ROUSTAN J.L., NEUBURGER M. et FOURCY A., 1974. - Nitrate reductase of maize leaves. Some properties.

*Physiol. vég.*, 12, 527-544.

RUFTY T.W., JACKSON W.A. et RAPER C.D., 1981. - Nitrate reduction in roots as affected by the presence of potassium and by flux of nitrate through the root.

*Plant Physiol.*, 68, 605-609.

RUFTY T.W., JACKSON W.A. et RAPER C.D., 1982. - Inhibition of nitrate assimilation in roots in the presence of ammonium : the moderating influence of potassium.

*J. Exp. Bot.*, 33, 1122-1137.

- 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.*, 19, 113-128
- SAHULKA J. et LIŠA L., 1978. - The influence of sugars on nitrate reductase induction by exogenous nitrate or nitrite in excised *Pisum sativum* roots.  
*Biol. Plant.*, 20, 359-367.
- 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.
- SASAKAWA H. et YAMAMOTO Y., 1977 a. - Influence of some internal and external conditions of the induction of nitrate reductase in rice seedlings.  
*Plant & Cell Physiol.*, 18, 207-214.
- SASAKAWA H. et YAMAMOTO Y., 1977 b. - Nitrate assimilation in rice seedlings as affected by mineral nutrition.  
*Plant & Cell Physiol.*, 18, 215-224.
- SASAKAWA H. et YAMAMOTO Y., 1978. - Comparaison of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings. Influence of light, temperature, oxygen concentration, exogenous sucrose, and metabolic inhibitors.  
*Plant Physiol.*, 62, 665-669.
- 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; 647-648.

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 reductase in green leaf tissue.

*Biochem. Biophys. Res. 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.

SCHRADER L.E. et VOGELZANG R.D., 1974. - Nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities as influenced by leaf age and addition of protein to extraction media.

*Physiol. Plant.*, 32, 337-341.

SHANER D.L. et BOYER J.S., 1976 a. - Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux.

*Plant Physiol.*, 58, 499-504.

SHANER D.L. et BOYER J.S., 1976 b. - Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.). II. Regulation by flux at low water potential.

*Plant Physiol.*, 58, 505-509.

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., FUNKHOUSER E.A. et GUERRERO M.G., 1976. - NADH- et NAD(P)H- nitrate reductase in rice seedlings.

*Plant Physiol.*, 58, 292-294.

SHERRARD J.H. et DALLING M.J., 1979. - *In vitro* stability of nitrate reductase from wheat leaves. I. Purification of nitrate reductase and its effect on stability.

*Plant Physiol.*, 63, 346-353.

SHERRARD J.H., KENNEDY J.A. et DALLING M.J., 1979 a. - *In vitro* stability of nitrate reductase from wheat leaves. II. Isolation of factors from crude extract which affect stability of highly purified nitrate reductase.

*Plant Physiol.*, 64, 439-444.

SHERRARD J.H., KENNEDY J.A. et DALLING M.J., 1979 b. - *In vitro* stability of nitrate reductase from wheat leaves. III. Isolation and partial characterization of a nitrate reductase-inactivating factor.

*Plant Physiol.*, 64, 640-645.

SHIBATA M., KOBAYASHI M. et TAKAHASHI E., 1969. - The possibility of photo-induced induction of nitrate reductase in rice seedlings.

*Plant & Cell Physiol.*, 10, 337-348.

SIHAG R.K., GUHA-MUKHERJEE S. et SOPORY S.K., 1978. - Regulation of nitrate reductase level in pea : *in vivo* stability by ammonium.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 1017-1024.

- SIMMONS S.R. et MOSS D.N., 1978. - Nitrate reductase as a factor affecting N assimilation during the grain filling period in spring wheat.  
*Crop Sci.*, 18, 584-586.
- SLUITERS-SCHOLTEN C.M.Th., 1973. - Effect of chloramphenicol and cycloheximide on the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in bean leaves.  
*Planta*, 113, 229-240.
- SMITH F.W. et THOMPSON J.F., 1971. - Regulation of nitrate reductase in excised barley roots.  
*Plant Physiol.*, 48, 219-223.
- SOLOMONSON L.P., 1975. - Purification of NADH-nitrate reductase by affinity chromatography.  
*Plant Physiol.*, 56, 853-855.
- SOLOMONSON L.P., 1979. - Structure of *Chlorella* nitrate reductase.  
*In nitrogen Assimilation of Plants, Hewitt and Cutting Academic Press*, 199-205.
- SOMERS D.A., KUO T., KLEINHOF A. et WARNER R.L., 1982. - Barley nitrate reductase contains a functional cytochrome <sup>b</sup><sub>557</sub>.  
*Plant Sci. Lett.*, 24, 261-265.
- SOMERS D.A., KUO T., KLEINHOF A. et WARNER R.L., 1983. - Nitrate reductase-deficient mutants in barley. Immunoelectrophoretic characterization.  
*Plant Physiol.*, 71, 145-149.
- SRIVASTAVA O.P. et VAN HUYSTEE R.B., 1977. - Interactions among phenolics and peroxidase isoenzymes.  
*Bot. Gaz.*, 138, 457-464.

- STEER B.T., 1974. - Control of diurnal variations in photosynthetic products. II. Nitrate reductase activity.  
*Plant Physiol.*, 54, 762-765.
- STEER B.T., 1976. - Rhythmic nitrate reductase activity in leaves of *Capsicum annuum* L. and the influence of kinetin.  
*Plant Physiol.*, 57, 928-932.
- STEER B.T., 1982. - Nitrogen and nitrate accumulation in species having different relationships between nitrate uptake and reduction.  
*Ann. Bot.*, 49, 191-198.
- STOCKING C.R., 1959. - Chloroplast isolation in non-aqueous media.  
*Plant Physiol.*, 34, 56-61.
- SUBBALAKSHMI B., SINGH S.P., PRAKASH S. et NAIK M.S., 1979. - Regulation of nitrate reduction in wheat and rice leaves by oxygen and NADH supply.  
*Plant Sci. Lett.*, 14, 133-137.
- TIMPO E.E. et NEYRA C.A., 1983. - Expression of nitrate and nitrite reductase activities under various forms of nitrogen nutrition in *Phaseolus vulgaris* L.  
*Plant Physiol.*, 72, 71-75.
- TISCHLER C.R., PURVIS A.C. et JORDAN W.R., 1978. - Factors involved in *in vitro* stabilization of nitrate reductase from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cotyledons.  
*Plant Physiol.*, 61, 714-717.
- TOMPKINS G.A., JACKSON W.A. et VOLK R.J., 1978. - Accelerated nitrate uptake in wheat seedlings : effects of ammonium and nitrite pretreatments and of 6-methylpurine and puromycin.  
*Physiol. Plant.*, 43, 166-171.

TONNELAT J., 1978. - Thermodynamique et biologie. II. L'ordre issu du hasard.  
*Maloine, Paris.*

TOURAINÉ B. et GRIGNON C., 1982. - Potassium effect on nitrate secretion into the xylem of corn roots.  
*Physiol. vég.*, 20, 23-31.

TRAVIS R.L., JORDAN W.R. et HUFFAKER R.C., 1969. - Evidence for an inactivating system of nitrate reductase in *Hordeum vulgare* L. during darkness that requires protein synthesis.  
*Plant Physiol.*, 44, 1150-1156.

TRAVIS R.L., HUFFAKER R.C. et KEY J.L., 1970 a. - Light-induced development of polyribosomes and the induction of nitrate reductase in corn leaves.  
*Plant Physiol.*, 46, 800-805.

TRAVIS R.L., JORDAN W.R. et HUFFAKER R.C., 1970 b. - Light and nitrate requirements for induction of nitrate reductase activity in *Hordeum vulgare*.  
*Physiol. Plant.*, 23, 678-685.

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.

TRIBOI-BLONDEL A.M., 1978. - Effets de différents régimes d'alimentation hydrique sur l'activité *in vivo* de la nitrate réductase dans les feuilles de dactyle.  
*C.R. Acad. Sc. Paris*, 286, 1795-1798.

- VAIDYANATHAN C.S. et STREET H.E., 1959. - Nitrate reduction by aqueous extracts of excised tomato roots. *Nature*, 184, 531-533.
- VAN STEVENINCK R.F.M. et VAN STEVENINCK M.E., 1972. - Effects of inhibitors of protein and nucleic acid synthesis on the development of ion uptake mechanisms in beetroot slices (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.*, 27, 407-411.
- VASSEUR J., 1965. - Sur les conditions de culture *in vitro* des tissus de feuilles d'endive. *Bull. Soc. Bot. Nord France*, 18, 205-212.
- VASSEUR J., 1979 a. - Etude du bourgeonnement des fragments de feuilles étiolées d'endive. I. Formation des bourgeons en fonction des caractéristiques physiologiques. *Rev. gén. Bot.*, 88, 35-106.
- VASSEUR J., 1979 b. - Etude du bourgeonnement des fragments de feuilles étiolées d'endive. II. Formation des bourgeons en fonction des caractéristiques biochimiques. *Rev. gén. Bot.*, 86, 113-190.
- VENNESLAND B., 1980. - HCN and the control of nitrate reduction. The regulation of the amount of active nitrate reductase present in *Chlorella* cells. *In Biology of nitrogen and sulfur metabolism* H. Bothe, A. Trebst/Springer Verlag.
- VIJAYARAGHAVAN S.J., SOPORY S.K. et GUHA-MUKHERJEE S., 1979. - Ammonium stimulation of nitrate reductase induction in excised leaves of wheat (*Triticum sativum*). *Z. Pflanzenphysiol.*, 93, 395-402.
- WALLACE W. et PATE J.S., 1965. - Nitrate reductase in the field pea (*Pisum arvense* L.) *Ann. Bot.*, 29, 655-671.

- WALLACE W. et PATE J.S., 1967. - Nitrate assimilation in higher plants with special reference to the cocklebur (*Xanthium pennsylvanicum* Wallr).  
*Ann. Bot.*, 31, 213-228.
- WALLACE W., 1973 a. - A nitrate reductase inactivating enzyme from the maize root.  
*Plant Physiol.*, 52, 197-201.
- WALLACE W., 1973 b. - The distribution and characteristics of nitrate reductase and glutamate dehydrogenase in the maize seedlings.  
*Plant Physiol.*, 52, 191-196.
- WALLACE W., 1975. - A re-evaluation of the nitrate reductase content of the maize roots.  
*Plant Physiol.*, 55, 774-777.
- WALLSGROVE R.M., LEA P.J. et MIFLIN B.J., 1979. - Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell.  
*Plant Physiol.*, 63, 232-236
- WEISSMAN G., 1972. - Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower.  
*Plant Physiol.*, 49, 138-141.
- WELLS G.M. et HAGEMAN R.H., 1974. - Specificity for nicotinamide adenine dinucleotide by nitrate reductase from leaves.  
*Plant Physiol.*, 54, 136-141.
- 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., OAKS A. et BOESEL I.L., 1980. - Characteristics of nitrate reductase-inactivating proteins obtained from corn roots and rice cell cultures.  
*Plant Physiol.*, 65, 141-145.
- YONEYAMA T., 1981. - <sup>15</sup>N studies on the *in vivo* assay of nitrate reductase in leaves : occurrence of underestimation of the activity due to dark assimilation of nitrate and nitrite.  
*Plant & Cell Physiol.*, 22, 1507-1520.
- 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.  
*J. Biol. Chem.*, 246, 1772-1779.

## RESUME

Lors du développement de *Cichorium intybus*, la nitrate réductase est très active dans les racines avant leur tubérisation puis les feuilles prennent le relais dans la réduction du nitrate. A la fin de la première année de végétation, l'activité enzymatique est essentiellement localisée dans les feuilles et dans une zone racinaire située sous le collet. Lorsque de telles racines sont mises en forçage, en vue d'obtenir un bourgeon étioilé (endive), l'activité de la nitrate réductase se manifeste surtout dans les jeunes racines secondaires. Elle est nulle dans les feuilles étioilées et le demeure même si ces plantes sont mises à la lumière. Lors de la culture *in vitro* de fragments racinaires ou foliaires, l'activité apparaît dès les premières heures, impliquant une synthèse ou une activation de l'enzyme. La transplantation des explants racinaires au 5ème jour sur un milieu neuf aboutit à une faible augmentation de l'activité enzymatique. La stabilisation de l'enzyme est rendue possible par la présence de Polyclar dans le tampon d'extraction. L'enzyme extraite montre une activité NADH et une activité NADPH. Elle présente donc une bispécificité vis à vis du donneur d'électrons. Des inhibiteurs sont mis en évidence au niveau des racines mais leur nature reste inconnue.

Mots clés : Nitrate réductase NAD, NADP - nitrate -  
Chicorée - Endive - Forçage - Racine  
Culture sans sol - Organogenèse