

50376

1986

191

N° d'ordre : 698

50376

1986

191

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Serge RAMBOUR



LA NITRATE REDUCTASE MARQUEUR DE LA CROISSANCE CELLULAIRE ET DE LA DIFFERENCIATION ORGANOGÈNE ?

ETUDE DE SA REGULATION DANS UNE SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE ET DES TISSUS DE CHICOREE DE BRUXELLES CULTIVES IN VITRO.

Soutenue le ^{Novembre} 7 ~~Septembre~~ 1986 devant la Commission d'Examen

M.	R.	BOURIQUET	Professeur, Université de Lille,	Président et Rapporteur
M.	J.	KREMBEL	Professeur, Université de Lille,	Rapporteurs
M.	B.A.	NOTTON	Professeur, Université de Bristol,	
M.	J.	DAUSSANT	Directeur de Recherches, CNRS Meudon	Examineurs
M.	P.	ROBIN	Maître de Recherches, INRA Montpellier	

La finalité du travail présenté ici n'était pas de "faire une thèse" mais de contribuer à la compréhension des mécanismes de la différenciation organogène qui est l'un des thèmes majeurs du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Lille-Flandres Artois.

L'étude de la régulation de la nitrate réductase de suspensions cellulaires ou de tissus capables de former des bourgeons ou des racines, se voulait une modeste participation à l'avancement d'une connaissance théorique, à une époque où une telle préoccupation n'était pas considérée comme un acte gratuit ou futile.

Je voudrais ici exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur R. BOURIQUET, qui dirige le Laboratoire, pour la liberté d'action et la confiance qu'il m'a accordées dans la conduite de ce travail. Je lui sais grè de m'avoir confié la direction d'étudiants inscrits au D.E.A. ou en thèse de 3ème cycle. Cette collaboration avec des chercheurs débutants a été pour moi une expérience très enrichissante et je voudrais remercier ici pour leur patience et leur persévérance, Michel POULLE, Véronique DORCHIES, Jean-Luc DANIAU, Caroline RAMBAUD et Ali CHRAIBI.

Mes remerciements vont aussi à Messieurs DAUSSANT, KREMBEL, NOTTON et ROBIN, qui ont accepté de lire ce mémoire et qui siègent à ce jury d'examen. Monsieur J. DAUSSANT m'a fait bénéficier de ses compétences en immunologie au cours d'un stage extrêmement bénéfique que j'ai effectué dans son laboratoire, voici quelques années. Grâce à l'aide du British Council et de l'Université de Lille-Flandres Artois, j'ai pu, au cours de séjours dans son laboratoire de Long Ashton, avoir de fructueux échanges avec le Docteur B.A. NOTTON qui m'a fait profiter de la grande expérience qu'il a acquise dans l'étude de la nitrate réductase.

Je dois à mes collègues Jean DUBOIS et Jacques VASSEUR d'avoir remis le pied à l'étrier de la recherche. De constantes et longues discussions nous ont amenés à collaborer de plus en plus étroitement. Espérons que la tâche entreprise ne périra pas faute de moyens ; la conquête de nouvelles frontières en exige beaucoup.

Je tiens à remercier tout particulièrement Colette BRASSART, Ingénieur d'Etudes au C.N.R.S., pour l'aide précieuse et constante qu'elle a apportée à la réalisation de ce travail. Jamais elle n'a compté son temps et s'est toujours conduite en chercheur à part entière. Suite à la "restructuration" du C.N.R.S., son départ du Laboratoire va nous priver de sa gentillesse et de ses compétences.

Je ne saurais oublier la contribution décisive de Michel POULLE. Travailleur infatigable, il a eu la mission ô combien délicate d'entreprendre la purification de la nitrate réductase du Silène. Son obstination lui a valu de réussir... et de devoir s'expatrier Outre Atlantique. Bonne chance, Michel, là bas, ils ont beaucoup de chance de vous avoir.

Je voudrais remercier enfin le personnel technique et de service du laboratoire pour l'aide qu'il m'a apportée. Je saluerai tout particulièrement la patience et la servabilité de Madame Claudine JOVENIN à qui a incombé la tâche redoutable de déchiffrer et de dactylographier le manuscrit. Bien qu'elle n'ait pas bénéficié d'une formation particulière, elle a dompté l'ordinateur et a réussi à lui faire accepter la bibliographie, ce n'est pas là le moindre de ses mérites.

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

*La science, pas plus que l'art-
et moins que lui, j'imagine- n'atteint
"la chose en soi".*

*La science, comme l'art, n'est
qu'un système d'illusion, c'est-à-dire
de conquête.*

*ELIE FAURE
(L'esprit des formes)*

Pour qui a attentivement observé un arbre et a quelque peu réfléchi à son mode de vie, il apparaît à l'évidence qu'y coexistent des éléments morts et d'autres vivants capables de former continuellement de nouveaux rameaux qui pourront éventuellement être greffés, marcottés ou bouturés. Cette capacité de régénération des végétaux supérieurs, n'a pratiquement pas d'équivalent chez les vertébrés dont seules quelques espèces ont la possibilité de régénérer tout au plus un organe.

Malgré les progrès extraordinaires de la biologie contemporaine, elle est pour l'instant incapable de fournir une explication globale satisfaisante à un tel phénomène.

Bien sûr on sait que l'embryon végétal présente un développement particulier en ce qu'il demeure une morula qui subit un allongement longitudinal bipolaire, si bien qu'un végétal adulte conservera toute sa vie durant, des cellules embryonnaires. Mais la culture *in vitro* de tissus végétaux a montré que des cellules spécialisées (différenciées) sont tout aussi capables de perdre leur spécialisation, donc de se dédifférencier et de retrouver ainsi des caractéristiques de cellules embryonnaires qui pourront se différencier ensuite.

Ce genre d'observations a conduit les biologistes à considérer que les cellules végétales conservent toutes leurs potentialités différenciatrices, qu'elles sont donc totipotentes. Pourtant le bouturage naturel ou "*in vitro*" n'est pas réalisable chez toutes les espèces. On peut alors se demander si le concept de totipotence constitue un dogme ou s'il recouvre une réalité. Deux hypothèses peuvent être envisagées : ces échecs sont dûs, ou bien

à notre méconnaissance profonde des facteurs qui gouvernent la dédifférenciation comme la différenciation, ou bien à l'impossibilité fondamentale pour une espèce donnée de voir se dérouler la succession des événements qui aboutiront à la reproduction végétative d'un nouvel individu. Il est en effet concevable que la capacité de différenciation, tout comme le vieillissement qui en est le terme ultime soit ou bien génétiquement programmé, ou bien conditionné par les variations des facteurs environnementaux. On a en effet de bonnes raisons de penser actuellement que la senescence résulte de l'achèvement de la lecture du programme génétique contenu dans chaque espèce ou d'une accumulation d'erreurs moléculaires et de mutations somatiques. Dans ces conditions il est possible que les possibilités de multiplication végétative soient perdues ou fortement amoindries chez certaines espèces et conservées chez d'autres.

Ces considérations rejoignent d'ailleurs l'hypothèse de CHANGEUX et DANCHIN (1976), selon laquelle le programme génétique prévoit les grandes lignes de l'organisation d'un être vivant, alors que le milieu *sculpte* les modalités de son fonctionnement. Par ailleurs : il est maintenant bien établi que les intermédiaires indispensables au déroulement du programme de développement sont généralement les hormones.

Le passage de l'état végétatif à l'état reproducteur illustre à notre sens parfaitement cette théorie, même si la nature exacte de certains facteurs (le stimulus floral par exemple) reste inconnue. Un ou plusieurs facteurs florigènes dérèpriment un ensemble de gènes désignés globalement sous le

terme de gènes de la floraison, qui vont déterminer la forme et la disposition spatiale des fleurs. D'autre part la durée relative du jour et de la nuit intervient parfois par un processus de tout ou rien et va par conséquent permettre ou interdire la mise à fleur. Bien sûr il existe des espèces qui ne présentent pas d'exigences strictes de conditions de milieu. Dans ce cas on peut très bien concevoir l'existence d'un mécanisme quantitatif de la floraison, qui consiste en une succession de changements internes qui accompagnent la mise à fleur. Mais là encore les facteurs externes semblent moduler la morphogenèse florale de façon importante (KREKULE, 1979).

L'un des faits essentiels de la différenciation est donc la synthèse de macromolécules qui par auto-assemblage spontané, s'arrangent en structures tridimensionnelles stables. On sait maintenant que cette synthèse est sous la dépendance de gènes qui sont identiques dans toutes les cellules qu'elles soient embryonnaires ou spécialisées. Comme toutes ces cellules n'ont pas la même capacité de produire d'autres cellules, leur activité fonctionnelle est différente. Ceci doit se traduire par un masquage sélectif, soit au contraire par une activation sélective de certaines gènes dans un tissu donné et à un moment déterminé de la vie. L'activation d'un gène se soldant par la synthèse d'une enzyme constitue l'induction enzymatique. Un très bel exemple d'un tel phénomène est la production d' α amylases dans le grain d'Orge lors des premiers stades de la germination. L'hormone responsable de l'induction est l'acide gibbérellique. Les β amylases par contre existent dans le grain sec et sont synthétisées au cours de la maturation de la graine.

D'autres enzymes sont inductibles par de simples modifications du milieu extérieur : c'est le cas de la nitrate réductase qui est généralement induite par son substrat (HEWITT, 1975).

Pourtant si l'on est actuellement capable d'expliquer de façon assez satisfaisante comment un gène est régulé, on est toujours incapable d'expliquer pourquoi une cellule embryonnaire dotée d'un certain type de fonctionnement se met soudain à évoluer vers des types cellulaires différents où les potentialités génétiques s'exprimeront d'une autre façon. Le problème est bien sûr posé de la même manière lorsque l'on étudie les capacités de différenciation de tissus spécialisés.

C'est dans ce contexte qu'il faut situer ce travail. Il n'est qu'une modeste contribution à de nombreuses tentatives menées pour essayer d'apporter une réponse à une aussi vaste interrogation qui pourrait bien relever autant de la métaphysique que de la science. Il a été mené dans le cadre d'un laboratoire dont l'une des préoccupations majeures depuis presque vingt ans est la connaissance des modalités de la différenciation organogène de tissus végétaux cultivés *in vitro*. Le matériel choisi est *Cichorium intybus* L. (var. Witloof cv Zoom) ou Chicorée de Bruxelles non pas parce qu'elle constitue une culture importante de notre région mais parce que sa racine pivotante, comme ses feuilles possèdent de remarquables propriétés organogènes. Les travaux de VASSEUR (1979) ont abouti à la conclusion que la différenciation organogène d'explants racinaires s'effectue en deux étapes successives. La première

consiste en une activation cellulaire qui aboutit à la formation de nodules méristématiques, alors que la seconde est une phase préparatoire à la différenciation proprement dite. Ce schéma est le résultat de l'étude des modifications histologiques et des variations des teneurs et des synthèses de l'ADN, des ARN et des protéines qui interviennent dans des explants tissulaires de *Cichorium intybus* cultivés *in vitro* (VASSEUR et ROGER, 1983).

Après avoir contribué à une partie de ce travail, nous avons été amené à essayer de préciser certains points de ce modèle. Pour employer un langage actuel nous sommes partis à la recherche d'un marqueur de l'organogenèse. On pouvait en effet raisonnablement espérer trouver une protéine, si possible enzymatique, qui serait spécifique d'un organe donné. Bien sûr la ribulose biphosphate carboxylase qui peut représenter jusqu'à 50 % des protéines foliaires pouvait constituer ce marqueur, mais sa régulation est complexe puisque certaines sous-unités sont sous le contrôle de gènes nucléaires, d'autres sous le contrôle de gènes chloroplastiques ; de plus notre matériel de départ n'est pas chlorophyllien. Nous avons alors jeté notre dévolu sur la nitrate réductase. D'abord elle est une enzyme clé dans la régulation de la chaîne d'assimilation de l'azote minéral (LOSADA et al., 1981). De plus elle est inductible par son substrat et localisée chez certaines espèces soit dans les feuilles, soit dans les racines. Enfin à l'époque où nous avons entrepris ce travail, nous étions émerveillés par l'essor fantastique de la BIOLOGIE MOLECULAIRE et fort heureusement totalement inconscients de la difficulté de l'entreprise.

Nous savions néanmoins que la mise en culture d'un simple fragment de racine ou de feuille d'Endive ⁽¹⁾ amène inexorablement l'apparition de plusieurs types d'évènements à savoir la callogenèse, la rhizogenèse et la caulogenèse, dont les manifestations se chevauchent dans le temps. Bien sûr, en modifiant les facteurs environnementaux, on peut réprimer l'émergence de tel ou tel type d'organe, mais les ébauches se forment néanmoins dans l'explant. Par ailleurs, les problèmes de la régulation de la division cellulaire et de la différenciation semblent étroitement intriqués. Aussi, avons nous été amenés à aborder le problème par une approche plus réductionniste en étudiant d'abord la régulation de la nitrate réductase dans une suspension cellulaire non chlorophyllienne, matériel apparemment plus simple et plus homogène et qui ne présente que des phénomènes de division cellulaire. Pour des raisons uniquement conjoncturelles nous avons choisi la suspension du *Silene alba*. Nous espérons par là aboutir à l'élaboration d'un modèle qui serait transposable aux cellules en division d'explants racinaires ou foliaires d'Endive cultivés *in vitro*. Comme ces cellules vont ensuite se spécialiser, on pourrait alors suivre l'évolution de la nitrate réductase au cours de leur différenciation organogène.

(1) Bien que le terme Endive, représente le bourgeon étiolé de *Cichorium intybus* produit au cours du forçage de la racine tubérisée, nous l'avons pour des raisons de commodité utilisé en tant que nom générique.

H I S T O R I Q U E

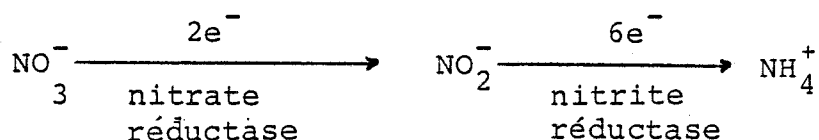
*Connaître c'est moins buter
contre un réel que valider un possible
en le rendant nécessaire.*

*Dès lors la genèse du possible
importe autant que la démonstration du
nécessaire.*

GEORGES CANGUILHEM
(La connaissance de la vie)

Pour satisfaire leurs besoins nutritifs, la plupart des végétaux utilisent de l'azote minéral combiné, qu'ils prélèvent dans la solution du sol sous la forme d'ions nitrate ou ammonium.

La réduction assimilatrice du nitrate s'effectue en deux étapes successives catalysées par la nitrate réductase puis la nitrite réductase, selon le schéma suivant :



La conversion de l'azote ammoniacal en azote α aminé passe par deux voies métaboliques principales : celle de la glutamate déshydrogénase et celle du couple glutamine synthétase - glutamate synthase (LEA et MIFLIN, 1976).

La réduction du nitrate est un processus biologique fondamental : elle aboutit en effet à la fixation d'environ 20 000 mégatonnes d'azote par an, alors que la quantité d'azote moléculaire fixé est approximativement de 200 mégatonnes pour une durée identique. Par ailleurs, elle constitue chez les plantes vertes un processus photosynthétique dans lequel le pouvoir réducteur ultime est fourni par l'eau, aux dépens de l'énergie solaire (LOSADA et GUERRERO, 1979). Dans les systèmes non photosynthétiques, comme la suspension cellulaire du *Silene*, l'origine du pouvoir réducteur pose un problème complexe que nous examinerons ci-après.

La réduction du nitrate joue par conséquent un rôle essentiel non seulement parce qu'elle concourt à l'incorporation d'azote minéral dans la biomasse terrestre,

mais aussi parce qu'elle représente un phénomène physiologique capital pour de nombreuses cellules végétales.

Il n'est donc pas étonnant que l'étude de la réduction du nitrate et de la nitrate réductase en particulier, ait suscité l'intérêt de tant de chercheurs et donné lieu à un nombre impressionnant de publications. Aussi ne pouvons nous pas, dans le cadre que nous nous sommes assigné, présenter une bibliographie exhaustive concernant la nitrate réductase. Nous n'en avons donc retenu que certains aspects immédiatement utiles à la compréhension de notre travail et à la discussion des résultats.

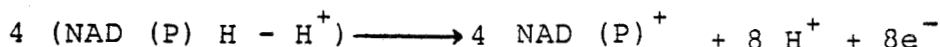
I - LA REDUCTION DU NITRATE : ASPECTS ENERGETIQUES,
SOURCE DU POTENTIEL REDUCTEUR. NOTION DE pH STAT
BIOCHIMIQUE.

1) Aspects énergétiques

La lecture des manuels français de Physiologie végétale mis à la disposition des étudiants, laisse le lecteur perplexe. C'est en effet avec la même assurance tranquille que les uns affirment que la réduction du nitrate est un phénomène exergonique alors que pour les autres, il est endergonique. Aussi avons nous tenté d'élucider ce point.

La réduction du nitrate utilise 8 électrons et 8 protons : quelle est leur origine ?

Chez les Cyanobactéries et sans doute aussi chez les Bactéries photosynthétiques et chimiotrophes, le donneur est la ferredoxine réduite ; chez les Eucaryotes c'est le NADH ou le NADPH qui fournissent les électrons selon la réaction.



Passant de NAD (P) H au couple $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ces électrons doivent remonter une différence de potentiel d'oxydo réduction de + 0,69 V, ce qui entraîne une variation d'enthalpie libre ΔG° de -535KJ (-128 kCal). Cette réaction est donc très nettement exergonique. Quant à l'étape qui réduit le NO_2^- en NH_4^+ , elle exige six électrons qui remontent une différence de potentiel de + 0,68 V, la valeur ΔG° est alors de -392KJ (-94 kCal) ce qui signifie donc que cette étape est également exergonique.

Si par contre le mécanisme exact de l'absorption du NO_3^- n'est pas connu, on sait qu'il exige de l'énergie et qu'il représente par conséquent un processus endergonique (ROBIN et al., 1978) qui exigerait une mole d'ATP par équivalent de NO_3^- transporté. Ce couplage entre hydrolyse d'ATP et transport de nitrate pourrait être assuré par un gradient de potentiel électrochimique engendré par une pompe à protons. Comme la réduction d'un NO_3^- produit un ion hydroxyle, le nitrate pénétrerait dans la cellule par un mécanisme d'échange de type antiport $\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$ à moins que ce ne soit par symport avec des H^+ préalablement expulsés (SALSAC, 1982).

L'étape qui réduit le NO_3^- en NO_2^- exige une mole de NAD (P) H ; celle qui conduit à la formation de NH_4^+ utilise l'équivalent de 3 moles de NAD (P) H. Or, dans la chaîne respiratoire, l'oxydation d'une mole de NADH conduit à la synthèse de 3 moles d'ATP. Autrement dit la réduction d'un équivalent de NO_3^- consomme un potentiel de 12 moles d'ATP, soit une énergie de 366KJ . A cette valeur il faudrait ajouter l'ATP nécessaire à l'absorption du NO_3^- et celui consommé lors de l'incorporation de l'ammonium dans les composés organiques. Il est donc clair qu'une plante qui assure sa nutrition azotée à partir du nitrate dévore un

potentiel énergétique très important. C'est sans doute pour cette raison que certains auteurs écrivent que la réduction du nitrate est un phénomène endergonique. Cette façon de voir est donc fondée, quand on considère le bilan énergétique global ; elle est par contre totalement erronée du strict point de vue de la thermodynamique. On peut légitimement se demander pourquoi de nombreuses espèces végétales ont adopté ce genre de nutrition. L'assimilation directe de l'ammonium représente en effet un processus moins dispendieux puisqu'elle n'utilise d'ATP que pour son incorporation dans les composés organiques. Il faut alors se souvenir que l'ammonium est toxique à des concentrations élevées et qu'il ne peut donc migrer à travers la plante que dans des combinaisons organiques, ce qui entraîne une baisse de la teneur en acides organiques des feuilles (COIC et al., 1961). Or la régulation de la pression osmotique exige l'accumulation de solutés dans la vacuole ; ces solutés seront alors des sucres ou des acides aminés. En effet en dehors du NO_3^- qui est facilement assimilable et relativement abondant dans la solution du sol, les anions minéraux susceptibles de remplacer les acides organiques seraient SO_4^{2-} , PO_4H_2^- ou Cl^- . Mais les deux premiers pénètrent difficilement et lentement, quant au dernier sa teneur est faible sauf dans les sols halomorphes. Par conséquent, malgré son apparent avantage énergétique, la nutrition ammoniacale a pour inconvénient majeur de provoquer une immobilisation de molécules organiques nécessaires à la biosynthèse des macromolécules (SALSAC, 1982).

2) Origine du pouvoir réducteur

Dans les tissus chlorophylliens, les agents de la réduction de l'azote nitrique en azote

ammoniacal sont issus de la photosynthèse (LOSADA et al., 1981): les électrons arrachés à l'eau par l'énergie solaire concourent à la production de NADPH et de ferredoxine réduite. Celle-ci est utilisée par la nitrite réductase qui est apparemment localisée dans les chloroplastes (GUERRERO et al., 1981). Il est par conséquent vraisemblable que la réduction du nitrite en ammonium se déroule sur le lieu de synthèse même des réducteurs.

Le problème de la réduction du nitrate en nitrite par la nitrate réductase est par contre beaucoup plus complexe.

D'abord la localisation chloroplastique de la nitrate réductase (RATHAM et DAS, 1974) ou l'association des nitrite et nitrate réductases dans une particule de type nitrosome (MIFLIN, 1970 ; BOURNE et MIFLIN, 1970) n'ont jamais été confirmées. La plupart des observations actuelles s'accordent à situer la nitrate réductase dans le cytoplasme (LOSADA et al., 1981) sans que l'on sache si elle est attachée à un système membranaire ou non.

Par ailleurs, dans les tissus verts, le donneur d'électrons est rarement le NADPH. Il est en effet généralement admis que le réducteur de NO_3^- est le NADH, dont la concentration intracellulaire moyenne (20 à 200 μM) est souvent suffisante pour saturer le site de liaison du coenzyme (K_m , NADH : 2 à 8 μM) (LEE, 1980). Une nitrate réductase spécifique du NADPH (E.C.1.6.6.3.) (PAN et NASON, 1978) a été décrite chez les Ascomycètes *Aspergillus nidulans* et *Neurospora crassa*, encore que cette préférence ne soit pas entièrement exclusive. Une autre forme (E.C.1.6.6.2.) capable d'utiliser aussi bien le NADPH que le NADH a été caractérisée chez *Ankistrodesmus braunii* (DIEZ et al., 1977)

mais plus rarement chez des végétaux supérieurs : jeunes plantules de Riz (SHEN et al., 1976) et feuilles de Soja (CAMPBELL, 1976 ; CONEJERO et al., 1984 ; NELSON et al., 1984). Pourtant, selon CAMPBELL et al. (1981) cette forme pourrait être plus répandue qu'il ne semble à première vue. Les céréales en particulier semblent la posséder également : scutellum et racines de Maïs (CAMPBELL, 1976 ; REDINBAUGH et CAMPBELL, 1981) Blé, Orge et Avoine (HEATH-PAGLIUSO et al., 1984). Cependant la forme prédominante chez les végétaux supérieurs est pour beaucoup d'auteurs la NADH : nitrate réductase (E.C.1.6.6.1.) qui utilise exclusivement le NADH (GUERRERO et al., 1981). On se trouve donc, chez beaucoup de plantes supérieures vertes, confronté à une situation paradoxale : d'une part la lumière provoque l'apparition d'un important potentiel réducteur dans le chloroplaste qui est faiblement perméable aux nucléotides pyridiniques (GOODWIN et MERCER, 1983) ; d'autre part la réduction du NO_3^- a lieu dans le cytoplasme et utilise essentiellement du NADH. Divers systèmes de navettes ont été proposés pour expliquer le transfert indirect d'un potentiel réducteur du chloroplaste ou de la mitochondrie vers le cytoplasme (BEEVERS, 1981). A la lumière le transfert des électrons aboutit à la réduction du NADP^+ qui permet la réduction du CO_2 en trioses phosphates qui traversent librement le chloroplaste. Dans le cytoplasme ils sont repris par la glycolyse et génèrent du NADH (KLEPPER et al., 1971). D'autre part la lumière inhibe l'oxydation du NADH intra-mitochondrial par une modification soit de la teneur en ATP, soit de la charge énergétique (SAWHNEY et al., 1978 ; CANVIN et WOO, 1979 ; HAGEMAN et al., 1980). Le NADH qui s'accumule est alors oxydé par une malate déshydrogénase mitochondriale. Le malate passe ensuite dans le cytoplasme où il est converti en oxaloacétate par une malate deshydrogénase cytoplasmique qui produit aussi du NADH. L'entrée

de l'oxaloacétate dans la mitochondrie permet le fonctionnement, à la lumière, du cycle de KREBS qui fournit les squelettes carbonés nécessaires à l'incorporation de l'ammonium (WOO et al., 1980) (fig. 1). Ce schéma offre une explication très séduisante de l'accroissement de l'activité nitrate réductase par la lumière, mais il repose sur l'affirmation très controversée de l'inhibition du transport des électrons dans les mitochondries illuminées (BEEVERS, 1981).

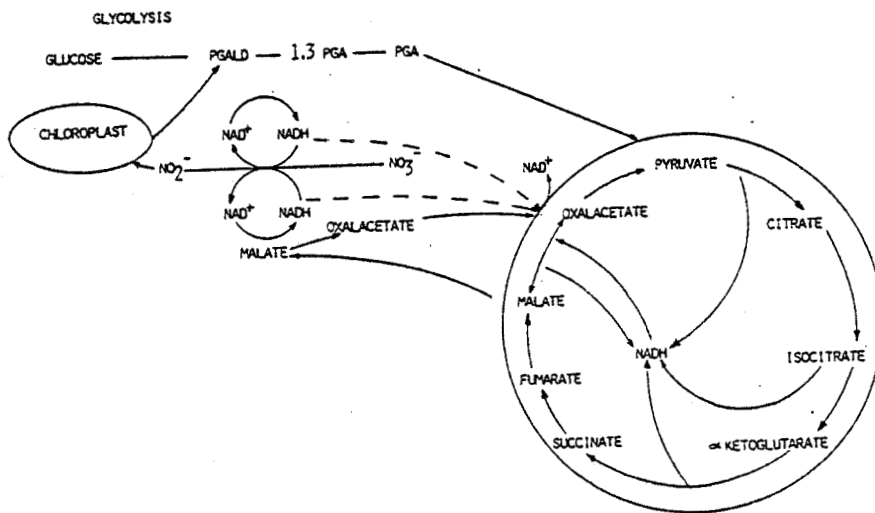
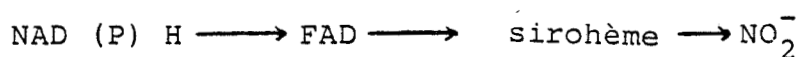


Figure I : Origine du NADH chez les végétaux chlorophylliens (BEEVERS, 1981).

Après avoir examiné l'origine du pouvoir réducteur chez les organismes chlorophylliens, nous allons examiner les sources de réducteurs susceptibles d'intervenir dans la réduction de l'azote nitrique dans les systèmes non photosynthétiques. Chez les Champignons et en particulier chez *Neurospora*, une nitrite réductase à NAD (P) H a été bien étudiée (GARRETT et AMY 1978), elle exige la présence de FAD pour atteindre une activité maximale. Bien que le mécanisme précis du transfert des 6 électrons demeure inconnu, le schéma suivant a été proposé :



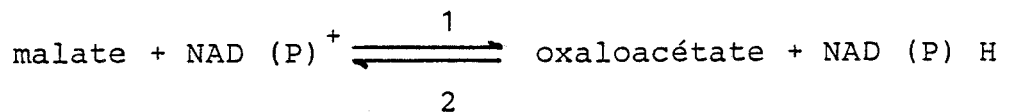
Il semble vraisemblable que des nitrite réductases de ce type fonctionnent dans les proplastides des cellules non chlorophylliennes des plantes supérieures. Les nitrate réductases exigent également des nucléotides pyridiniques réduits, ceux-ci alimentent donc la chaîne complète de la réduction du nitrate.

Comme le NADPH peut éventuellement être le réducteur du système, il est concevable que la voie des pentoses phosphates intervienne, d'autant plus que son activité est accrue lors de l'assimilation du nitrate. L'oxydation d'une mole de glucose 6 P produit 2 moles de NADH, alors que la conversion d'un équivalent NO_3^- en acide aminé en exige 5. La mesure des activités glucose 6 phosphate et gluconate 6 P déshydrogénase effectuées dans des cellules d'Erable (JESSUP et FOWLER, 1977) ou dans des racines de Pois (SARKISSIAN et FOWLER, 1974) montre qu'elles peuvent pourvoir aux besoins en réducteurs de l'ensemble de la chaîne d'assimilation du NO_3^- . Mais comme ces enzymes sont situées dans les proplastides, il est plus vraisemblable qu'elles fournissent du NADPH aux réactions catalysées par la nitrite réductase et la GOGAT (LEE, 1980).

L'une des voies essentielles capables de subvenir aux besoins en réducteurs serait la glycolyse. Les preuves les plus flagrantes de l'intervention de cette voie proviennent d'expériences menées à l'aide de disques foliaires maintenus à l'obscurité et auxquels sont fournis des intermédiaires de la voie glycolytique. La fructose 1 - 6 P, le glyceraldehyde ou le déhydroxyacétone (NEYRA et HAGEMAN, 1978 ; MANN et al., 1978) stimulent l'activité nitrate réductase, alors que le 3 phosphoglycerate ou le pyruvate qui sont formés postérieurement à la phase oxydative n'ont pas d'action (KLEPPER et al., 1971, MANN et al., 1978).

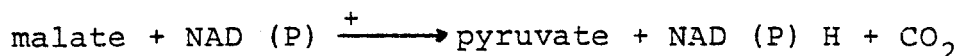
Quant aux racines de Pois la glycolyse produit de 20 à 40 fois plus de NADH, qu'il n'est nécessaire à la réduction du NO_3^- (STEPAN-SARKISSIAN et FOWLER, 1978). Le facteur essentiel qui gouverne la genèse d'un pouvoir réducteur suffisant à la réduction du NO_3^- est de toute évidence la teneur en sucre. Ainsi des baisses du taux d'hydrates de carbone ralentissent l'activité nitrate réductase parce qu'ils sont préférentiellement utilisés pour la croissance (RADIN et al., 1978). Au contraire la fourniture de glucose à des racines de Maïs double la teneur en NO_3^- du pool métabolique (ASLAM et OAKS, 1976.) de même que l'apport de saccharose ou de fructose et de glucose augmente l'activité nitrate réductase de racines de Pois ou de *Phaseolus aureus* (HIGGINS et al., 1974 ; SAHULKA et LISA, 1978).

Si la voie d'oxydation du malate intervient éventuellement dans les organes qui photosynthétisent, elle peut également agir à l'obscurité et dans les systèmes non chlorophylliens. L'acide malique est l'acide dicarboxylique le plus largement répandu chez les végétaux. La formation du dianion résulte de la réaction du mono-anion malique avec l'hydroxyle OH^- qui peut provenir de la réduction de NO_3^- (DAVIES, 1973). Or le malate fournit des nucléotides pyridiniques réduits par deux réactions. La première catalysée par la malate deshydrogénase aboutit à la formation d'oxaloacétate et de NADPH ou de NADH selon que l'enzyme fonctionne avec le NAD^+ ou le NADP^+ .



Cette réaction est légèrement endergonique $\Delta G^{\circ} = 28 \text{KJ.mol}^{-1}$ dans le sens 1.

La seconde est le fait de l'enzyme malique qui décarboxyde le malate en pyruvate et produit soit du NADH soit du NADPH.



Cette réaction est légèrement exergonique ($\Delta G_0' = -1,5 \text{ KJ.mol}^{-1}$).

Chez le Haricot, la malate deshydrogenase des feuilles utilise préférentiellement le NADP^+ alors que dans les racines elle est spécifique du NAD^+ (VIDAL et al., 1977). Dans les conditions atmosphériques habituelles, l'équilibre favorise la décarboxylation du malate par l'enzyme malique (WALKER, 1962) qui peut utiliser le NADP^+ , elle est alors cytoplasmique, ou le NAD^+ et elle serait alors localisée dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (HIRAI, 1978). Il est cependant très difficile d'estimer l'importance du malate comme source de réducteurs utilisables dans l'assimilation du nitrate, dans les organes non photosynthétiques d'une plante entière. Il ne semble pas que des mesures simultanées de réduction de NO_3^- et d'oxydation du malate aient été effectuées dans des racines isolées. Cette carence expérimentale est compréhensible étant donné la complexité du problème : interfèrent en effet la synthèse, le transport et le catabolisme de l'acide malique qui est impliqué dans le maintien du pH et de la neutralité électrique, lorsque des anions sont absorbés en excès.

Dans des systèmes relativement plus simples comme les suspensions cellulaires de Tabac, il n'a pas été possible d'établir de relation quantitative simple entre la quantité de nitrate assimilé et celle de malate accumulé (BERGMANN et al., 1976).

Dans des organes non chlorophylliens, les mitochondries, qui contiennent les enzymes oxydatives du cycle de KREBS, représentent un potentiel de pouvoir réducteur très important. Une racine qui consomme 10 μ moles d'oxygène par gramme de matière fraîche et par heure, est capable de produire 33 μ moles d'équivalent H^+ (LEE, 1980). Mais les membranes mitochondriales sont peu perméables aux nucléotides pyridiniques. Il est donc peu probable que le NADH passe dans le cytoplasme. Il ne pourrait éventuellement y être transféré qu'indirectement par une navette de l'acide malique et nous revenons de ce fait à la discussion développée dans le paragraphe précédent.

A la suite d'expériences d'infiltration d'antimycine A, qui empêche l'oxydation du NADH, ou de rotenone et d'amytal qui inhibe celle du NADH intramitochondrial, CANVIN et WOO (1979) concluent que les feuilles d'Epinard maintenues à l'obscurité n'utilisent pas le NADH mitochondrial dans la réduction du nitrate. L'emploi d'inhibiteurs métaboliques ou d'agents de découplage modifiant les transports d'électrons dans la mitochondrie, n'a pas apporté de preuves convaincantes de l'intervention du NADH mitochondrial dans l'assimilation de l'azote nitrique (LEE, 1980).

Enfin, on a parfois imaginé qu'un échange d'hydrogène pouvait se faire entre les deux types de nucléotides pyridiniques. En effet d'un simple point de vue thermodynamique la réaction :



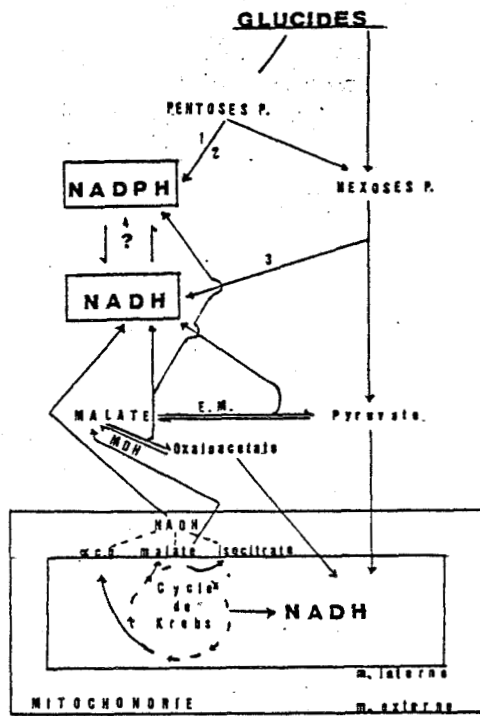
est absolument réversible avec une constante d'équilibre voisine de 1. Cette réaction peut se faire par l'action

concertée des PEP carboxylase, NAD malate deshydrogénase et enzyme malique à NADP des racines de Maïs (TING et DÜGGER, 1965). Mais là encore ce résultat ne semble pas pouvoir être généralisé et la transhydrogenation des nucléotides pyridiniques ne paraît pas devoir être retenue (LEE, 1980).

En conclusion, il semble que l'assimilation du nitrate n'exige pas de réducteurs issus d'une réaction oxydative particulière mais plutôt de plusieurs réactions simultanées qui sont utilisées de façon compétitive par divers systèmes enzymatiques (fig. 2). Pour ce qui est de la transformation du NO_3^- en NO_2^- deux sources principales paraissent devoir être retenues : celle de la NAD malate déshydrogénase et celle de la NAD- glyceraldehyde 3P deshydrogénase qui sont deux enzymes largement présentes dans le cytoplasme. Chacun de ces deux systèmes, considéré séparément, possède une activité suffisante pour couvrir les besoins en nucléotides réduits de la nitrate réductase.

Dans les quelques tissus où une nitrate réductase vraiment spécifique du NADPH existe, le réducteur provient sans doute d'un pool cytoplasmique alimenté par la glucoe 6 P deshydrogénase ou l'enzyme malique à NADP^+ .

En ce qui concerne les autres étapes de l'assimilation de l'azote dans les organes non verts, la nitrite réductase et la GOGAT se trouvent dans des compartiments incapables de générer un important potentiel réducteur. Il semblerait en effet que les proplastés ne possèdent pas d'équipement enzymatique suffisant pour satisfaire les besoins en NADPH. Le problème ne devrait pas être trop grave pour la GOGAT qui utilise mieux le NADH que le NADPH; par ailleurs il est possible que la navette dihydroxyacétone - glyceraldehyde 3 P importe suffisamment de réducteurs dans les proplastés.



1 : glucose 6-phosphate deshydrogenase ; 2 : 6-phosphogluconate deshydrogenase ; 3 : NAD-glyceraldehyde -3-phosphate deshydrogenase ; 4 : pyridine nucleotide transhydrogenase ; E.M. : enzyme malique à NAD^+ ; MDH : malate deshydrogenase à NAD^+ ou $NADP^+$.

Figure II : Origines du potentiel réducteur nécessaire à la réduction du nitrate dans les tissus non chlorophylliens (LEE, 1980).

Dans une plante entière qui possède une partie aérienne chlorophyllienne, la source de réducteurs est le saccharose qui, parvenant aux racines par le phloème, matérialise le transport du potentiel réducteur. Le catabolisme des sucres, que ce soit par la voie des pentoses phosphates ou par la voie d'Emden Meyerhof, est donc vraisemblablement la source la plus importante de pouvoir réducteur dans les tissus chlorophylliens.

Dans des systèmes plus simples, comme les suspensions cellulaires non chlorophylliennes, c'est le saccharose du milieu de culture qui joue ce rôle.

Cependant pour LOSADA et al. (1981) chez les plantes supérieures, la réduction du nitrate s'effectue avec l'eau comme ultime réducteur aux dépens de l'énergie solaire.

On peut alors se demander si ce rôle de l'eau ne se retrouve pas dans des systèmes qui ne présentent aucune activité photosynthétique. D'un récent article de LANCE et RUSTIN (1984) qui met en relief le rôle essentiel du malate dans la physiologie de la cellule végétale, nous retiendrons deux points qui nous paraissent essentiels à notre propos. D'abord le malate constitue une importante réserve d'équivalents réduits, ensuite et ce point est trop souvent oublié, il contribue pour une large part (33 %) au processus de scission des molécules d'eau par le cycle tricarboxylique. On pourrait donc paraphraser LOSADA en écrivant que, chez les végétaux non photosynthétiques, le réducteur ultime de l'assimilation du nitrate est l'eau aux dépens de la respiration. Si bien que la lyse de l'eau est aussi importante pour l'anabolisme du glucose que pour son catabolisme et dans les deux cas le pouvoir réducteur qui en résulte est partiellement utilisé à l'assimilation de l'azote nitrique. Que le malate soit par ailleurs une réserve de protons et d'anions, l'amène à jouer un rôle important dans la régulation de l'homéostasie cellulaire. C'est ce point que nous allons développer maintenant.

3) Le pH stat biochimique : son rôle dans l'assimilation de l'azote minéral combiné.

Tout ion nitrate absorbé peut subir deux destinées : ou bien il rejoint d'autres anions dans la vacuole où il contribue à l'équilibre de charges électriques et au maintien de la pression osmotique; ou bien il alimente un pool de nitrate cytoplasmique, dit métabolique, qui représente l'ensemble des ions qui seront réduits et participeront de ce fait aux diverses chaînes du métabolisme

azoté (FERRARI et al., 1973). Cette compartimentation cellulaire du NO_3^- est actuellement admise par la plupart des auteurs. Cependant dans les cellules de racines de Pois on a ajouté un compartiment, dit inducteur, aux deux compartiments vacuolaires et métaboliques (SAHULKA et LISA, 1978). Ce pool inducteur serait, comme son nom l'indique, responsable de l'induction enzymatique et séparé du pool métabolique par une membrane hémiperméable. Ce modèle reste cependant hypothétique. On a bien décrit dans des cellules cotylédonaire du Soja des vésicules qui pourraient transporter le nitrite, toxique, du cytoplasme vers les plastes où il est réduit en ammonium (VAUGHN et al., 1981) mais la nature, l'origine ou la structure de la membrane de ces vésicules n'a pas été étudiée. Enfin, à notre connaissance, aucun travail récent n'a établi l'existence d'une séparation par des systèmes membranaires, de différentes populations d'ions NO_3^- dans le cytoplasme.

La réduction du NO_3^- fait apparaître dans le cytoplasme un radical hydroxyle (DIJKSHOORN, 1962). On peut en effet écrire :



La cellule est alors obligée d'éliminer cette alcalinité. Elle peut le faire en expulsant les OH^- dans le milieu externe. Ce processus, appelé alcalinisation physiologique du milieu, a été particulièrement bien mis en évidence à l'aide de racines isolées (HEWITT, 1966) ou de colonies tissulaires de Carotte (CRAVEN et al., 1972). Ce mode de régulation du pH se comprend aisément lorsque la réduction s'effectue dans la racine ou dans un tissu directement en contact avec le milieu, il est plus difficile à concevoir lorsque le nitrate est réduit dans un organe

éloigné comme une feuille par exemple.

Or diverses observations, dont certaines sont déjà anciennes (BURSTRÖM, 1945 ; VICKERY et al., 1946 ; DIJKSHOORN, 1968 ou OSMOND, 1967) révèlent une corrélation étroite entre réduction de NO_3^- et synthèse d'acide malique dans les feuilles. Ce phénomène rappelle l'apparition de malate dans des plantes qui absorbent plus de cations que d'anions, et sont donc tenues à des réajustements constants de leur équilibre électrostatique. Dans les feuilles de Maïs, de Tabac ou d'Orge une relation stoechiométrique a même été trouvée entre la réduction du nitrate et la synthèse d'acide malique (BEN ZIONI et al., 1970). Cependant une telle correspondance n'est pas généralisable, aussi a-t-on proposé un transfert d'acide malique de la feuille vers la racine où le malate serait décarboxylé en pyruvate et CO_3H^- qui serait échangé contre du NO_3^- . Plus le taux de malate transporté est important, plus la quantité de NO_3^- susceptible d'être réduit, est élevée (BEN ZIONI et al., 1971)

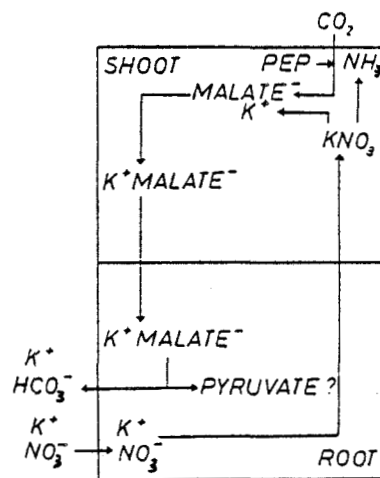
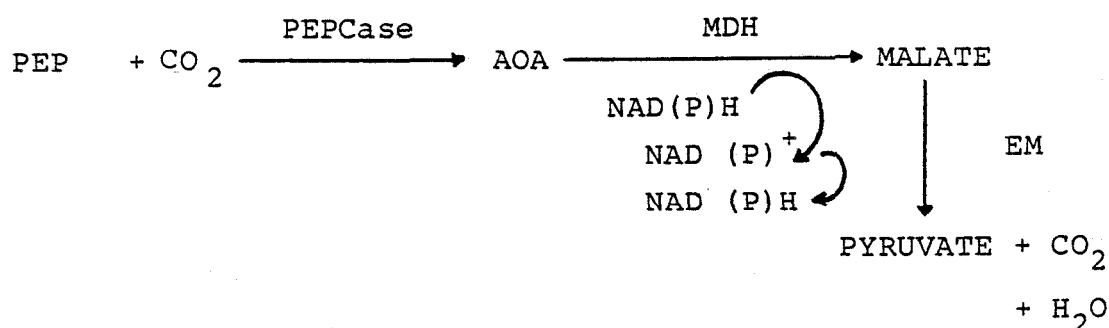


Figure III : Réduction du nitrate et synthèse d'acide malique (BEN ZIONI et al., 1971).

Ce schéma de régulation du pH intracellulaire a été repris et développé par DAVIES (1973) qui a introduit le concept de pH stat cellulaire biochimique.

Ce système met en jeu une succession de réactions enzymatiques qui peuvent être schématisées de la façon suivante :



Fonctionnement du pH stat selon DAVIES (1973)

PEP : Phosphoenol pyruvate ; AOA : acide oxaloacétique
 PEPCase : Phosphoenol pyruvate carboxylase ; MDH : malate
 dehydrogenase ; EM : Enzyme malique.

La localisation et le fonctionnement de ce mécanisme selon la nature du nutriment azoté minéral ont été étudiés de façon extensive par RAVEN et SMITH (1976). Nous ne retiendrons que deux exemples qui concernent la régulation du pH au cours de l'assimilation du nitrate et de l'ammonium dans la racine.

Lorsque le NO_3^- est réduit, le pH stat joue son rôle malgré la proximité du milieu externe qui peut servir de récepteur pour les OH^- expulsés. L'alcalinisation qui résulte de la réduction, active en effet la PEPCase qui génère donc un acide fort : l'acide malique qui est alors stocké dans la vacuole avec le cation qui accompagne l'absorption de NO_3^- .

Il est alors évident que le facteur limitant est la capacité "d'accueil" de la vacuole.

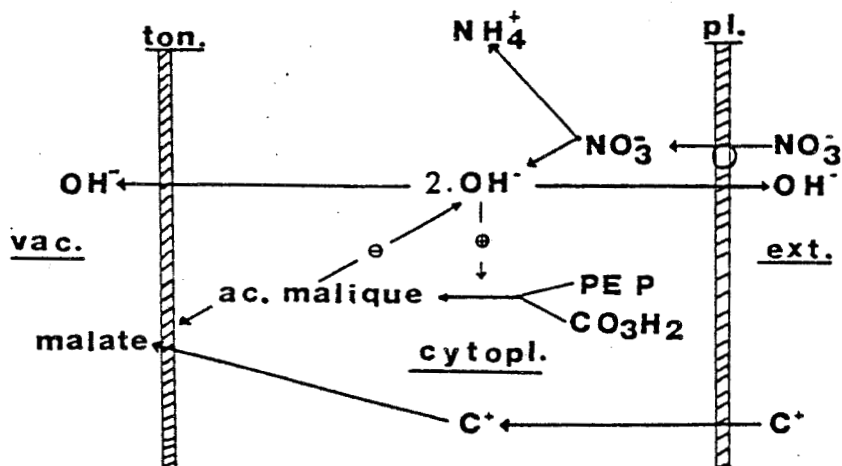


Figure IV : Régulation du pH cellulaire au cours de l'absorption et la réduction du NO_3^- d'après RAVEN et SMITH (1976) pl = plasmalemme ; ton = tonoplaste. Vac : vacuole ; C^+ = cation ; cytopl : cytoplasme ; ext : milieu extérieur.

Lorsque l'ammonium est l'ion absorbé, le milieu externe s'acidifie, la cellule échange en effet de 1,1 à 1,25 H^+ par NH_4^+ (RAVEN et SMITH, 1976). Les produits de l'assimilation : protéines, acides uroniques pariétaux présentent, au pH cellulaire, un excès de charges négatives qui seront neutralisées par des cations.

L'ammonium peut par ailleurs être transporté dans les parties aériennes ou bien sous forme d'acide glutamique ou aspartique ou de leur amides correspondantes (la glutamine ou l'asparagine) ou bien de malate d'ammonium. Dans ce dernier cas, la première partie du pH stat qui aboutit à la formation d'acide malique fonctionne dans la racine, alors que la seconde partie, qui voit s'effectuer la décarboxylation de l'acide malique, se déroule dans la tige. On constate donc que la plante peut, au niveau de l'organisme entier, réguler la réduction et l'assimilation de l'azote par

un processus homeostatique cellulaire.

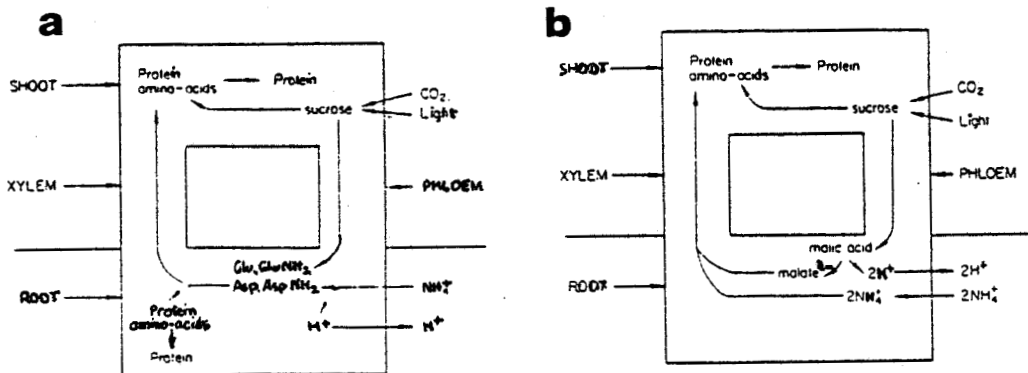


Figure V : Régulation du pH : l'assimilation de l'ammonium se fait dans les racines (a), dans les feuilles (b). (RAVEN et SMITH, 1976).

Nous allons maintenant envisager d'autres modes de régulation de la réduction du nitrate qui passent par un contrôle de la nitrate réductase.

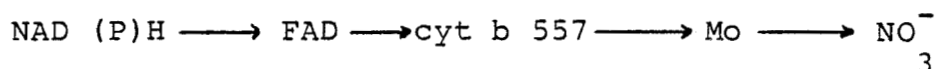
II - LA NITRATE REDUCTASE : FONCTIONS, STRUCTURE, MODES DE REGULATION.

1) Fonctions

Le transfert des électrons du nucléotide pyridinique réduit au nitrate est le fait d'une protéine extrêmement complexe : la nitrate réductase. Nombre de nos connaissances concernant le mode d'action et la structure de cette enzyme sont dues à NASON et à ses collaborateurs qui ont étudié la nitrate réductase de *Neurospora crassa*. En 1953 NASON et EVANS montrent que le FAD constitue l'un des groupements prothétiques de l'enzyme dont la synthèse nécessite la présence de molybdène (NICHOLAS, NASON et Mc ELROY, 1954) qui est un élément constitutif de la molécule enzymatique (NICHOLAS et NASON, 1954). Celle-ci contient

également un cytochrome b (b 557) (GARRETT et NASON, 1967). (SOMERS et al., 1982).

La mesure des potentiels d'oxydo-réduction des différents composants a permis de proposer le cheminement suivant des électrons :



En plus de cette activité globale qui lui a valu le nom de nitrate réductase, l'enzyme présente au moins deux activités partielles. La première est une activité NAD (P)H deshydrogénase (diaphorase) qui permet la réduction de toute une série de corps, qui, comme le 2,6 dichloroindophenol ou les sels de tetrazolium, acceptent deux électrons, ou le ferricytochrome c ou les ferricyanures n'en acceptent qu'un seul. Cette fonction qui serait liée à la présence de FAD constitue ce qu'il est convenu d'appeler la moitié initiale de l'enzyme puisque les électrons sont fournis par le NAD (P)H qui est le premier maillon de la chaîne de réduction.

Quant à la deuxième activité partielle, elle serait essentiellement due à la présence du molybdène et représente l'activité nitrate réductase terminale totalement indépendante des nucléotides pyridiniques. Elle aboutit à la réduction du nitrate en nitrite par des électrons qui peuvent être fournis par les flavines réduites (FMNH₂, FADH₂) ou des colorants tels que les viologènes réduits.

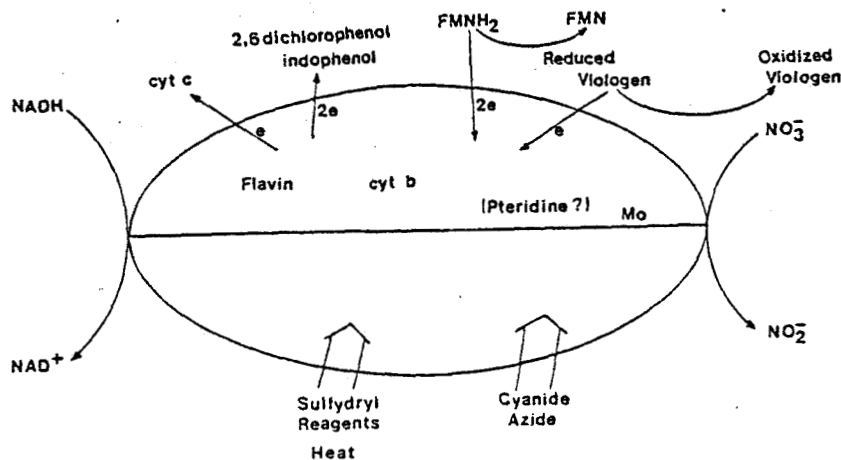


Figure VI : Représentation schématique des différentes activités de la nitrate réductase (BEEVERS, 1981). La réduction du NO_3^- à l'aide du NADH, des flavines réduites ou des viologènes réduits est inhibée par CN^- et les azides. L'activité diaphorase l'est par les composés sulfhydryles.

Le cytochrome b semble se trouver à la limite des deux activités partielles ; il contient en effet un groupement hémique fonctionnel qui chez l'Epinard intervient à la fois dans les fonctions deshydrogénase et nitrate réductase (NOTTON et al., 1977).

Pourtant la difficulté de mesurer des potentiels d'oxydo-réduction de substances liées à des protéines a amené bon nombre de chercheurs à s'interroger sur la localisation dans l'enzyme des différents groupements prosthétiques. On pouvait en effet se demander si le FAD précédait bien le groupement hémique du cytochrome b dans le transfert des électrons. Les modifications du spectre de l'hème par les flavines (GUERRERO et GUTTERIEZ, 1977), de même que le rôle joué par les thiols dans les réactions qui utilisent le NAD (P)H ou le FAD (AMY et al., 1977), ont conduit HEWITT et NOTTON (1980) à confirmer et préciser le schéma classique du transfert électronique.

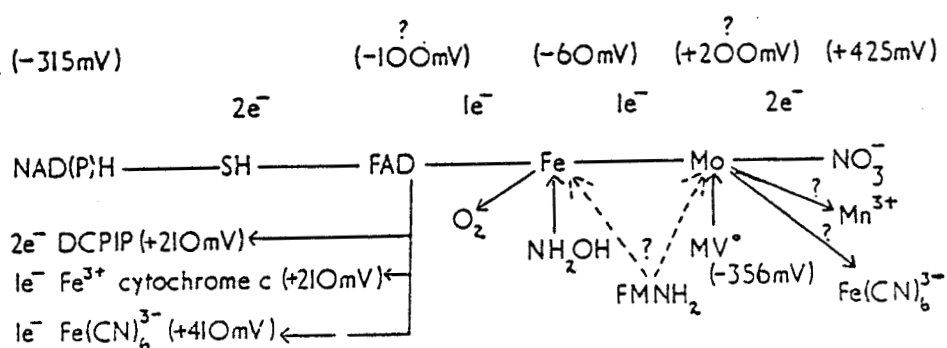


Figure VII : Représentation du transport électronique en fonction des potentiels redox connus ou supposés des différentes composantes de la chaîne de réduction du nitrate, par les nitrate réductases d'eucaryotes (HEWITT et NOTTON, (1980).

Enfin après de nombreuses controverses (voir HEWITT et NOTTON, 1980) il est admis que les électrons provenant du FADH₂ et du fer hémique font passer le Mo^{VI} à l'état de Mo^V qui, en présence de nitrate, est immédiatement oxydé en Mo^{IV}. Le couple Mo^{VI}/Mo^{IV} serait donc bien le donneur final d'électrons au nitrate (JACOB et al., 1980).

La mise en évidence d'activités initiale et terminale de l'enzyme, ainsi que l'étude de mutants de *Neurospora* ne présentant pas d'activité nitrate réductase, aboutissent à la conclusion que l'enzyme est constituée d'au moins deux composants nécessaires à la réduction du nitrate (NASON et al, 1970). Si l'enzyme est multimérique, il va donc falloir étudier la nature et l'agencement des monomères dans l'enzyme fonctionnelle (holoenzyme).

2) Structure de la nitrate réductase

Parmi les questions qui se posent, et qui ne sont pas encore totalement résolues, figurent le nombre et le rôle des sous-unités ainsi que le mode d'action du molybdène et la façon dont il s'insère dans la protéine enzymatique.

a - Le molybdène

Chez *Neurospora crassa*, il existe un atome de molybdène pour 2 molécules de cytochrome b (PAN et NASON, 1978) ; chez la Chlorelle, 2 Mo pour 3 cytochromes et 3 FAD (GIRI et RAMADOSS, 1979) alors que chez l'Epinard, on trouve 1 Mo pour 2 Fe (NOTTON et HEWITT, 1979). Les proportions relatives du fer et du molybdène semblent donc varier selon les espèces étudiées. L'obtention, chez *Aspergillus nidulans*, de mutants, appelés cnx qui n'ont ni activité nitrate réductase, ni xanthine oxydase a amené PATEMAN et al. (1964) à proposer l'existence d'un cofacteur molybdique commun aux deux enzymes et contrôlé par cinq loci géniques différents.

NASON et al. (1970) ont étudié de façon très détaillée un mutant nit 1 de *Neurospora crassa* qui, comme les mutants cnx d'*Aspergillus* est dépourvu d'activités nitrate réductase et xanthine oxydase. Ils ont réussi à reconstituer une nitrate réductase active *in vitro* en utilisant l'apoprotéine nitrate réductase de nit 1 et une préparation acidifiée de xanthine oxydase du lait de vache ou d'aldehyde oxydase extraite de foies de lapin, qui contiennent le facteur molybdique. Ils ont également réussi à reconstituer une nitrate réductase fonctionnelle en utilisant nit 1 et la souche sauvage de *Neurospora crassa*.

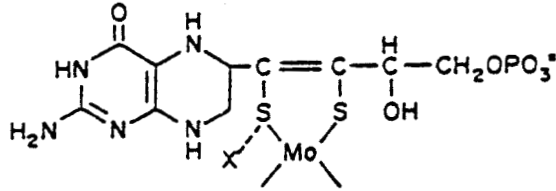
Des expériences de complémentation ont également été menées avec succès en utilisant des mutants *cnx* de cellules de Tabac cultivées *in vitro* (MENDEL et MÜLLER, 1978) ou des mutants *cnx* et un mutant *nia D* (dépourvu de nitrate réductase structurale) d'*Aspergillus* (GARRETT et COVE, 1976).

Tous ces résultats ont conduit à la conclusion qu'il existe un cofacteur molybdique universel, commun à toute une série d'enzymes tant végétales, qu'animales ou bactériennes et qui catalysent des réactions très différentes.

Il faut cependant faire une exception pour la nitrogénase qui contient un cofacteur à fer et à molybdène qui est incapable de restaurer l'activité nitrate réductase de *nit 1* alors qu'il restaure l'activité nitrogénase d'un mutant d'*Azotobaeter vinelandii*. Inversement le cofacteur de la xanthine oxydase du lait de vache peut très bien réactiver une nitrate réductase mais pas de nitrogénase qui avec un cofacteur molybdique particulier occupe donc une place singulière parmi les enzymes à molybdène.

La composition chimique du facteur molybdique a été beaucoup étudiée. Elle comprend un composé organique de faible poids moléculaire ainsi qu'un atome du métal. Selon HEWITT et al. (1977) son poids moléculaire propre serait de 2.000 daltons et il pourrait être associé à une protéine de 20.000.. Pourtant l'existence d'une telle protéine est fréquemment mise en doute alors que la liaison à des peptides de faible poids moléculaire est très souvent admise mais non démontrée expérimentalement (JOHNSON, 1980). Des travaux récents ont montré que le cofacteur est constitué d'une ptérine phosphorylée (JOHNSON et RAJAGOPALAN, 1982, JOHNSON et al., 1984) associée au molybdène ; il est transférable au mutant *nit 1* de *Neurospora* qui retrouve alors une activité nitrate réductase qui ne dépend donc que de l'apport de Mo

et de molybdoptérine (KRAMER et al., 1984).



molybdenum cofactor
(proposed structure)

Figure VIII : Structure probable de la forme active du cofacteur molybdique (JOHNSON et RAJAGOPALAN, 1982).

En plus de son rôle de support du molybdène le cofacteur pourrait contribuer au maintien de la stabilité structurale de la nitrate réductase (NASON et al., 1970). Chez le type sauvage de *Neurospora*, il maintiendrait la structure dimérique de l'enzyme (PAN et NASON, 1978) ; un rôle identique lui a été dévolu tant chez *Aspergillus nidulans* (MAC DONALD et al., 1970) que chez l'Épinard (RUCKLIDGE et al., 1976).

Le cofacteur molybdique n'existerait pas à l'état libre dans la cellule mais il est soit incorporé dans les enzymes à molybdène soit associé à une macromolécule ou une structure cellulaire stabilisatrices (sans doute un système membranaire). La nature du "porteur" varie selon l'espèce, mais dans tous les cas étudiés, il protégerait le cofacteur contre les effets destructeurs de l'oxygène et de l'environnement aqueux. L'association du cofacteur avec l'élément porteur est telle que la molécule enzymatique réceptrice y accède facilement et puisse l'extraire sans difficultés (JOHNSON, 1980).

b) L'apoenzyme, nombre et nature des sous-unités

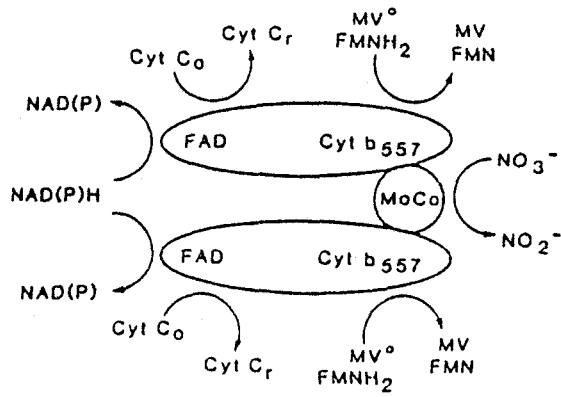
Chez les Eucaryotes, la masse moléculaire de l'enzyme varie, selon les espèces étudiées mais aussi selon les méthodes de mesure utilisées de 160.000 à 500.000 (HEWITT et NOTTON, 1980). Si tout le monde s'accorde à lui attribuer une structure multimérique, les avis divergent quant au nombre et à la nature des sous-unités. Selon les espèces on en compte de 2 à 8.

Chez *Neurospora* la nitrate réductase est un homodimère, c'est-à-dire qu'elle possède deux sous-unités identiques (PAN et NASON, 1978). Une structure identique a également été attribuée à l'enzyme de Potiron (REDINBAUGH et CAMPBELL, 1985) (encart ci-contre).

Chez *Ankistrodesmus* elle est constituée de 8 sous-unités homologues (AHMED et SPILLER, 1976 ; DE LAROSA et al., 1980) alors que chez *Chlamydomonas* elle contient 4 sous-unités identiques deux à deux (FERNANDEZ et CARDENAS, 1982 ; FRANCO et al., 1984). Chez la Chlorelle, trois sous-unités identiques avaient d'abord été dénombrées (SOLOMONSON, 1981 ; GIRI et RAMADOSS, 1979) mais des analyses récentes ont montré que l'enzyme fonctionnelle est un homo-tétramère, l'apparition de di ou trimères dépend des méthodes d'extraction et d'analyse utilisées (HOWARD et SOLOMONSON, 1984). Chez l'Epinard des résultats contradictoires ont également été publiés : selon HEWITT et NOTTON (1980) l'enzyme serait un tétramère formé par l'association de 2 couples de sous-unités différentes reliées par le cofacteur molybdique, alors que pour NAKAGAWA et al., (1985) elle est un homo-tétramère.

On notera enfin qu'un modèle séduisant a été proposé, qui allie à la fois des fonctions de transfert du nitrate et de sa réduction par BUTZ et JACKSON (1977). Malheureusement il s'agit là d'un modèle entièrement théorique qui n'a jusqu'à présent reçu aucune confirmation expérimentale. De plus le nitrate peut parfois être absorbé en absence

a

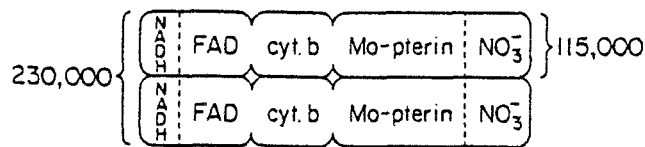


La nitrate réductase de Neurospora crassa serait un homodimère où les deux sous-unités possèdent en commun un atome de Mo (PAN et NASON, 1978).

Ce modèle pourrait s'appliquer aux nitrate réductases des végétaux supérieurs : chaque sous-unité aurait une masse moléculaire d'environ 100 000 daltons. Mais on ne sait pas si chaque mole d'enzyme possède un ou deux atomes de Mo (KLEINHOF et al., 1985) (a).

Pour REDINBAUGH et CAMPBELL, 1985 la nitrate réductase du potiron est un homodimère où chaque sous-unité a une masse de 115 000 daltons et possède un atome de Mo (b).

b



- a) Selon le modèle de BUTZ et JACKSON, à chaque monomère de la nitrate réductase est associée une ATPase qui fournit l'énergie nécessaire au transport du nitrate.
- b) D'après HEWITT et NOTTON, la nitrate réductase d'épinard est constituée de 4 sous-unités de P.M. identiques, reliées par le cofacteur à molybdène (MCC). Les deux sous-unités initiales contiennent le FAD et assurent l'oxydation du NADH ou du NADPH. Deux autres sous-unités renfermant l'hème réagissent avec le FMN₂ et le ferricyanure. C'est le cofacteur molybdique qui permet la réduction du nitrate.
- c) Pour FRANCO et al. la nitrate réductase de chlorelle est un hétérotétramère, formé de 2 sous-unités initiales renfermant le FAD et l'hème et de 2 sous-unités terminales contenant le molybdène. Chaque sous-unité initiale comprend une région de liaison entre des domaines polypeptidiques distincts (hinge région) qui est particulièrement sensible aux protéases.
- d) Selon le modèle de HOWARD et SOLOMONSON, la nitrate réductase de chlorelle est un homotétramère. Chaque sous-unité contient, et le FAD et l'hème ainsi que du Mo. L'ensemble présente une symétrie d'ordre cyclique formant un "dimère de dimères", qui possède au moins 2 types différents de domaines de liaison. Chacun de ces domaines est occupé par des régions de liaison identiques, si bien que les sous-unités sont reliées dans des configurations de type "tête contre tête" et non pas "tête-queue".



de toute nitrate réductase fonctionnelle (DODDEMA et al., 1978 ; HEIMER et FILNER, 1970, SCHLOEMER et GARRET, 1973).

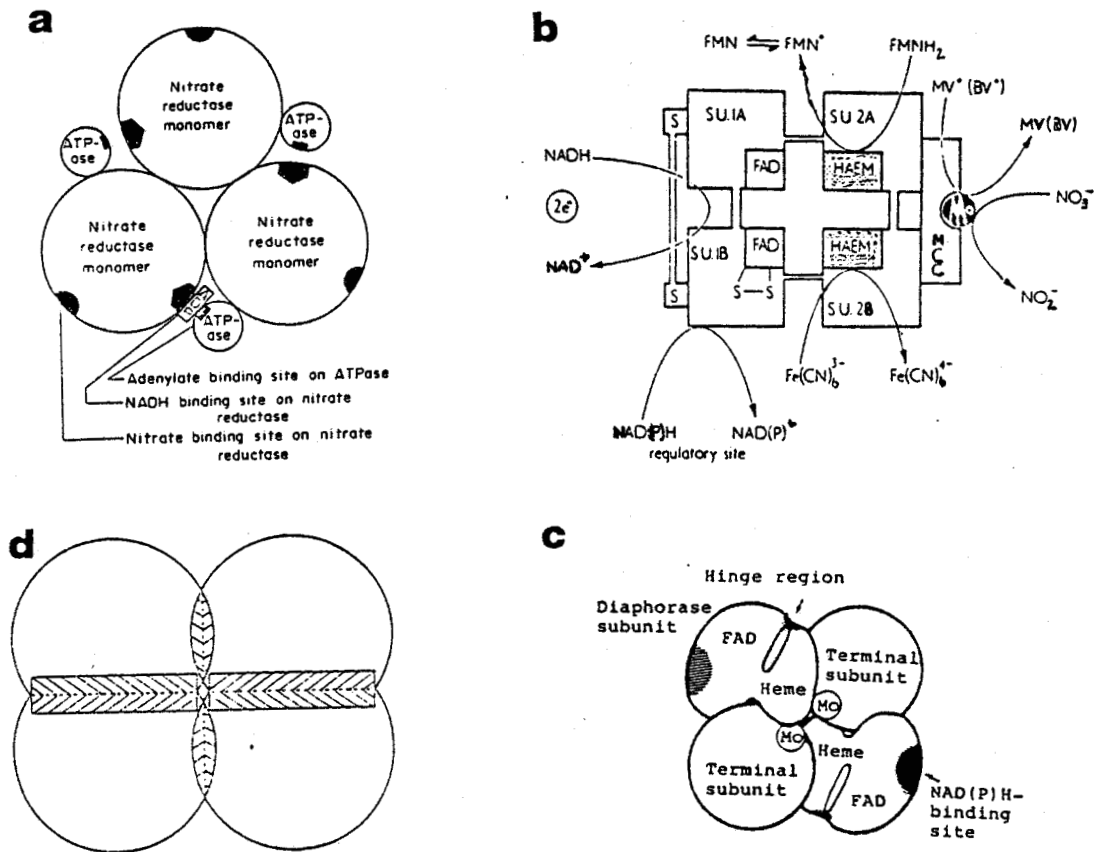


Figure IX : Quelques modèles de structure de nitrate réductase :
 a : selon BUTZ et JACKSON (1977) ; b : selon HEWITT et NOTTON (1980) ; c : selon FRANCO et al. (1984) ; d : selon HOWARD et SOLOMONSON (1984).
 (voir encart ci-contre)

Ces différentes structures ont été établies pour la NADH ou la NADPH : nitrate réductase mais la comparaison des structures entre NADH : NR et NAD (P) H : NR n'a pas encore été effectuée chez les plantes qui possèdent les deux types d'enzymes à la fois.

Cependant les progrès réalisés dans les procédés de la purification enzymatique (découverte de protecteurs de la structure protéique, chromatographie d'affinité ...) ont permis d'obtenir des préparations très pures de la molécule et par voie de conséquence des anticorps spécifiques de l'enzyme. L'utilisation des méthodes immuno-chimiques

a alors permis de comparer les nitrate-réductases de différentes espèces mais aussi de rechercher des isoenzymes au sein d'une même plante.

Ainsi les anticorps fabriqués contre la NADH : NR du Potiron reconnaissent totalement l'enzyme homologue de l'Epinard ; la reconnaissance par ces mêmes anticorps n'est que partielle pour les NADH et NAD (P)H : NR du Soja ou la NADH : NR du Maïs et très faible pour la NADH : NR de la Chlorelle ou la NADPH : NR de *Neurospora*. Toutes ces enzymes qui présentent des propriétés catalytiques identiques proviennent sans doute d'une molécule ancestrale commune dont la structure s'est diversifiée par la suite (SMARELLI et CAMPBELL, 1981). Une étude identique entreprise avec des anticorps fabriqués contre l'enzyme de l'Orge a permis d'analyser le comportement immunologique de la nitrate réductase de neuf plantes supérieures mono ou dicotylédones. Toutes les enzymes sont inactivées par l'antiserum mais avec des intensités différentes. Pour une inactivation de 50 % les nitrates réductases de Tabac, du Soja ou Pois exigent de 2 à 10 fois plus d'anticorps que celles des monocotylédones. Des différences de structure de la protéine enzymatique sont donc intervenues au cours de l'évolution, mais le site catalytique qui n'a pas subi d'évolution, est intégralement conservé (SNAPP et al., 1984).

Enfin chez le Maïs; des espèces moléculaires différentes par leurs masses moléculaires, peuvent être éluées de colonnes d'affinité soit par le NADH soit par le KNO_3 . Les deux nitrate réductases ainsi isolées présentent des épitopes identiques et pourraient représenter soit des dimères (formes éluées par le NADH) soit des tétramères (élution par le KNO_3) composés de sous-unités identiques, (NAKAGAWA et al., 1984).

Chez l'Epinard, les nitrate-réductases foliaires ou racinaires ne montrent qu'une identité antigénique partielle et pourraient donc constituer des isoformes (FERRARIO et al., 1984).

3) Mode de régulation des nitrate-réductases

Comme pour toute enzyme la régulation peut se faire soit par le contrôle de la quantité d'enzyme disponible, soit par un jeu d'effecteurs positifs ou négatifs ou par des modifications conformationnelles qui permettent l'allumage ou l'extinction de l'activité, soit enfin par un contrôle de l'accessibilité du substrat.

a) Contrôle par la quantité d'enzyme. Aspect génétique.

Dès 1953, EVANS et NASON remarquent que l'activité nitrate réductase n'est décelable chez *Neurospora crassa* que si les mycéliums sont cultivés en présence de nitrate, alors qu'elle est absente s'ils sont cultivés sur ammonium ou alanine. Ces résultats sont retrouvés chez le Chou-fleur (CANDELA et al., 1957 ; AFRIDI et HEWITT, 1964). La conclusion a alors été avancée que la nitrate réductase était inductible par son substrat. Il faut cependant remarquer que jusqu'alors le terme "inductibilité" signifie qu'un signal (l'apport du substrat ou d'un constituant d'un groupement prosthétique) produit une réponse spécifique (l'activité enzymatique) sans que celle-ci ne résulte pour autant d'une synthèse *de novo* de l'enzyme. Il existe donc très souvent dans la littérature une ambiguïté à propos de l'induction de la nitrate réductase, qui peut correspondre à des phénomènes aussi différents qu'une synthèse protéique ou qu'une activation de l'enzyme. Nous n'utiliserons quant à nous le terme induction que dans le sens de synthèse *de novo* de l'enzyme.

Avec le développement de la biologie moléculaire et l'élaboration du concept d'opéron, de nombreuses recherches vont essayer de préciser le mode de régulation génétique de la nitrate réductase.

L'emploi simultané des techniques de marquage radioactif et de centrifugation en gradient de densité va permettre de montrer que la nitrate réductase de cellules de Tabac, cultivées sur du nitrate, est bien synthétisée *de novo* (ZIELKE et FILNER, 1971). Le fait que certains antibiotiques ou que des analogues des bases puriques ou pyrimidiques inhibent soit la transcription soit la traduction, va permettre l'éclosion d'une multitude de travaux concernant l'inductibilité de la nitrate réductase. (Pour une revue détaillée voir HEWITT, 1975).

Par ailleurs, l'analyse de mutants qui ne présentent pas d'activité nitrate réductase, de même que l'application des méthodes immunochimiques, vont contribuer à étayer la thèse de l'inductibilité de l'enzyme. C'est ainsi que *Neurospora crassa* cultivé en absence de nitrate ne possède pas de protéine nitrate réductase (BAHNS et GARRETT, 1980). De même, des mutants d'Orge NR⁻ tout comme des plantules de type sauvage, en sont également dépourvus lorsqu'ils sont cultivés sans nitrate (KUO et al., 1981 ; SOMERS et al., 1983).

Pourtant des observations divergentes ont été rapportées. Des caryopses de Maïs cultivés en absence de NO₃⁻ présentent pourtant une activité nitrate réductase (CHAMPIGNY, 1963). Dans des cellules de Tabac cultivées *in vitro* l'activité de réduction est indépendante de la teneur en NO₃⁻ (HEIMER et RIKLIS, 1979 ; MÜLLER et GRAFE, 1978). Par ailleurs on sait que de nombreux mutants dépourvus d'activité nitrate réductase globale présentent cependant des activités partielles telles que la fonction diaphorase. Enfin des

Chlorelles cultivées sur ammonium comme seule source azotée possèdent un antigène qui réagit avec des anticorps spécifiques de la nitrate réductase active (FUNKHOUSER et al., 1980). Il pourrait s'agir d'un précurseur inactif constitué par l'enzyme dépourvue en Mo (FUNKHOUSER et al., 1983). Dans ces conditions l'induction de la nitrate réductase consisterait en une transformation d'un précurseur inactif en enzyme active (VENNESLAND, 1981). Cette étape exigerait la synthèse d'un activateur (FUNKHOUSER et al., 1980).

Or le problème semble encore beaucoup plus complexe qu'il n'apparaît à première vue. On sait depuis quelques années qu'il existe des isoenzymes de la nitrate réductase chez l'Épinard (NOTTON et al., 1972), le Soja (CAMPBELL, 1976 ; JOLLY et al., 1976 ; ROBIN et al., 1985) ou le Maïs (CAMPBELL, 1978). L'analyse des isoenzymes du Soja soit en gel de polyacrylamide, (HEATH-PAGLIUSO et al., 1984) soit par électrophorèse et immunochimie (ROBIN et al., 1985) montre que l'une de ces isoenzymes dont l'activité n'est pas affectée par la cycloheximide est constitutive, alors que l'autre est inductible (HEATH-PAGLIUSO et al., 1984). Enfin on a pu caractériser un mutant de Soja, nr1 (NELSON et al., 1983, 1984) qui a perdu l'aptitude à synthétiser sa nitrate réductase constitutive ; ou bien il s'agit d'une mutation de type non sens : aucune protéine reconnaissable par des anticorps dirigés contre la nitrate réductase n'est synthétisée, ou bien les gènes structuraux ne sont pas exprimés et l'on se trouve en présence d'une mutation qui touche la régulation enzymatique.

Les mutants les plus étudiés sont ceux de l'Orge (SOMERS et al., 1983) de *Nicotiana tabacum*. (MENDEL et MÜLLER, 1978, 1979; 1980 ; MENDEL et al., 1981, 1982 ; BUCHANAN et WRAY, 1982) et de *Nicotiana glauca* (MARTON et al., 1982) qui présentent des mutations concernant

l'apoprotéine nitrate réductase (mutants nia) ou le cofacteur a molybdène (mutants cnx). Comme chez les Champignons (MARZLUF, 1981) tous les mutants nia sont alléliques (MARTON et al., 1982 ; MÜLLER, 1983).

Les études des mutations portant sur le cofacteur molybdique ont été entreprises afin de savoir si le molybdène jouait un rôle dans l'induction de la nitrate réductase.

Dès lors qu'il a été démontré que le Mo jouait un rôle important et dans l'activité de réduction du nitrate et dans l'assemblage des sous-unités, on s'est naturellement interrogé sur le rôle du métal dans l'induction enzymatique.

Les activités nitrate réductase chez le Chou-fleur carencé en Mo sont faibles (CANDELA et al., 1957 ; AFRIDI et HEWITT, 1964). Il en va de même pour l'Epinard (NOTTON et HEWITT, 1971) ou pour la Chlorelle (VEGA et al., 1971). Si du Mo est alors introduit dans la solution nutritive en même temps que des inhibiteurs de la synthèse protéique l'activité n'est pas induite (AFRIDI et HEWITT, 1964 ; HEWITT et NOTTON, 1967). Pourtant la fourniture de molybdène radioactif à des plants d'Epinard préalablement carencés fait apparaître un marquage dans la nitrate réductase (NOTTON et HEWITT, 1971). Ces résultats contradictoires ont été expliqués par un déficit en apoenzyme apparu au cours de la carence (NOTTON et al., 1979). De même chez la suspension cellulaire de rose la synthèse de l'apoenzyme est sensible aux inhibiteurs de la traduction mais son activation et l'incorporation du Mo y sont insensibles (JONES et al., 1976). Il en est de même pour les cellules de Tabac (HEIMER et FILNER, 1971).

Chez *Neurospora* le facteur molybdique est constitutif (NASON et al., 1970) : sa synthèse est indépendante de l'induction de la nitrate réductase et n'est pas répressible

par l'ammonium, ce qui, nous le verrons plus tard, n'est pas le cas de l'holoenzyme.

Chez *Aspergillus nidulans*, la situation est un peu différente puisqu'une répression partielle du cofacteur par NH_4^+ a été décrite (GARRETT et COVE, 1976).

Cette indépendance du cofacteur vis à vis de la synthèse des accepteurs que sont les molybdoenzymes, peut se comprendre si l'on admet qu'il est maintenu dans un pool de stockage constitué de molécules ou de structures "porteuses". Par ailleurs, le contrôle de la synthèse du cofacteur par le Mo est mal connu puisque dans certains cas elle peut avoir lieu en absence de métal (JOHNSON, 1980).

Si le cofacteur n'est pas nécessaire à l'induction de la nitrate réductase de *Neurospora* il pourrait moduler la régulation de l'enzyme par un mécanisme dit d'autorégulation (COVE et PATEMAN, 1969 ; DANTZIG et al., 1978). On peut en effet concevoir que des quantités mêmes faibles de l'enzyme répriment sa propre synthèse. L'addition de nitrate provoque la liaison substrat-enzyme ; celle-ci perd de ce fait sa fonction de répression et la synthèse enzymatique peut reprendre mais nécessite l'incorporation du cofacteur molybdique puisque la liaison NO_3^- -enzyme exige du Mo.

DANTZIG et al. (1978) constatent en effet qu'en présence d'analogues du Mo, comme le vanadium ou le tungstène, l'induction enzymatique persiste mais qu'il se forme des complexes inactifs. Ceux-ci incorporent donc le cofacteur et se lient à NO_3^- mais ne le réduisent pas.

Ce modèle permet d'expliquer pourquoi le Mo a pu être considéré avec le nitrate comme co-inducteur de la nitrate réductase de l'Orge (WRAY et FILNER, 1970).

La recherche de mutants NR⁻ et leur étude a permis d'établir des schémas très élaborés de la régulation de la nitrate réductase chez les Champignons et chez *Aspergillus nidulans* en particulier (COVE, 1979).

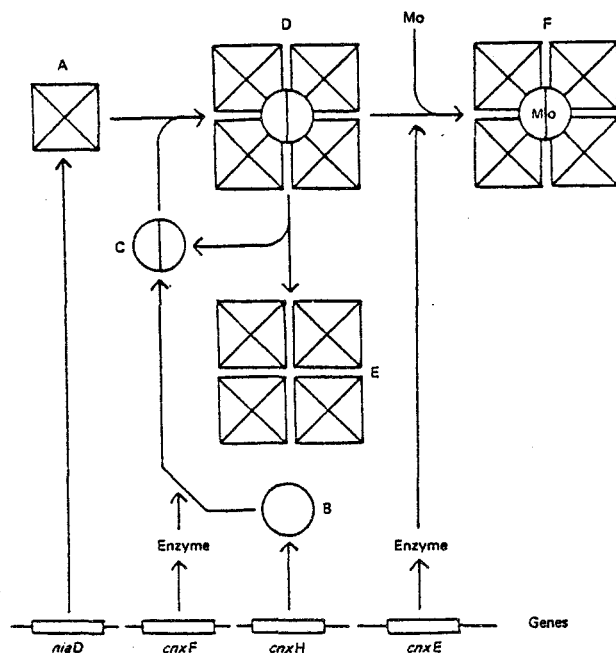


Figure X : Le ou les gènes *nia D* produisent une protéine A, ayant une activité diaphorase mais pas d'activité NR terminale. Les gènes *cnx* interviennent dans la production et l'activation du cofacteur: Le gène *cnx H* produit un polypeptide B qui après une modification par une enzyme codée par *cnx F* donne naissance à C, capable de s'associer à 4 A pour donner le tétramère D qui possède une activité diaphorase, mais non nitrate réductase. Pour que celle-ci apparaisse, il faut l'intervention du gène *cnx E* qui code pour une enzyme qui incorpore le Mo et aboutit à l'holoenzyme F.

Dans ce schéma il faut ajouter l'intervention d'un sixième gène *cnx J* qui jouerait un rôle dans la régulation

de la transcription du cofacteur (ARST et al., 1982).

Chez *Neurospora* un schéma inspiré du précédent a été proposé mais il est beaucoup moins précis et des incertitudes subsistent en particulier au niveau du fonctionnement du gène de régulation.

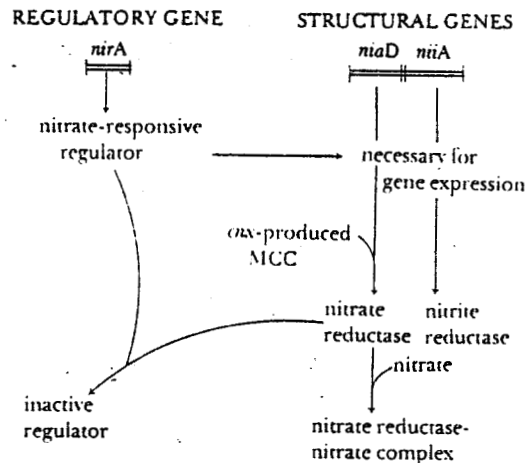


Figure XI : Régulation de la nitrate réductase de *Neurospora crassa* (GARRETT et AMY, 1978).

Chez les plantes supérieures la situation est beaucoup moins claire. La recherche de mutants résistant au chlorate qui n'utilisent pas le nitrate et qui ont un besoin d'azote réduit, a permis d'aborder d'une autre façon le problème du métabolisme du nitrate et de sa régulation. C'est ainsi que l'on a pu obtenir des mutants d'Orge (KLEINHOFs et al., 1980) d'*Arabidopsis thaliana* (OOSTINDIER et FEENSTRA, 1973) et surtout de cellules de Tabac (MÜLLER et GRAFE, 1978 ; BUCHANAN et WRAY, 1982) de *Datura innoxia* (KING et KHANNA, 1980) de *Rosa damascena* (MURPHY et IMBRIE, 1981) ou de protoplastes haploïdes de *Nicotiana plumbaginifolia* (MARTON et al., 1982) ou de *Hyoscyamus muticus* (FANKHAUSER et al., 1984). Les mutations portent sur les gènes nia et cnx. Des analyses de complémentarité effectuées par hybridation somatique de cellules de Tabac ont montré que dans ces cellules amphiploïdes, les synthèses de l'apo-protéine et du cofacteur molybdique sont contrôlées par un

mécanisme commun de régulation et qu'elles sont toutes deux induites par le nitrate. Le problème est alors de savoir si ces synthèses sont régulées par le même système, ou si la production d'apoprotéine déclenche la formation du cofacteur. La seconde éventualité paraît la plus vraisemblable ; en effet pour de nombreux mutants nia- la perte d'activité résulte d'une mutation du gène de structure plutôt que de celle du gène de régulation (MENDEL et al., 1982). Enfin les gènes de structure de l'apoprotéine de ces cellules de Tabac sont dupliqués (nia 1 et nia 2) mais ils ne sont pas liés et sont vraisemblablement portés par des chromosomes homéologues, bien que leur localisation chromosomique n'ait pas été déterminée. Les lignées nia- ont donc subi une double mutation au niveau des deux loci MULLER, 1983). L'analyse de mutants simples a permis de montrer que chaque locus est capable de produire des quantités normales de NADH : nitrate réductase active. Le mode de régulation de ces gènes structuraux nia est par ailleurs extrêmement intéressant. Pendant les premiers stades du développement de plantes régénérées à partir de lignées cellulaires l'expression génétique de l'apoprotéine répond à un effet de dosage des gènes, alors qu'elle y est insensible à des stades plus tardifs où elle est soumise à un mécanisme de régulation stricte.

Le contrôle génétique de la nitrate réductase s'effectue aussi par l'intermédiaire des gènes cnx

La mutagénèse de cellules haploïdes de *Datura innoxia* aboutit à l'obtention de lignées cellulaires qui perdent leurs activités nitrate réductase globale et terminale mais gardent, en l'absence de nitrate, une activité diaphorase qui peut-être multipliée par deux, si du NO_3^- est ajouté au milieu de culture. La mutation affecte donc vraisemblablement les gènes cnx (KING et KHANNA, 1980).

Un mutant cnx^- du Tabac contient le cofacteur molybdique qui peut s'associer à l'apoprotéine. Ce complexe est catalytiquement inactif mais possède la même densité de flottaison que la protéine native de la souche sauvage. L'association du cofacteur et des sous-unités de l'apoprotéine ne conduit donc pas obligatoirement à l'apparition d'une enzyme fonctionnelle qui nécessite la présence d'un ligand catalytique : le molybdène. En l'absence de celui-ci le cofacteur vide peut se lier à l'apoenzyme (MENDEL et al., 1981). Parmi tous les mutants NR^- obtenus actuellement, seuls les mutants cnx^- du Pois (FEENSTRA et JACOBSON, 1980) d'*Arabidopsis thaliana* (BRAAKSMA et FEENSTRA, 1982) et d'Orge (BRIGHT et al., 1983), présentent des caractères de léthalité lorsqu'ils sont cultivés sur nitrate. Des revertants ont été obtenus chez *Arabidopsis*. La reversion peut résulter d'une nouvelle mutation qui restaure exactement la séquence des nucléotides du type sauvage, ou bien, et c'est le cas le plus fréquent, elle provient d'une seconde mutation à un site différent de la première dont l'expression phénotypique est alors masquée. Or, chez *Arabidopsis* les revertants sont mutés dans un gène suppresseur SU^- indépendant de la mutation originelle qui affectait le gène de structure du cofacteur (BRAAKSMA et FEENSTRA, 1982).

Donc chez les végétaux supérieurs, comme chez *Aspergillus* ou *Neurospora* les gènes structuraux de l'apoenzyme et du cofacteur ont des localisations différentes.

Pourtant la compréhension de la régulation génétique des différents composants de la nitrate réductase demeure difficile parce que des mutants peuvent être classés dans différents groupes chez le Tabac. A côté des mutants nia^- existent deux groupes de mutants cnx^- ; les uns sont capables de restaurer le cofacteur molybdique en présence de concentration élevées en Mo dans le milieu de culture ou bien dans des expériences d'activité *in vitro* (MARTON et al., 1982),

alors que les autres en sont incapables.

Par ailleurs le problème est rendu encore plus complexe de par l'existence de nitrate-réductase, constitutive et inductible.

Chez l'Orge une mutation des gènes de structure de la NADH : NR est observée chez le mutant nar 1 qui peut cependant croître dans un milieu renfermant du NO_3^- . En effet la NAD (P) H, NR dont l'activité est habituellement masquée peut alors s'exprimer. Le gène nar 2 de l'Orge correspondrait par ailleurs aux gènes cnx d'*Aspergillus nidulans* et nit 1 de *Neurospora crassa* (KLEINHOFs et al., 1980 ; WARNER et KLEINHOFs, 1981 , DAILEY et al., 1982 ; SOMERS et al., 1983).

Chez les plantes supérieures on considère que les mutants sont habituellement caractérisés par une altération (très souvent une diminution) de leur activité NADH cytochrome oxydase mais gardent les activités xanthine-deshydrogenase ou xanthine oxydase si la mutation s'est effectuée au niveau de l'apoprotéine. Si elle a touché le cofacteur molybdique, une perte pleiotropique des activités nitrate réductase et xanthine oxydase ou déshydrogénase est observée. Chez le Soja, le mutant nr1 satisfait aux premiers critères attendus et semble donc être muté au niveau de la nitrate réductase constitutive. Pourtant la nécessité du Mo pour l'activité nitrate réductase constitutive a été remise en question (ASLAM, 1982 ; KAKEFUDA et al., 1983). En effet la fourniture de tungstène provoque une inactivation bien plus importante de l'enzyme inductible que de l'enzyme constitutive. Ce résultat surprenant a été interprété de la façon suivante : ou bien la NR constitutive fait une distinction entre Mo et W et incorpore préférentiellement le Mo (ASLAM, 1982) ou bien les cofacteurs à Mo sont structurellement différents et ne sont pas interchangeables ce qui est en contradiction avec l'idée généralement admise de l'universalité du cofacteur molybdique

(sauf, on l'a vu, le cofacteur de la nitrogensase).

Lorsque nr1 se développe sur NO_3^- il apparaît une activité nitrate réductase correspondant à la NR inductible, alors que des lignées sauvages se développant sur urée possèdent une activité constitutive. Si les Km des deux systèmes enzymatiques sont identiques, leurs pH optimaux d'activité sont différents et la NR constitutive utilise moins le FMNH₂ que la NR inductible. On peut donc s'interroger sur le rôle biologique réel de la NR constitutive du Soja (NELSON et al., 1984).

Enfin comment expliquer que chez certains mutants NR⁻ du Tabac s'observent des accroissements concomitants des activités nitrite réductase et diaphorase de la nitrate réductase ? Est-ce un effet pleiotropique de la mutation qui inhibe l'activité nitrate réductase globale ou bien est-on en présence de modifications génétiques indépendantes (MENDEL et MULLER, 1979) ? On connaît en effet chez les Champignons des modifications semblables de la régulation de la nitrite réductase lorsque la structure de la nitrate réductase est modifiée. Cette dernière jouerait un rôle autorégulateur (PATEMAN et al., 1967 ; COVE et PATEMAN, 1969).

Par ces quelques exemples choisis dans la littérature, on voit donc que la régulation génétique du métabolisme azoté en général et de la nitrate réductase en particulier est encore loin d'être compris chez les végétaux supérieurs. L'obtention de revertants chez le Tabac (GRAFE et MULLER, 1983) permettra peut-être de mieux comprendre cette régulation.

b) Contrôle par la quantité d'enzyme: Rôle des produits de la réduction.

Lorsque l'ammonium constitue la seule source d'azote, la croissance d'un Champignon tel que *Neurospora crassa* est possible, mais s'accompagne d'une inhibition de la perméation

de l'azote ainsi que de la répression des voies métaboliques qui permettent sa réduction. Ces phénomènes constituent ce qu'il est convenu d'appeler la "répression par l'ammonium" (FACKLAM et MARZLUF, 1978). Bien que son mécanisme soit inconnu, on pense qu'elle consiste en l'arrêt d'une régulation génique positive. Le facteur régulateur est sans doute le produit d'un gène *nit2* ; toute mutation qui intervient en effet à ce locus abolit l'expression pléiotropique des gènes qui permettent l'utilisation de diverses sources azotées. En absence d'ammonium, ces autres voies sont déréprimées (FACKLAM et MARZLUF, 1978). Pourtant l'induction par des substrats appropriés est parfois nécessaire à l'expression de ces voies métaboliques ; en absence d'ammonium, le nitrate, le nitrite ou les deux à la fois, vont accroître énormément la voie assimilatrice du nitrate qui sera réduit en ammonium, on parle alors d'induction par le nitrate (GARRETT, 1972) et nous avons vu toute l'ambiguïté que peut recouvrir ce terme.

Chez *Neurospora crassa* un mutant dit *ams* qui n'a pas d'activité NADP-glutamate deshydrogénase, peut en présence d'ammonium synthétiser la nitrate réductase, alors que certains acides aminés comme l'arginine, le glutamate ou la proline la répriment, si bien qu'il semble plus approprié de parler d'une répression par un métabolite de l'azote que d'une répression par l'ammonium (DANTZIG et al., 1978, 1979). Ce métabolite pourrait bien être la glutamine à moins que la répression ne s'exerce par la glutamine synthétase. La régulation se ferait en modulant l'expression de *nit2*. Lorsque les besoins cellulaires en azote sont satisfaits, la glutamine synthétase adopterait une configuration essentiellement octamérique et l'expression de *nit2*, inutile, serait réprimée. Lorsque, par contre, la glutamine devient facteur limitant, la glutamine synthétase deviendrait tétramérique, le gène *nit2* qui régule les autres voies possibles du métabolisme azoté, s'exprime (DUNN-COLEMANN et al, 1979).

Une autre approche, beaucoup plus simple (dans son expression) a été proposée par PREMAKUMAR et al. (1978) pour qui la glutamine réprime la transcription des mRNA de la nitrate réductase.

Une répression du même type est observée sous l'effet de l'ammonium. En effet le nitrate stimule la transcription du mRNA nitrate réductase (SUBRAMIAN et SORGER, 1972 ; PREMAKUMAR et al., 1978) et l'induction par le nitrate passe par une synthèse *de novo* de l'enzyme (BAHNS et GARRET, 1980) ; en présence d'ammonium seul, l'activité nitrate réductase n'est pas décelable même si du nitrate est fourni et aucune forme antigénique catalytiquement inactive n'existe (AMY et GARRETT, 1979).

Chez les plantes supérieures les résultats sont, comme toujours, beaucoup plus confus et contradictoires; l'ammonium peut inhiber ou stimuler l'activité nitrate réductase sans que cette action ne soit forcément liée à une répression ou à une induction de la synthèse protéique. Pourtant, d'une façon générale, l'ammonium ou certains acides aminés provoquent une diminution de la quantité de nitrate réductase chez les racines de Maïs, de Coton, d'Orge (OAKS, 1979 ; OAKS et al., 1977 ; RADIN, 1975 ; SMITH et THOMPSON, 1971) comme dans des cultures cellulaires de Tabac, de Tomate ou de Soja (BAYLEY et al., 1972 ; BEHREND et MATELES, 1975 ; HEIMER et FILNER, 1970), mais des exceptions ont été décrites dans les plantules de Riz (SHEN, 1969) ou des cellules de Blé (BAYLEY et al., 1972) et de Rose (MOHANTY et FLETCHER, 1976). Chez *Phaseolus aureus*, l'ammonium jouerait un rôle d'inducteur de la nitrate réductase (HIGGINS et al., 1974) alors que chez la Lentille d'eau il agirait comme répresseur de la transcription (OREBAMJO et STEWART, 1975).

Chez les cellules de Tabac, les acides aminés ont d'abord été considérés comme répresseurs de la nitrate réductase (HEIMER et FILNER, 1970) alors que, dans des travaux ultérieurs, leur contrôle s'exercerait au niveau post-transcriptionnel (HEIMER et RIKLIS, 1979).

Il est intéressant de noter ici que chez des procaryotes, capables d'utiliser alternativement l'azote moléculaire ou le nitrate comme certaines bactéries ou les cyanophycées chimiotrophes et aérobies, la nitrate réductase est inductible. Chez les espèces qui ne fixent par le N_2 mais utilisent plutôt le nitrate, c'est la "répression par l'ammonium" qui paraît constituer le mécanisme de contrôle.

C'est là un exemple significatif dont il faut tenir compte dans une réflexion sur la physiologie ou la biochimie comparée (LOSADA, et al., 1981)

c - Régulation de l'activité : Modifications conformationnelles.

A côté des modifications à long terme qui mettent en jeu des synthèses protéiques, il faut considérer des variations plus ou moins rapides du niveau d'activité en réponse aux changements environnementaux.

Le transfert de feuilles à l'obscurité ou en atmosphère dépourvue en CO_2 amène une chute rapide de l'activité nitrate réductase (KANNAGARA et WOOLHOUSE, 1967 ; TRAVIS et al., 1969). Cette baisse de l'activité peut s'expliquer par des phénomènes métaboliques mais aussi par la présence d'inhibiteurs spécifiques de la nitrate réductase.

De telles protéines inactivatrices ont été isolées chez le Maïs, le Riz ou le Soja (BATT et WALLACE, 1983 ;

YAMAYA et OHIRA, 1976, 1977, 1978 ; JOLLY et TOLBERT, 1978). Leur poids moléculaire ainsi que leur composition en sous-unités ont été déterminés (YAMAYA et al., 1980). Elles sont enfin bien spécifiques de la nitrate réductase et chez le Maïs ou le Soja elles inactivent la partie cytochrome c réductase de l'enzyme mais non la moitié terminale nitrate réductase (YAMAYA et al., 1980).

Ces protéines sont de deux sortes : ou bien elles possèdent une légère activité protéolytique (WALLACE, 1974) et se trouvent aussi bien chez *Neurospora* (SORGER et al., 1978) que dans les végétaux supérieurs où elles sont surtout localisées dans les racines (WALLACE, 1978 ; YAMAYA et al., 1980). Leur activité augmente lors du vieillissement et l'activité nitrate réductase diminue de façon concomitante (WALLACE, 1978 ; OAKS et al., 1979). Ou bien ce sont des protéines qui se lient spécifiquement à la nitrate réductase sans l'hydrolyser (KADAM et al., 1974 ; JOLLY et TOLBERT, 1978).

L'inactivase du Riz peut se lier à la nitrate réductase de la Chlorelle et produire un complexe dépourvu d'activité NADH : nitrate réductase, d'activité cytochrome c réductase mais gardant l'activité nitrate réductase terminale. Une à deux molécules d'inactivase pourraient se lier à un complexe tétramérique de l'enzyme.

Quant à l'inactivase du Maïs, elle clive la nitrate réductase en deux fragments. Le plus grand a une masse moléculaire de 280 000 daltons et réduit le NO_3^- à l'aide d'électrons fournis par le méthyl viologène réduit ; il contient de l'hème et du molybdène, il est constitué de quatre polypeptides de 70.000 daltons chacun. Quant au petit fragment de P.M. : 30.000, il contient du FAD mais n'est pas composé de sous-unités. Cette inactivase du Maïs en provoquant le clivage en un site bien déterminé de l'enzyme est donc bien spécifique de la

nitrate réductase et non une protéase banale. Ces résultats sont intéressants dans la mesure où ils renseignent sur la structure de la nitrate réductase de la Chlorelle ; comme l'inactivase ne modifie ni la structure tétramérique, ni l'association des sous-unités, il est vraisemblable que les sites d'assemblage sont localisés dans la moitié réductrice terminale, alors que la moitié NADH : NR ne semble pas jouer un rôle significatif dans la structure quaternaire de l'enzyme (SOLOMONSON et al., 1984).

Dans le cas de la Lentille d'eau, l'ammonium inhibe l'activité nitrate réductase ; cette action s'exerce peut-être par l'intervention d'une inactivase dans la mesure où des interactions réversibles protéine-protéine ont été décrites (OREBAMJO et STEWART, 1975).

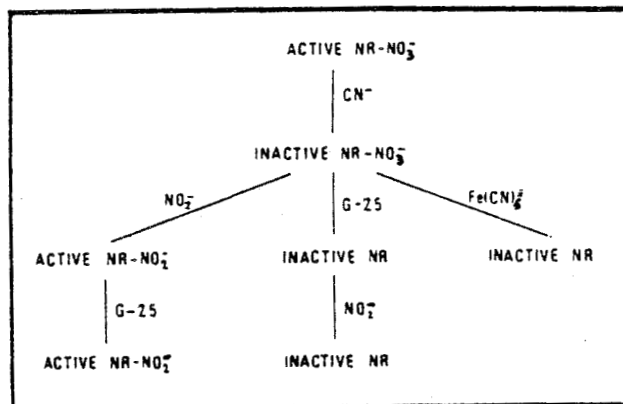


Figure XII : Effets du cyanure et du nitrite sur l'activité nitrate réductase de l'Orge (KAPLAN et al., 1984).

Dans les feuilles de plantules de Haricot le nitrite peut augmenter d'une façon importante l'activité nitrate réductase (KAPLAN et al., 1974). Cette action se retrouve dans des réactions *in vitro* d'extraits de feuilles d'Orge si bien que le nitrite peut être considéré comme un activateur de l'enzyme (KAPLAN et al., 1978) et d'une sous-unité constitutive, qui pourrait bien être le cofacteur à molybdène (KAPLAN et al., 1984) capable de réduire le nitrate après un prétraitement par le NO₂⁻.

La dissociation de la sous-unité à molybdène de l'enzyme active pourrait être le fait de l'apparition de cyanure.

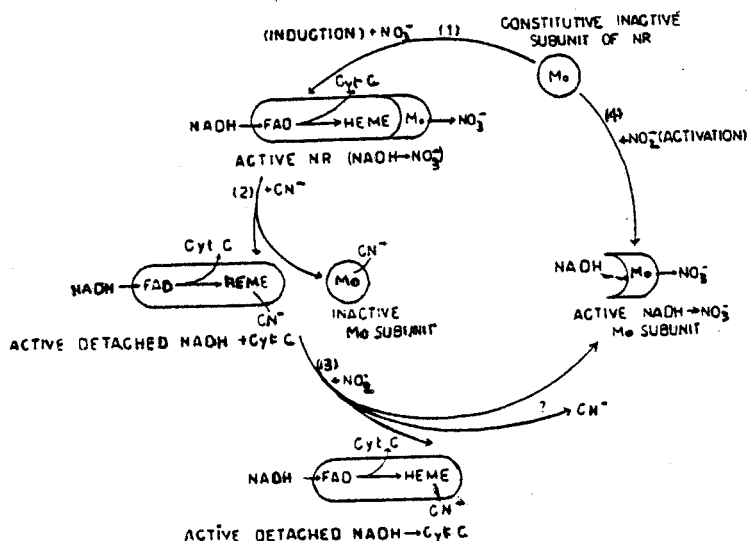


Figure XIII : Modèle montrant les relations entre la nitrate réductase inductible et une sous-unité constitutive de la nitrate réductase de végétaux supérieurs (KAPLAN et al., 1984).

d) Régulation de l'activité par les produits du métabolisme.

La nitrate réductase est active lorsqu'elle se trouve sous une forme oxydée et inactive sous sa forme réduite (LOSADA et al., 1970). Ces deux états sont métaboliquement convertibles.

Chez la Chlorelle la nitrate réductase est inhibée en absence de nitrate et de CO_2 et en présence d'une pression partielle élevée d' O_2 et sous des intensités lumineuses élevées (PISTORIUS et al., 1976). L'inactivation résulterait de la formation d'un complexe cyanure-enzyme réduite qui garde sa fonction diaphorase et qui est réactivable par le ferricyanure (VENNESLAND, 1981). Le rôle du nitrate consisterait à maintenir l'enzyme sous une forme oxydée active. Quant aux autres facteurs, en absence du NO_3^- ils seraient générateurs d'acide cyanhydrique qui agit à des concentrations très faibles: de l'ordre de 10^{-9} M.

L'HCN est le résultat d'une réaction de l'hydroxylamine et du glyoxylate issu de la fonction oxydase de la ribulose diphosphate carboxylase (SOLOMONSON et SPEHAR, 1977). L'histidine est une autre source possible d'HCN (VENNESLAND, 1981).

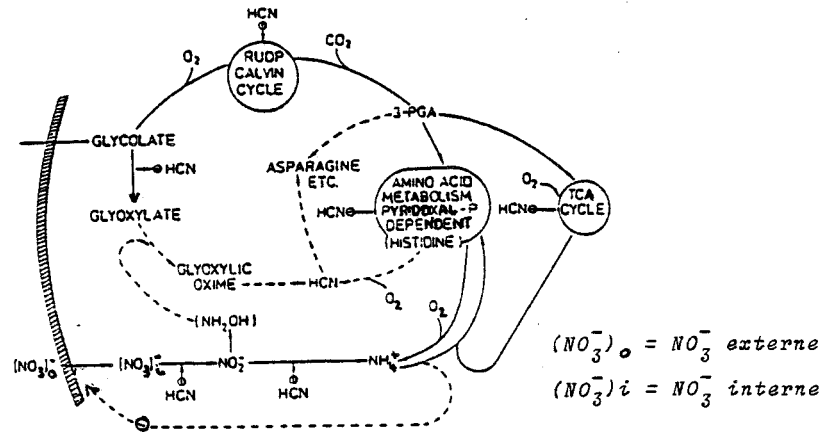


Figure XIV : Régulation de l'utilisation du nitrate, relations éventuelles avec le métabolisme de l'HCN chez la chlorelle (VENNESLAND, 1981).

Parmi les divers métabolites qui provoquent une conversion complète de l'enzyme active en enzyme inactive, en une ou deux heures, figure l'ammonium. Ce phénomène a été particulièrement bien décrit chez les algues sous le terme "d'interconversions métaboliques" (LOSADA et GUERRERO, 1979 ; VENNESLAND et GUERRERO, 1979). L'inactivation consiste en une perte de l'activité terminale de l'enzyme et serait liée à la réduction du groupement molybdique (LOSADA et al. 1981); elle pourrait également résulter d'un découplage de la photophosphorylation et d'un accroissement de la teneur en ADP et du pouvoir réducteur (LOSADA 1976). Quel que soit le mécanisme inhibiteur, la réactivation est possible, en absence de toute synthèse protéique, dès l'instant où le milieu de culture ne contient plus d'ammonium. L'apport de nitrate permet alors de réactiver l'enzyme. Cette réactivation peut également être obtenue *in vitro* par l'apport d'oxydants tels le ferricyanure et le nitrate (DIEZ et al., 1977 ; HERRERA et al., 1972 ; LOSADA et al., 1970). Or curieusement chez l'algue rouge *Cyanidium*

des traitements qui entraînent la perte de l'activité diaphorase ou qui modifient la structure de la protéine enzymatique réactivent l'enzyme préalablement rendue inactive par l'ammonium (RIGANO et al., 1979). Le complexe enzymatique posséderait dans une partie labile un site inhibiteur auquel se lierait un produit du métabolisme azoté (l'ammonium, la glutamine ?). Les traitements qui altèrent ce site allostérique, amèneraient la réactivation enzymatique (RIGANO et al., 1980). Chez *Chlamydomonas*, le transfert des cellules à l'obscurité mime l'inactivation par l'ammonium (THACKER et SYRETT, 1972; VEGA et al., 1980).

Chez les plantes supérieures, les résultats sont très souvent semblables à ceux obtenus chez les algues. Pourtant, des cas de stimulation de l'activité nitrate réductase par l'ammonium ont été signalés chez le Pois (SIHAG et al., 1978) ou dans des feuilles de Blé (VIJAYARAGHAVAN et al., 1979). NH_4^+ peut stabiliser l'activité mesurée *in vivo* (SIHAG et al., 1978 ; DATTA et al., 1981).

Mais très fréquemment, l'ammonium inhibe l'activité nitrate réductase (OREBAMJO et STEWART, 1975 ; BUCZEK, 1979 ; JORDAN et FLETCHER, 1980). Des exemples "d'interconversions métaboliques" ont également été décrits chez le Riz (LEONG et SHEN, 1979), l'Epinard (PALACIAN et al., 1974) ou des cellules de Tabac (TRINITY et FILNER, 1979). Il faut remarquer que l'inactivation est très souvent transitoire et qu'elle ne s'exerce pas *in vitro*. Cette dernière propriété a une incidence pratique importante ; il est ainsi possible de procéder à des précipitations protéiques fractionnées par le sulfate d'ammonium, sans altérer l'activité enzymatique.

La disparité des résultats observés chez les plantes supérieures a plusieurs raisons. En premier lieu intervient la diversité des espèces étudiées ; il n'est, à priori, pas étonnant que le métabolisme azoté de plantules de légumineuses soit profondément différent de celui de plantules de céréales ou de coton ou de celui de suspensions cellulaires. La seconde cause est la variabilité importante de la teneur en ammonium présente dans les divers milieux de culture ; selon les expérimentateurs elle s'étend de moins de 1 mM à 100 mM. Enfin, l'action de l'ammonium est étudiée, soit en nutrition ammoniacale pure (NH_4^+ est l'unique source d'azote), soit en nutrition mixte (NH_4^+ ajouté à une autre source d'azote, très souvent NO_3^-). Dans ce dernier cas, l'introduction de NH_4^+ , tout en inhibant l'activité nitrate réductase, ou bien ne modifie pas la croissance (MAC KOWN, 1982) ou l'exalte (GAMBORG, 1970 ; JORDAN et FLETCHER, 1980 ; MOHANTY et FLETCHER, 1976, 1978).

Quant à l'action des acides aminés, elle est là encore très variable, et dépend essentiellement de leur nature.

L'alanine et l'asparagine par exemple répriment l'activité nitrate réductase de cellules de Tabac alors que l'arginine ou la lysine la dérepriment (FILNER, 1966). Dans les cultures cellulaires d'*Ipomoea* on peut distinguer trois classes d'acides aminés : les uns augmentent l'activité au cours des premiers stades de la culture, les autres l'abaissent ; quant à ceux de la troisième classe, leur action varie selon le stade de la croissance (ZINK, 1982).

La glutamine peut, quant à elle, diminuer de 50 % l'activité de cellules de Soja (OAKS, 1974) ou au contraire, dans le même matériel, l'accroître (BAILEY et al., 1972). Chez le Coton, glutamine, asparagine et glycine inhibent l'activité (RADIN, 1977) alors que dans des cellules de *Datura innoxia* la glutamine et la glycine l'accroissent mais l'arginine l'inhibe (FUKUNAGA et KING, 1982).

Dans ces conditions, on peut se demander si l'action des acides aminés ou de certaines amides ne traduit pas plutôt la conséquence de leur intervention dans la croissance (MARION-POLL et al., 1984), à moins que la désamination de certains d'entre eux ne produise de l'ammonium qui serait le véritable effecteur.

e) Régulation de l'activité par l'accessibilité du substrat.

Comme certaines plantes sont capables d'accumuler du nitrate en quantités importantes, on a rapidement soupçonné l'existence d'un mécanisme d'absorption comportant une composante active qui nécessite de l'énergie métabolique. Chez certaines algues vertes qui ne possèdent pas de vacuome, la réduction du nitrate suit immédiatement son absorption. Ce genre de considérations a amené, comme nous l'avons vu plus haut, BUTZ et JACKSON à bâtir un modèle de nitrate réductase qui tienne compte de ces deux types d'activités. Nous avons dit pourquoi il était actuellement controversé. Il n'en demeure pas moins vrai que, chez les Champignons comme chez de nombreuses plantes supérieures, le nitrate est un inducteur du système de perméation.

L'ammonium ou certains produits de son assimilation l'inactivent ou le répriment (voir LOSADA, et al., 1981)

Enfin en nutrition azotée mixte, l'absorption du nitrate ne débute que lorsque l'ammonium est, sinon totalement absorbé, du moins largement utilisé (SHEN, 1969 ; FERGUSON et BULLARD, 1969 ; BAILEY et al., 1972 ; MOHANTY et FLETCHER, 1976). Après avoir pensé que l'ammonium agissait directement sur l'activité nitrate réductase (MORTON, 1956 ; SYRETT et MORRIS, 1963 ; FERGUSON, 1969) il est maintenant largement admis qu'il modifie l'absorption du NO_3^- (PISTORIUS et al., 1978 ; TISCHNER et LORENZEN, 1979). L'inhibition est immédiatement levée par le retrait de NH_4^+ . En présence d'inhibiteurs spécifiques

des glutamine synthase ou synthétase, l'ammonium n'inhibe pas l'absorption du nitrate (FLORES, 1983). Ces résultats plaident pour une régulation de l'absorption de NO_3^- par un métabolite situé après NH_4^+ dans la chaîne d'assimilation de l'azote. On se trouve donc en présence d'un mécanisme très sensible de feed back, exercé par une substance non identifiée (LOSADA et al., 1981) jusqu'à présent.

Pourtant si le nitrate est évidemment nécessaire à l'activité nitrate réductase, il n'existe pas de relation simple entre activité et teneur en nitrate. Celui-ci peut en effet s'accumuler dans la vacuole (pool de stockage) et participer à la régulation du pH et à l'équilibre des charges. Cette accumulation a été particulièrement bien mise en évidence par l'isolement de vacuoles de cellules foliaires d'Orge (MARTINOIA et al., 1981 ; GRANSTEDT et HUFFACKER, 1982). De nombreuses observations ont montré que c'est le flux de NO_3^- qui régule l'activité nitrate réductase (HEIMER et FILNER, 1971 ; SHANER et BOYER, 1976 ; REED et al., 1980). L'utilisation d'isotopes de l'azote, et de $^{15}\text{NO}_3^-$ en particulier, ont montré que dans des conditions de nutrition nitrique, le nitrate endogène n'est réduit qu'en faible quantité, alors que le nitrate absorbé l'est totalement (MORGAN et al., 1973 ; JACKSON et al., 1973 ; PEARSON et al., 1981 ; MAC KOWN et al., 1981-1982).

Le transfert de plantules de Maïs d'un milieu contenant du NO_3^- à un milieu qui en est dépourvu, provoque une augmentation importante de la fraction de nitrate endogène réduit. Pourtant sa réduction n'est possible qu'après une fuite ou une exsorption de l'ion vers le milieu extérieur et sa réabsorption par un système transporteur (MAC KOWN, et al., 1983).

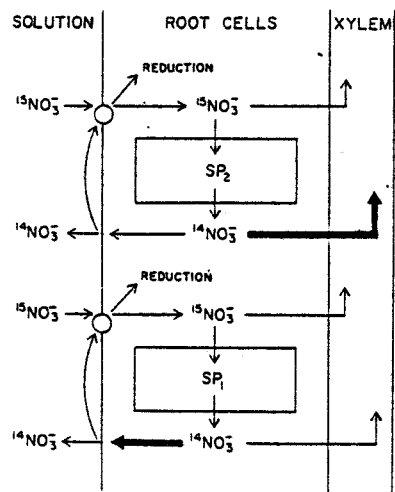


Figure XV : Relations entre réduction et mouvements du nitrate dans les racines (MAC KOWN et al., 1983).

Chez les végétaux supérieurs comme chez les algues non vacuolisées, la réduction du nitrate semble donc bien s'effectuer en étroite relation avec son absorption.

f) Nitrate réductase et différenciation, rôle des hormones végétales.

La différenciation de structures organisées nouvelles à partir de cellules cultivées en suspension, ou d'explants de divers organes, doit se traduire par des phénomènes de contrôle génétique qui s'accompagnent de modifications qualitatives et quantitatives d'enzymes (BONNER, 1965).

Les suspensions cellulaires ont très souvent été utilisées pour étudier la régulation de la nitrate réductase au cours de la croissance de la culture, ou l'action de l'azote réduit combiné. La modification du zymogramme des enzymes de la réduction et de l'assimilation de l'azote a été mise en parallèle avec la croissance ou la senescence (SCOTT et NEYRA, 1979 ; KANG et TITUS, 1980 ; STREIT et FELLER, 1982). De plus ces investigations concernent essentiellement les enzymes de l'assimilation de l'ammonium et rarement la

nitrate réductase.

Les variations de l'activité nitrate réductase ont par contre été bien étudiées au cours de la germination des graines et du développement des plantules. De nombreux travaux publiés, il ressort que l'activité est toujours la plus élevée dans les tissus "jeunes et métaboliquement actifs" selon la formule d'EVANS et NASON (1953). En effet dans les plantules de Coton (RADIN, 1974, 1975) du Citronnier (BAR-AKIVA et SAGIV, 1967) ou du Maïs (WALLACE, 1973 ; ASLAM et OAKS, 1976 ; OAKS et STULEN, 1980) l'activité est toujours la plus élevée dans les apex racinaires.

Lorsque l'activité apparaît dans les feuilles, elle est également la plus intense dans les jeunes feuilles et dans leurs portions méristématiques aussi bien chez le Concombre (BLAHOVA et SEGETA, 1980) le Pois (GAYDINOVA, 1982) que le Mil (NGAMBI et al., 1981) ou l'Orge (WALLACE, 1973 ; CHATTERJEE et al., 1980).

La variation des activités de la nitrate réductase, ou des enzymes de l'assimilation azotée, n'a guère été explorée en relation avec les phénomènes de différenciation organogène. A notre connaissance les seuls travaux publiés concernent la caulogénèse dans des cals de Canne à sucre (DWIVEDI et al., 1984) et l'embryogénèse somatique d'une suspension cellulaire de Carotte (KAMADA et HARADA, 1984). Chez la Canne à sucre l'activité nitrate réductase est plus élevée dans les cals qui produisent des tiges, que dans ceux qui n'en produisent pas. L'accroissement de l'activité pourrait être dû, d'une part à un ralentissement du taux d'inactivation ou de dégradation de l'enzyme et d'autre part à un accroissement de son taux d'activation ou de synthèse. Enfin la différenciation caulogène s'accompagne d'un pic des activités de la glutamine synthétase et de la GOGAT alors que l'activité glutamate deshydrogénase est faible.

On sait enfin que l'apport d'azote réduit favorise souvent l'embryogénèse somatique (HALPERIN et WHETERELL, 1965 ; REINERT et al., 1967 ; KAMADA et HARADA, 1979 ; WALKER et SATO, 1981). Ainsi l'apport d'alanine, d'acide glutamique, d'acide aspartique, de glutamine ou d'asparagine dans une suspension cellulaire de Carotte provoque l'apparition et le développement d'embryons somatiques, alors que la leucine ou la valine sont inhibiteurs (KAMADA et HARADA, 1979). Or l'incorporation des premiers stimule la prolifération cellulaire et la synthèse protéique nécessaires à l'apparition d'embryons globulaires. L'activité nitrate réductase est accrue dès le 7^{ème} jour de la culture. L'addition de la leucine ou de la valine se traduit au contraire par une inhibition de la prolifération, de la teneur en protéines intracellulaires et de l'activité nitrate réductase (KAMADA et HARADA, 1984).

Il est également bien connu que la morphogénèse et la différenciation sont sous le contrôle des hormones dont l'action pourrait être régulée par le phytochrome.

Les gibbérellines ne semblent pas modifier l'activité de la nitrate réductase et sont incapables d'induire l'enzyme dans les couches à aleurone de l'Orge (FERRARI et VARNER, 1970).

L'auxine, par contre, stimule l'activité nitrate réductase des feuilles, et cet effet n'est pas le simple résultat d'un accroissement de la synthèse protéique globale (ROTH-BEJERANO et LIPS, 1970).

Mais les cas les plus nombreux d'augmentation de l'activité nitrate réductase sont dûs à l'application de cytokinines, seules ou en association avec d'autres hormones telles les gibbérellines (ROTH-BEJERANO et LIPS, 1970 ; KENDE et al., 1971 ; DILWORTH et KENDE, 1974 ; KNYPL, 1979 ; TENCATE et BRETELER, 1982). Curieusement la kinétine permet d'accroître

l'activité d'embryons d'*Agrostemma githago* en absence de nitrate (KENDE et SHEN, 1972). Par ailleurs, la stimulation de la nitrate réductase par la kinétine est inhibée chez le Maïs par la 6-méthylpurine et la cycloheximide ; ceci laisse supposer que l'hormone provoque une synthèse *de novo* de l'enzyme (RAO et al., 1984). Dans ce même matériel, l'action de la kinétine est accrue par la lumière rouge mais les deux facteurs semblent agir indépendamment et ne sont pas liés au phytochrome (RAO et al., 1984).

Il est possible que les flavines de la molécule enzymatique jouent un rôle dans la photoréactivation de la nitrate réductase (APARICIO et MALDONADO, 1979).

Pourtant les résultats concernant le contrôle de la nitrate réductase par les hormones ne sont pas satisfaisants. La plupart des analyses ont été effectuées longtemps après que les hormones aient été appliquées et les conditions de la croissance n'ont pas été suffisamment précisées (KNYPL, 1979).

La multiplicité des modèles structuraux ou de régulation de la nitrate réductase témoigne de l'intérêt porté à une enzyme clé du métabolisme azoté et de l'acharnement mis à comprendre son fonctionnement. Son efficacité catalytique fait sans doute qu'elle n'est jamais très abondante dans les tissus, ce qui constitue bien sûr une entrave à son étude.

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

Certes, c'est une nature simplifiée, préparée, parfois mutilée en fonction de l'hypothèse préalable, que l'expérimentation interroge ; il n'empêche qu'elle garde en général les moyens de démentir la plupart des hypothèses.

I. PRIGOGINE et I. STENGERS
(La nouvelle alliance)

I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE

A - La suspension cellulaire du Silène

Silene alba (Miller) E.H.L. Krause (= *Lychnis dioica* L.) est une mauvaise herbe des chemins et des lieux incultés appartenant à la famille des Caryophyllacées.

La culture *in vitro* d'entre-noeuds de tige produit des cals néoformés qui, repiqués régulièrement sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG, forment après quelques passages une souche dite sa₁.

La dilacération de ces colonies et leur culture dans un milieu liquide contenant de l'acide 2,4 dichlorophenoxyacétique (2,4 D) permet l'obtention d'une suspension cellulaire dont le cycle de croissance est de 14 jours (DUBOIS, 1975). Ces cellules ne contiennent pas de chloroplastes mais sont riches en proplastides ainsi qu'en leucoplastes amylofères pendant les 6 premiers jours de la culture. Puis le nombre de leucoplastes diminue et le vacuome devient plus important, si bien qu'en phase stationnaire le cytoplasme est repoussé à la périphérie ; la vacuole occupe alors la presque totalité du volume cellulaire (DUBOIS, 1980).

La culture s'effectue en milieu non renouvelé (" batch cultures") à 25° C et en lumière continue (2 W.m⁻²). Environ 3 g de cellules sont introduits dans 200 ml d'une solution nutritive contenue dans des fioles de 500 ml qui sont placées sur un agitateur rotatif Biolafitte tournant à 70 tours par minute.

Le milieu de culture est celui mis au point par LESCURE (1969) pour la culture des cellules d'Erable (Tableau I). Il est stérilisé à 120° C pendant 20 min.

Tableau I : Composition de la solution nutritive des cellules de Silene.

Eléments minéraux : (mg)

KNO ₃	1 960	
Ca (NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	290	
KCl	65	
KH ₂ PO ₄	500	
Na ₂ H PO ₄ , 12H ₂ O	97	
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	360	
Fe SO ₄ , 7H ₂ O	2,8	
Na ₂ EDTA	3,72	
Mn SO ₄	4,5	
Zn SO ₄ , 7H ₂ O	1,5	
KI	0,75	
H ₃ BO ₃	1,5	
Eléments organiques		
Thiamine HCL (vitamine B1)	1	mg
Acide 2,4 dichlorophenoxyacétique	1	mg
Saccharose	20	g
Eau	q.s.p.f.	1 000 ml

Ce milieu contient 300 mg d'azote nitrique par litre et son pH est de 5,8. Dans certaines expériences la teneur en nitrate a été divisée par 4, l'appoint en K⁺ et en Ca⁺⁺ a alors été réalisé à l'aide de solution de KCl et CaCl₂.

Lorsque l'azote nitrique a été totalement ou partiellement remplacé par de l'azote combiné minéral ou organique (ammonium, glutamine, acide glutamique) le pH du milieu a été maintenu à 5,8 par une solution à 50 mM d'acide 2 (N-morpholino) éthane sulphonique (MES).

B - L'Endive. *Cichorium intybus* L. var. Witloof cv. Zoom.

1) La plante

La Chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus*) encore appelée Chicorée Witloof, mot néerlandais signifiant feuille blanche, est une Astéracée bisannuelle de jours longs. Pendant la première année de végétation, la graine se développe en une plante qui possède une racine tubérisée et des feuilles vertes disposées en rosette. Au cours de la seconde année se forme l'appareil floral qui produit les graines. En septembre ou octobre de la première année, les feuilles sont coupées et les racines récoltées mécaniquement, sont conservées soit à la température ambiante, soit en chambre froide. Elles sont ensuite disposées verticalement en rangs serrés soit dans des tranchées creuses dans le sol (culture traditionnelle) soit dans des bacs de 2 x 2 m disposés les uns au dessus des autres et contenant une solution nutritive plus ou moins riche en éléments minéraux (culture hydroponique).

Quelle que soit la méthode de culture choisie elle s'effectue à l'obscurité et à une température proche de 18° C. Après 18 à 20 jours, il se forme un bourgeon étioilé dont les feuilles restent serrées les unes contre les autres : l'Endive dont l'appellation locale est: Chicon. Au cours de cette culture à l'obscurité encore nommée forçage, de nombreuses racines secondaires apparaissent le long de la racine tubérisée.

Des explantats prélevés, sur des racines non forcées ou sur des feuilles étioilées, qui possèdent un limbe peu développé mais une nervure centrale épaissie, lorsqu'ils sont cultivés *in vitro*, sont susceptibles de former des bourgeons néoformés végétatifs ou floraux, ou des racines (GAUTHERET, 1959 ; PAULET et NITSCH, 1964 ; VASSEUR, 1965).

2) Mise en culture d'explants racinaires

Les racines tubérisées sont épluchées puis immergées dans une solution aqueuse d'hypochlorite de calcium à 140 g.l⁻¹

pendant 25 min. puis rincées trois fois par de l'eau stérile pendant 5, 10 puis 15 min.

Des cylindres de 6 mm de diamètre sont prélevés dans la région cambiale à l'aide d'un emporte pièces. Selon le type d'expérience, ces cylindres sont découpés aseptiquement en disques de 2, 10 ou 20 mm d'épaisseur, puis mis en culture dans un milieu nutritif liquide ou solidifié par de l'agar à raison de 6 g.l⁻¹ (agar Difco). Le milieu de culture utilisé est celui mis au point par HELLER (1953).

Tableau II : Composition de la solution nutritive de HELLER.

KCl	937,5	mg
Na NO ₃	750	mg
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	312,5	mg
Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	937,4	mg
Na H ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	176,2	mg
Mn SO ₄ , H ₂ O	0,75	mg
Cu SO ₄ , 5H ₂ O	0,30	mg
Al Cl ₃	0,30	mg
Ni Cl ₂ , 6H ₂ O	0,30	mg
KI	0,10	mg
Fe Cl ₃ , 6H ₂ O	10	mg
Zn SO ₄ , 7H ₂ O	10	mg
H ₃ BO ₃	10	mg
Eau	q.s.p.f.	1 000 ml

Les petits explants de 2 mm sont disposés dans des fioles de Fourneau, contenant 40 ml de milieu de culture, à raison de 10 par fiole. Lorsque de grands explants (10 ou 20 mm) sont utilisés, ils sont déposés un à un dans des tubes contenant 16 ml de milieu. Les ensemencements se font de sorte que la face radiculaire de l'explant soit en contact avec le milieu nutritif.

La culture s'effectue à 21-22° C et à la lumière continue (2 W.m^{-2}).

Dans certaines expériences de courte durée, les petits explantats sont déposés aseptiquement soit dans de l'eau stérile, soit dans une solution aqueuse de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ à 3 g.l^{-1} (18,3 mM). Cette solution a été retenue parce qu'elle est utilisée lors du forçage hydroponique des racines.

II - EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA NITRATE REDUCTASE

Le matériel végétal est congelé dans de l'azote liquide, puis broyé dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine qui est mise en suspension dans du tampon phosphate pH 7,5 à raison de 3 ml par g. de matière fraîche.

La composition du tampon ainsi que le protocole de purification a été modifié au cours de cette étude.

1) Protocole A (1976-1980).

Cette méthode a été largement décrite dans la thèse de POULLE (1979). En voici les grandes lignes:

La poudre obtenue est mise en contact avec du tampon $\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K} - \text{PO}_4\text{HK}_2$ 0,1 M pH 7,5 contenant 1,5 % de caséine qui stabilise la nitrate réductase de diverses espèces végétales (SCHRADER et al., 1974, SHERRARD et DALLING, 1978, ROBIN, 1979) dont le Silène (POULLE, 1979). Après une centrifugation à 19 000 g pendant 20 min., le surnageant est recueilli ; il constitue l'extrait enzymatique total (extrait brut). Il est alors procédé à un fractionnement grossier des macromolécules de cet extrait, par le sulfate d'ammonium. Lorsque le taux de celui ci passe de 20 à 50 % de sa saturation, la nitrate réductase précipite en même temps que la caséine et de nombreuses autres protéines.

Cette fraction protéique est dissoute dans du tampon phosphate 0,1 M, puis agitée pendant 20 min. avec 20 ml d'une suspension de Bleu Sephadex, préparé selon la méthode de BÖHME et al. (1972). Le tout est ensuite filtré et le gel recueilli.

est introduit dans une colonne de 20 cm de long et 2 cm de diamètre , puis lavé abondamment par du tampon jusqu'à ce que l'absorbance lue à 280 nm atteigne 0.

La nitrate réductase est alors éluée par du tampon, phosphate 0,1 M pH 7,5 contenant du KCl 1 M (NOTTON et al., 1979), puis précipitée par du sulfate d'ammonium (50 % de sa saturation). Après une centrifugation à 19 000 g à 4° C pendant 30 min., le culot protéique est dissout dans du tampon phosphate 1 mM pH 7,5. La solution est déposée au sommet d'une colonne contenant du gel d'hydroxyapatite et la nitrate réductase est éluée, lorsque la molarité en phosphate du tampon atteint 200 mM. La caséine est éliminée par l'addition de sulfate de protamine qui précipite la nitrate réductase de façon sélective (SOLOMONSON et al., 1975). La nitrate réductase purifiée est alors stockée à - 18° C. Elle servira à l'immunisation de lapins afin d'obtenir des anticorps polyclonaux spécifiques de la nitrate réductase.

2) Protocole B (1980-1985).

La méthode précédente a permis l'obtention de préparations purifiées de nitrate réductase du Silène et d'anticorps dirigés contre elle. Cette méthodologie présentait cependant un inconvénient majeur : la présence de caséine empêchait un calcul simple d'activité spécifique aux différentes étapes de la purification, et de plus, colmatait très souvent les colonnes de gels.

Or WRAY et KIRK (1981) ont montré que la leupeptine, composé de faible masse moléculaire (439,8), protège efficacement la nitrate réductase de l'Orge contre l'action de protéases de type trypsine. Par ailleurs, l'EDTA est très souvent incorporé dans les tampons d'extraction parce que ses propriétés de chélateur empêchent l'inactivation des enzymes par les métaux lourds d'une part et parce qu'il est un inhibiteur des métalloprotéases d'autre part.

Le FAD possède des propriétés de stabilisation de la nitrate réductase en maintenant sans doute l'intégrité structurale du groupement prosthétique (KUO et al., 1982). Enfin, nous avons constaté que la teneur en phosphates des tampons d'extraction et d'incubation peut être diminuée de moitié, sans que l'activité nitrate réductase n'en soit modifiée.

Aussi le tampon d'extraction actuel a-t-il la composition suivante :

$\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$	50 mM pH 7,5
EDTA	1 mM
Leupeptine	10 μM
FAD	10 μM

Un gramme de poudre végétale est mis en contact avec 3 ml de ce tampon. Après une centrifugation à 19 000 g le surnageant est recueilli et soumis à des précipitations de protéines par le sulfate d'ammonium selon la méthode décrite précédemment. La fraction contenant la nitrate réductase est déposée sur une colonne de Trisacryl GF05 (IBF) afin d'éliminer les sels de la solution. Les protéines sont alors séparées par échange d'ions dans une colonne contenant 10 ml de DEAE Trisacryl (IBF). L'élution des protéines s'effectue par un gradient de NaCl. La nitrate réductase est éluee par une teneur en NaCl de 0,1 M. Cette fraction est ensuite chromatographiée sur de l'hydroxylapatite puis soumise à une chromatographie d'affinité sur Bleu de Sephadex.

L'élution de la nitrate réductase s'effectue à l'aide d'un gradient de NADH.

III - MESURES DES ACTIVITES DE LA NITRATE REDUCTASE

Dans le chapitre "Historique", nous avons vu qu'à côté de son activité NAD(P)H : nitrate réductase globale, l'enzyme présente des activités partielles, rattachées à ce qu'il est convenu d'appeler la moitié initiale ou la moitié terminale de l'enzyme.

1) Activité NAD(P)H : nitrate réductase totale.

Cette activité peut être mesurée d'au moins trois façons dont aucune n'est vraiment satisfaisante en soi.

a - Dosage *in vitro*

A 1ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 contenant 1 mM d'EDTA, de la leupeptine et du FAD aux concentrations de 10 μ M, on ajoute 0,1 ml de KNO_3 0,1 M; 0,1 ml de NAD(P)H 1,3 mM et 0,1 ml de la préparation enzymatique. Le tube est mis à l'obscurité et à 27° C pendant 15 ou 20 min. Le nitrite formé est révélé par l'addition de 1 ml de sulfanilamide à 0,2 % dans une solution aqueuse d'HCl 3N et de 1 ml de chlorhydrate de N(1 naphthyl-éthylène) diamine en solution aqueuse à 0,3 %. La coloration rouge qui apparaît est mesurée à 540 nm. Il peut arriver qu'un excès de NADH affaiblisse la réaction de coloration (HEWITT et NICHOLAS 1964). Afin de pallier cet inconvénient, le NADH qui pourrait subsister dans le milieu est éliminé par l'addition, en fin d'incubation, de 0,1 ml d'acétaldéhyde 0,1 M et de 0,1 ml d'alcool deshydrogenase (2 mg.ml⁻¹). Cette réaction oxyde en quelques secondes le NADH en NAD qui ne modifie pas l'intensité de coloration du nitrite.

b - Dosage *in vivo*

Contrairement à la méthode précédente la mesure de l'activité nitrate réductase *in vivo* utilise du matériel vivant.

Une masse connue de matériel végétal est mise dans 2 ml d'un mélange composé de KNO_3 , de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5 et de propanol (50/30/1, V/V/V). L'incubation se fait à 27° C pendant 20 ou 30 min., à l'obscurité et en anaérobiose (FERRARI et VARNER, 1971 ; JAWORSKI, 1971) qui est obtenue par un barbotage d'azote gazeux pendant 45 sec.. Le tube est immédiatement bouché.

Cette méthode souvent considérée comme étant plus proche de la réalité biologique, a cependant été critiquée. D'abord elle se déroule en anaérobiose, ensuite elle suppose l'apport de nitrate; enfin elle utilise le propanol qui modifie la perméabilité des divers systèmes membranaires, si bien que la compartimentation intracellulaire du nitrate peut se trouver modifiée.

c - Dosage in situ

Afin d'éliminer les inconvénients de la méthode de mesure *in vivo*, l'évaluation de la réduction du nitrate se fait en évitant l'incubation dans un milieu liquide ainsi que l'apport de nitrate exogène (JONES et SHEARD, 1977 ; ROBIN et al., 1983). Elle n'évite cependant pas l'anaérobiose.

Les échantillons dont on veut mesurer l'activité nitrate réductase sont introduits dans un tube obturé d'un bouchon en caoutchouc traversé par deux aiguilles creuses qui permettent le passage d'un courant d'azote (0,15 bars) pendant 5 min. Le tube est ensuite placé à l'obscurité et à 27° C pendant 1 h. Puis 4 ml d'eau bouillante ajoutés, permettent l'extraction du nitrite qui est mesuré selon la méthode classique, précédemment décrite.

2) Mesure des activités partielles

a - Activité diaphorase

L'activité dite initiale de l'enzyme est évaluée en mesurant la quantité de cytochrome c réduit par le NADH.

Une solution A contenant du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5, du cytochrome c (15 mg/ml de tampon) et de l'eau dans les proportions 50/ 5/ 3,5 (V/V/V) est préparée.

Dans la cuvette d'un spectrophotomètre, on introduit 0,9 ml de ce mélange ainsi que 0,05 ml de NADH, 1,3 mM et 0,05 ml de la préparation enzymatique. Puis on suit l'accroissement

de l'absorbance à 550 nm.

On peut alors calculer la quantité de cytochrome c réduit sachant que son coefficient d'extinction molaire est $E = 28$.

b - Activité terminale

L'activité de réduction du nitrate par un donneur d'électrons autre que le NADH, peut être suivie en utilisant soit du FMNH₂, soit du méthyl viologène réduit (WRAY et FILNER, 1970).

Dans un tube à essais sont introduits :

- 1 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,5
- 0,1 ml de KNO₃ 0,1 M
- 0,3 ml de FMN (1 mg ml⁻¹ : 2,17 mM)

ou

- 0,1 ml de méthyl viologène (12,8 mg/100 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,5)
- 0,05 ml de dithionite de sodium (10 mg/ml de solution de bicarbonate de Na 0,1 M).

Le contenu du tube est mélangé doucement ; il prend une couleur jaune pâle s'il contient du FMN et bleue s'il contient du méthyl viologène.

On ajoute alors 0,1 ml de la préparation enzymatique et l'incubation s'effectue à 27° C à l'obscurité pendant 20 min. Puis le tube est agité vigoureusement afin d'oxyder l'excès de donneur réduit. La quantité de nitrite formé est alors mesurée selon la méthode habituelle.

IV - MESURE DES ACTIVITES GLUTAMATE DESHYDROGENASE (GDH) ET GLUTAMINE SYNTHETASE (G.S.)

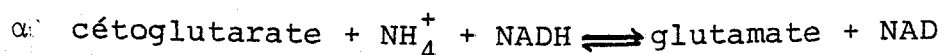
Afin de préciser quelques aspects du métabolisme azoté des cellules de Silène, nous avons été amenés à mesurer des activités de la glutamate deshydrogénase (L-glutamate-NADH-oxido réductase E.C.1.4.1.2.) et de la glutamine synthétase (L. glutama-

te ammonium ligase (ADP) E.C.6.3.1.2.). Ces mesures ont été effectuées sur des extraits totaux.

Les cellules congelées par de l'azote liquide sont mises en suspension dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH8, à raison de 10 ml de tampon par gramme de matériel frais. Puis elles sont broyées à 4° C pendant 1 min. à l'aide d'un Ultraturax. Après des intervalles de 2 min., destinés à éviter l'échauffement du liquide dans le tube, on procède à un 2ème puis à un 3ème broyage de 30 sec.. Après centrifugation à 20 000 g. à 4° C pendant 20 min., le surnageant est recueilli ; il constitue l'extrait enzymatique.

1) Mesure de l'activité GDH.

Cette enzyme catalyse la réaction :



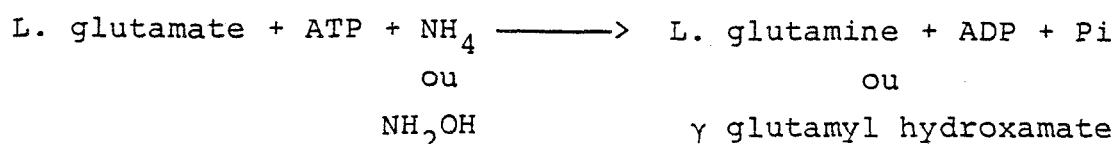
A 2 ml d'un tampon Tris- HCl 50 mM, pH8, contenant de l' α cétooglutarate 20 mM, du $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 150 mM et du NADH 0,37 mM, on ajoute 1 ml d'extrait enzymatique. L'oxydation du NADH est suivie à 340 nm pendant 2 min.

L'activité de la GDH est exprimée en μ moles de NAD formé par min. et par g. de matière fraîche.

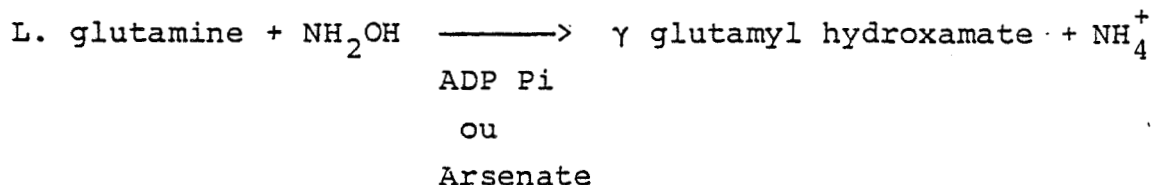
2) Mesure de l'activité G S.

Chez les végétaux supérieurs la GS peut catalyser 2 réactions (WEBSTER, 1964).

a - Une réaction de biosynthèse



b. - Une réaction transférasique



C'est la première réaction qui est mesurée ici. A 2ml de tampon Tris HCl 50 mM pH 7,6 contenant du glutamate 120 mM, du Mg SO₄ 30 μM, de l'E.D.T.A. 1,5 mM, de l'ATP 12 mM et de l'hydroxylamine (NH₂OH) 9 mM, on ajoute 1 ml d'extrait enzymatique. L'incubation s'effectue à 30° C pendant 15 min. puis la réaction est arrêtée par l'addition de 3 ml d'une solution aqueuse de Fe Cl₃ 370 mM contenant de l'acide trichloracétique 200 mM et de l'HCl 0,67 N. L'hydroxamate se colore en brun ; il est dosé à 540 nm. L'activité GS est exprimée en μmoles d'hydroxamate formé par min. et par g. de matière fraîche.

V - ANALYSES ELECTROPHORETIQUES EN GELS DE POLYACRYLAMIDE

La séparation des protéines est réalisée sur un support de polyacrylamide qui peut consister en un gel unique ou en deux gels superposés qui diffèrent par leur pH et leur composition.

a - Préparation des gels

Le support est coulé entre deux plaques de verre maintenues verticales (système Bio-Rad). Les alvéoles dans lesquelles seront déposées les solutions à analyser sont confectionnées à l'aide d'un peigne introduit dans la partie supérieure du gel non polymérisé.

Dans une fiole à vide sont introduits :

- 1 volume de tampon Tris-HCl pH 8,9 (366 g de Tris.l⁻¹ d'eau distillée)
- 2 volumes d'une solution aqueuse d'acrylamide à 28 % et de bisacrylamide à 0,73 % (p/V)
- 5 volumes d'eau distillée.

Après dégazage du mélange, on ajoute 0,070 ml d'une solution de persulfate d'ammonium (165 mg.ml^{-1} d'eau) et 0,050 ml de TEMED qui catalysent la réaction de polymérisation.

Ce gel dit gel de séparation contient 7 % d'acrylamide. Lorsqu'il est utilisé seul, la valeur de 1 volume est de 5 ml. Si un second gel, dit de concentration lui est superposé 1 volume est égal à 4 ml.

Le gel de concentration a la composition suivante :

- 2 ml de tampon Tris-HCl pH 6,7 ($59,9 \text{ g de Tris.l}^{-1}$ d'eau)
- 4 ml d'une solution aqueuse d'acrylamide à 10 % et de bisacrylamide à 2,5 % (p/V)
- 4 ml d'une solution aqueuse de saccharose à 20 %.

Après dégazage sont ajoutés 0,025 ml de persulfate d'ammonium et 0,015 ml de TEMED.

Ce gel contient donc environ 5 % d'acrylamide.

Lorsque les gels sont polymérisés, le peigne est ôté et les alvéoles sont remplies par du tampon à électrophorèse pH 8,3 qui contient ;

Tris	1,2 g
glycine	5,76 g
Eau distillée	q.s.p.f. 2000 ml.

A 0,10 ml de chaque échantillon sont ajoutés 0,02 ml d'une solution de bleu de bromophénol (10 mg de bleu par ml de solution aqueuse de saccharose à 20 %). Les échantillons (0,050 ml) sont déposés à l'aide d'une seringue Hamilton.

La migration se fait sous un voltage de 200 V pendant environ 4 h (temps nécessaire au bleu pour parcourir le gel).

b) Révélation des protéines

Les protéines sont fixées et colorées pendant 30 min. environ dans une solution qui contient :

- Bleu de Coomassie R	40 mg
- Acide perchlorique	15 ml
- eau	100 ml

Puis la décoloration des gels est effectuée dans une solution aqueuse d'acide acétique à 7 % jusqu'à ce que les bandes protéiques apparaissent bleues sur un fond incolore.

c) Mise en évidence des activités enzymatiques dans le gel

α) activité G.D.H.

Après électrophorèse, le gel est mis à incuber à l'obscurité, à 27° C pendant 20 à 30 min. dans 15 ml d'une solution de Tris-HCl 50 mM contenant de l'acide glutamique (84 mg) du NAD (4,5 mg) du nitrobleu de tetrazolium (N.B.T. : 10 mg) et du phényl méthosulfate (PMS : 2 mg). Au lieu de la migration de la G.D.H. apparaît une bande bleue sur fond clair.

β) Activité G.S.

Le gel est mis à incuber pendant 30 min. à 27° C et à l'obscurité dans 15 ml de la solution suivante :

Tris HCl 50 mM pH 7,6	15 ml
NH ₂ OH	50 mg
Mg SO ₄	75 mg
Glutamate de K	350 mg
EDTA	7,5 mg
ATP	150 mg

Après un rinçage rapide par de l'eau distillée, il est transféré dans une solution contenant du Fe Cl₃ 0,18 M, de l'acide trichloracétique 0,2 M et de l'HCl 0,35 N. A l'endroit où a migré la GS, apparaît une bande orangée très fugace.

ψ) Activité nitrate réductase

La méthode la plus couramment utilisée repose sur la réaction de réduction du nitrate par le méthyl viologène réduit.

Après électrophorèse, le gel est introduit dans 15 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,5 contenant de l'EDTA 1 mM et du FAD 10 μ M, pendant 10 min..

Puis cette solution est renouvelée ; on lui ajoute alors 2 ml d'une solution de méthylviologène (2,5 mg ml⁻¹ de tampon). Après quelques minutes sont ajoutés 5 ml de dithionite (8 mg ml⁻¹) en solution dans du Na HCO₃ 0,1 M. Lorsque le gel est coloré en bleu, on introduit 2 ml d'une solution de KNO₃ 0,1 M. A l'endroit où a migré la nitrate réductase, apparaît une bande blanche.

VI - ANALYSES IMMUNOLOGIQUES

- 1) Obtention d'anticorps polyclonaux dirigés contre la nitrate réductase du Silène.

Une série de trois injections sous cutanées sont effectuées à une semaine d'intervalle chez des lapins (variété Géant des Flandres). Chaque fraction contient environ 0,050 mg de protéine enzymatique, émulsifiée par l'adjuvant complet de Freund. Une 4ème piqûre de rappel est faite 1 mois après la 3ème injection. Après 10 jours le lapin est saigné. Le sérum recueilli est utilisé sans purification ultérieure.

- 2) Anticorps monoclonaux dirigés contre les nitrate réductases d'Epinard et de Silène

L'immunisation de 3 souris Balb/c, menée selon la méthode décrite par CIANFRIGLIA et al. (1983) est faite à l'aide d'une fraction protéique du Silène, éluée d'une colonne de DEAE Cellulose par du tampon contenant du NaCl 0,1 M. Elle est achevée après 6 injections dont les cinq premières sont intrapéritonéales et la 6ème intraveineuse. La première fraction injectée contient 25 μ g de protéine dans 0,25 ml d'un tampon phosphate 20 mM pH 7,5 auquel on ajoute un volume égal d'adjuvant complet de Freund. Les 3 injections suivantes renferment chacune la même quantité

de protéines et sont effectuées à des intervalles de 4 jours. Quant à la dernière piqûre intrapéritonéale, elle contient 75 µg de protéines, elle est suivie d'une intraveineuse qui en contient 50 µg.

Après le sacrifice des souris, les rates sont perfusées par 5 ml de milieu de EAGLE modifié par DULBECCO et FREEMAN (1959) et les cellules spléniques sont fusionnées en présence de polyéthylène glycol (PM : 4000 SERVA) avec des cellules d'un myélome non sécréteur H.G.P.R.T. de Balb/c (clone P₃ X 6₃ AG8 653 ; GALFRE et MILSTEIN, 1981).

Les cellules sont ensuite cultivées sur un milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine (KOHLER et MILSTEIN, 1975), du serum humain et du serum de foetus de veau à 20 %, du surnageant de culture de myélome 20 %, ainsi que des macrophages ($2 \cdot 10^4$ par ml de milieu) (LOVBORG, 1983).

Les clones positifs sont récupérés. Chaque clone est dissocié et les cellules, après toute une série de dilutions, sont cultivées en présence de macrophages, selon le protocole mis au point par GALFRE et MILSTEIN (1981).

Les clones sécrétant de l'antinitrate réductase sont repérés par la méthode ELISA. Ils sont d'abord cultivés dans des plaques comportant 24 puits qui contiennent 0,5 ml de milieu puis dans des flacons contenant 2 ml de milieu. Lorsque les cellules se sont multipliées, on augmente peu à peu le volume du milieu de culture (jusqu'à 5 ml). Lorsque la souche s'est développée, elle est multipliée en plusieurs exemplaires : les uns sont utilisés pour la fabrication d'ascites, les autres sont congelés et conservés dans de l'azote liquide.

L'une des méthodes les plus couramment utilisées pour obtenir des anticorps monoclonaux en quantité relativement importante et surtout en concentrations élevées, passe par l'obtention de tumeurs liquides (ascites).

Des souris Balb/c reçoivent deux injections de 0,5 ml de pristane (2, 6, 10, 14, tetramethyl pentadecane) ; la première 13 jours, la seconde 4 jours avant d'être inoculées par la souche. Le jour où les cellules sécrétrices sont injectées (6 à $7 \cdot 10^6$ cellules), les souris reçoivent une irradiation de 400 rads (Irradiateur CIS à Cesium) (BRODEUR et LAROSEY 1984). Après 12 à 15 jours, l'ascite s'est développée ; les souris sont sacrifiées et le liquide contenant les anticorps monoclonaux est ponctionné.

3) Réactions immunochimiques

Les anticorps sont alors essayés contre des fractions purifiées de nitrate réductase d'Epinard ou de Silène, ou contre des extraits totaux.

a) Immunodiffusion selon OUCHTERLONY (1949)

1,2 g d'agarose (IBF) sont dissous dans 100 ml de tampon veronal HCl 15 mM pH 8,6, bouillant. La solution est coulée sur des plaques de verre de 7,5 x 2,5 cm. Lorsque l'agar est solidifié on creuse, à l'aide d'un emporte pièce de 2 mm, un puits central et 6 puits périphériques qui peuvent contenir 0,008 ml de solution chacun. L'antiserum est généralement déposé au centre et les différentes solutions d'antigène à la périphérie. Les plaques sont ensuite maintenues pendant 24 h dans une chambre humide, puis lavées pendant plusieurs heures par une solution de NaCl à 9 %. L'agar est ensuite amené à siccité totale et les protéines sont colorées par une solution de bleu de Coomassie.

b) Immunoélectrophorèse analytique ; selon GRABAR et WILLIAMS (1953)

Un puits est creusé dans de l'agarose coulé sur une plaque comme il vient d'être décrit précédemment. Environ 0,010 ml d'une solution d'antigène y sont déposés. On procède à une électrophorèse à 4° C. sous un voltage de 6 V par cm (soit environ 36 V, pendant 90 à 120 min). Puis une gouttière est creusée et emplie d'immun-sérum, qui diffuse pendant 24 h. Les plaques sont maintenues dans une chambre humide, puis lavées par du NaCl à 9 %, puis séchées. Les protéines sont révélées par le bleu de Coomassie.

c) Immunoabsorption de l'activité enzymatique

Des tubes Eppendorf reçoivent 0,1 ml de la préparation enzymatique puis des quantités croissantes d'immun-sérum de façon à avoir un volume final de 0,3 ml par tube. Après un séjour de 2 h à 4° C, les tubes sont centrifugés pendant 10 min. à 10.000 rpm dans une microcentrifugeuse.

100 µl de surnageant sont prélevés et utilisés pour la mesure d'activité nitrate réductase *in vitro* décrite précédemment.

Des expériences de compétition entre formes actives et inactives de l'enzyme pour les anticorps sont menées selon le protocole suivant : à 0,100 ml d'enzyme actif sont ajoutés 0,050 ml d'extrait inactif puis 0,100 ml d'antisérum à des concentrations croissantes. Le volume final est amené à 0,3 ml à l'aide de Na Cl à 9 %.. Les tubes sont maintenus à 4° C pendant 2 h puis centrifugés à 10 000 rpm pendant 10 min dans une microcentrifugeuse Eppendorf. Un volume de 0,100 ml de surnageant est prélevé afin de mesurer l'activité nitrate réductase.

d) Test ELISA (Enzyme linked immuno-sorption assay)

Les antigènes dissous dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,5 sont répartis dans les cupules en polystyrène de plaques Nunc-immuno, à raison de 0,100 ml par cupule. Chaque dépôt contient de 5 à 10 microgrammes de protéine purifiée. On laisse s'effectuer l'adsorption des antigènes sur les parois de la cupule pendant une nuit à 4° C. Les protéines non adsorbées sont éliminées par 3 lavages successifs avec du tampon phosphate, NaCl pH 7,2 auquel a été ajouté du Tween 20 (Tampon PBS-tween) selon les proportions suivantes :

Na ₂ H PO ₄ , 2H ₂ O	9,25 g
KH ₂ PO ₄	3,06 g
NaCl	4,50 g
Tween 20	0,5 ml
Eau	q.s.p.f. 1000 ml

Puis on ajoute, dans chaque cupule 0,100 ml de la solution d'anticorps à tester. La plaque est mise à 37° C pendant 1 heure. L'excès d'anticorps est ensuite éliminé par trois lavages par le tampon PBS-tween. Sont ensuite introduits 0,100 ml d'une solution à 10 % de sérum de mouton, contenant en outre des anticorps anti-souris marqués à la peroxydase (dilution 10^{-3}). La plaque est entreposée à 37° C pendant 1 heure. Les anticorps non fixés sont éliminés par 3 lavages avec du tampon PBS-tween. On procède enfin à la mise en évidence de l'activité peroxydasique. Dans chaque cupule sont ajoutés 0,100 ml d'une solution contenant de l'orthophénylène diamine (10 mg dissous dans 1 ml de méthanol absolu puis remis dans 99 ml d'eau) et de l'eau oxygénée (0,030 ml d'une solution à 30 %).

Les plaques sont entreposées à l'obscurité pendant environ 20 min.. On ajoute enfin 0,025 ml de H_2SO_4 8N dans chaque cupule. La présence d'une activité peroxydasique est révélée par l'apparition d'une coloration jaune-brun.

VII - DOSAGE DU NITRATE DANS LE MILIEU DE CULTURE ET DANS LE MATERIEL VEGETAL.

Le nitrate du milieu est dosé directement dans du milieu dilué au 50ème ou au 100 ème à l'aide d'une électrode sélective CORNING ou par la méthode de YOUNG (1973) qui consiste en une réduction quantitative du nitrate en nitrite par de la poudre de zinc métallique.

Les tissus végétaux sont lyophilisés. 200 à 300 mg de matériel sont broyés, mis en suspension dans 6 ml d'eau distillée bouillante pendant 15 min. On prélève 3 ml de la solution obtenue et on ajoute 6 ml de NH_4OH 2,2 N et 90 mg de poudre de zinc. Après une agitation vigoureuse d'environ 3 min., le zinc est décauté et 3 prélèvements de 2 ml sont effectués afin de doser le nitrite formé, selon la méthode classique de dosage du NO_2^- à 540 nm.

VIII - DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines végétales sont dosées selon la méthode de LOWRY et al. (1951) dans les extraits totaux ou par la méthode de SCOPES' (1973) lorsqu'il s'agit de protéines partiellement ou totalement purifiées.

a) Méthode de LOWRY

L'extraction est réalisée sur 100 mg d'échantillon préalablement lyophilisé puis broyé. Si le matériel est chlorophyllien, la poudre est agitée dans 20 ml d'acétone à 80 % pendant 10 min., puis centrifugée à 10.000 g pendant 10 autres minutes. Le culot est alors repris dans 10 ml d'acide trichloracétique à 10 % et abandonné à 4° C pendant une nuit. Après centrifugation le culot (fraction acido précipitable) est remis en suspension dans 10 ml d'éthanol à 80 %, saturé en acétate de sodium, pendant 10 min. Après une nouvelle centrifugation, il est remis en suspension dans de l'éthanol absolu puis centrifugé de nouveau.

Le culot obtenu est séché et mis en présence de 5 ml de NaOH 0,1 N pendant 30 min. à 80° C. Après centrifugation, le surnageant est recueilli ; il contient les protéines qui sont ensuite dosées à 750 nm en présence de réactif de Folin.

La teneur en protéines est déduite d'une courbe étalon fabriquée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine à 0,050 mg. ml⁻¹.

b) Méthode de SCOPES

Elle a pour base l'absorption à 205 nm de la liaison peptidique des protéines. Comme les résidus tyrosine et tryptophane peuvent interférer légèrement sur l'absorption, un coefficient d'absorption spécifique (ϵ_{205}) a été établi qui tient compte de cette interférence

$$\epsilon_{205} = 27 + 120 \cdot \frac{(\text{do } 280)}{(\text{do } 205)} = 31$$

Il s'ensuit que la concentration en protéines est donnée par la formule

$$C \text{ (mg/ml)} = \frac{d_o \text{ 205}}{\epsilon \text{ 205}} = \frac{d_o \text{ 205}}{31}$$

Les protéines sont dissoutes dans une solution de $K_2 SO_4$ 0,1 M et de $KH_2 PO_4$ 0,005 M, ajustée à pH 7 à l'aide de KOH, de préférence dans des flacons en polyéthylène qui adsorbent moins que le verre. Afin d'éviter les phénomènes de diffusion de la lumière, il est recommandé de ne pas dépasser des absorptions de 0,7 unités de d.o.

IX - ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

L'étude des ARN et des ARN polyadénylés (ARN poly A⁺) en particulier, nécessite l'emploi d'adénosine marquée au ¹⁴C.

1) Incorporation d'adénosine ¹⁴C.

Les cellules prélevées à différents stades de croissance, sont filtrées sur un entonnoir de Büchner garni de deux couches de papier filtre, puis remises en suspension dans du milieu neuf contenant de l'adénosine ¹⁴C (A.S. 46,5 µCi/mM) à raison de 10 µCi ml⁻¹. Dix grammes de cellules sont introduits dans 5 ml de milieu. Toutes ces opérations sont menées en conditions aseptiques. Le temps de marquage est de 1 ou 2 h, puis les cellules sont récoltées, lavées par du milieu neuf froid et congelées dans l'azote liquide.

2) Extraction des ARN

Elle s'effectue en deux étapes selon les méthodes de KIRBY (1965) et de SCHERRER et DARNELL (1962) qui ont été utilisées conjointement. Les cellules congelées sont broyées dans un mortier jusqu'à obtention d'une poudre fine qui est mise en suspension dans un mélange composé de tampon A (Tris - HCl 20 mM pH 7,2 contenant du NaCl 10 mM, de l'acétate de Mg 3 mM et du macaloïde 0,2 %) et de solution B (phénol distillé 100 g ; 0,1 g de 8 hydroxyquinoléine ; 14 g de métacrésol ; 0,5 % de SDS ; 25 ml de tampon A).

Par gramme de matière fraîche, on ajoute 1 ml de tampon A et 1 ml de solution B. La suspension est maintenue à 4° C et homogénéisée pendant trois fois 15 sec. à l'aide d'un Ultra-Turrax, utilisé à demi-vitesse. Une aliquote de la solution est prélevée et observée en microscopie photonique afin de vérifier que les cellules ont bien éclaté.

Après centrifugation à 2000 g pendant 20 min. la phase phénolique est éliminée ; le culot et l'interphase sont remis en agitation en présence d'un égal volume de solution B pendant 15 min. Après une nouvelle centrifugation, on procède à l'élimination de la phase phénolique. Cette opération est renouvelée une troisième fois. La phase aqueuse est alors récupérée : elle contient les acides nucléiques "extraits a froid". L'interphase résiduelle et le culot sont alors lavés deux fois par du tampon C constitué d'acétate de sodium 10 mM pH 5,4, contenant de l'acétate de Mg 0,1 mM et du polyvinyl sulfate de potassium (0,05 mg. ml⁻¹). Les liquides de lavage sont ajoutés à l'extrait précédent.

Le culot est ensuite mélangé dans de la solution B et du tampon C (1 ml de chaque par g. de matière fraîche utilisée au départ). Le tout est agité continuellement à 55° C pendant 3 min. puis refroidi brutalement à - 35° C, dans un mélange de glace pilée et de méthanol. La phase phénolique est éliminée après centrifugation et on ajoute à la phase aqueuse un volume égal de chloroforme contenant 1 % d'alcool isoamylique. Cette solution est de nouveau agitée à 55° C pendant 3 min., refroidie à - 35° C puis centrifugée. La phase aqueuse recueillie renferme les acides nucléiques "extraits à chaud". "L'extrait froid" contient les ARN cytoplasmiques alors que l'extraction à 55° C permet l'éclatement des noyaux et la récupération d'une fraction enrichie en ARN nucléaires (MIASSOD, 1974).

3) Purification des ARN

Chaque fraction est traitée séparément. Les ARN sont précipités par de l'éthanol absolu contenant de l'acétate de Na 0,15 M (2 volumes d'éthanol par volume d'extrait) à - 20° C pendant une nuit. Après centrifugation à 3 000 g pendant 20 min.

les culots sont lavés plusieurs fois par de l'éthanol à 70 % afin d'éliminer le phénol qui pourrait subsister.

Les acides nucléiques sont ensuite soumis à une série de dissolutions à 4° C dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,6 contenant 10 mM d'EDTA, suivies de précipitation par de l'éthanol absolu. Ces opérations sont effectuées jusqu'à ce que la radioactivité d'une fraction aliquote, précipitée à 0° C par de l'acide trichloracétique à 10 %, soit constante. A la solution d'acide nucléique dans du Tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,2 contenant du NaCl 10 mM, et de l'acétate de Mg 5 mM, est ajoutée de la desoxyribonucléase I (DNase Boehringer 15 469). L'ADN est hydrolysé à 4° C pendant 30 à 45 min. : 5 µg de DNase sont utilisés pour 0,100 mg d'acides nucléiques totaux.

L'enzyme est alors éliminée en ajoutant au milieu d'incubation un volume égal de phénol et de chloroforme (1/1, V/V). Les ARN contenus dans la phase aqueuse sont précipités par de l'éthanol absolu froid puis fractionnés par chromatographie d'affinité sur une microcolonne de Sepharose 4B, poly U (Pharmacia) ou analysés en gradient de densité.

4) Chromatographie d'affinité

Le Sépharose (300 mg) est mis à gonfler pendant quelques heures dans du tampon Tris HCl 10 mM pH 7,6 contenant du NaCl 1 M, puis il est transvasé dans une colonne à double enveloppe de 5 mm de diamètre et lavé par environ 30 ml de tampon NETS, composé de Tris HCl 10 mM pH 7,6 contenant du NaCl 0,1 M, de l'EDTA 0,01 M et du SDS à 0,2 %.

Les ARN dissous dans 1 ml de ce tampon sont déposés au sommet de la colonne maintenue à 22° C. L'effluent contient les ARN ne possédant pas de séquence polyadénylée (ARN poly A⁻). La colonne est ensuite lavée par du tampon NETS jusqu'à ce que la d.o lue à 260 nm soit nulle. Généralement 20 ml suffisent.

L'éluion des ARN poly A⁺ est réalisée en amenant la température de la colonne à 50° C et en modifiant la force ionique du tampon (ESNAULT et al., 1975). Les ARN polyadénylés sont en effet récupérés dans 20 ml de tampon ETS (tampon NETS sans NaCl).

5) Isolement et analyse des séquences polyadénylées.

Les ARN retenus et non retenus par le sépharose poly (U) sont traités séparément ; dissous dans du tampon Tris HCl 0,05 M pH 7,5 contenant du NaCl 0,3 M, ils sont soumis à une hydrolyse à 37° C pendant 40 min. par les ribonucléases A et T₁. Les séquences polyadénylées résistent à l'action de ces enzymes (LEE et al., 1971 ; MENDECKI et al., 1972) puisque la RNase A s'attaque spécifiquement aux liaisons phosphodiester proches des bases pyridiniques et que la RNase T₁ agit sur les liaisons proches de la guanosine. Pour 0,100 mg d'ARN on utilise 0,040 mg de A et 20 unités de T₁. Le mélange d'incubation est ensuite déprotéinisé en ajoutant un volume égal de phénol-chloroforme (1/1, V/V). La phase aqueuse est prélevée et les molécules non dégradées sont précipitées par de l'éthanol absolu à -20° C ou par de l'acide trichloracétique froid à 10 %.

La radioactivité de la fraction acidoprécipitable est déterminée en présence de 10 ml de liquide de scintillation (Instagel).

La fraction précipitée par de l'éthanol est ensuite soumise à une hydrolyse alcaline à 37° C pendant 18 heures par de la potasse 0,3 N. Après neutralisation de l'acide acétique 1N des fractions aliquotes sont chromatographiées sur du papier Whatman n° 1 pendant 15 h par un mélange d'acide isobutyrique-ammoniaque 0,5 N (10/6, V/V) qui permet d'isoler l'adénosine monophosphate (AMP) ou pendant 24 h par du n butanol-ammoniaque 0,1 N (6/1, V/V) qui isole l'adénosine.

Les chromatogrammes sont séchés, puis découpés en fragments de 1 cm et introduits dans des fioles à scintillation, contenant 10 ml de Lipoluma. Après 12 h de contact, le comptage de la radioactivité se fait dans un compteur à scintillation liquide

Intertechnique ABAC SL 40.

6) Analyse des ARN en gradient linéaire de densité.

Un gradient linéaire de 5 ml de saccharose de 5 à 20 % est confectionné dans du tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5 contenant de l'EDTA 10 mM, du NaCl 50 mM et du SDS 0,2 % (BUCKINGHAM et al., 1976).

L'ARN à analyser (1 unité de d.o. 260 nm dans 0,150 ml) est déposé au sommet du gradient puis centrifugé à 20° C à 180.000 g (rotor SW65 L Beckmann 50.000 rpm) dans une centrifugeuse Spinco LZ 65 B (Beckmann). Puis des fractions de 0,150 ml sont collectées et analysées dans le système ISCO UA5.

De chaque fraction, on prélève 0,030 ml qui sont mélangés à 5 ml d'Instagel afin de mesurer leur radioactivité.

R E S U L T A T S

*Evolution des ARN au cours de la
croissance des cellules de Silène.*

I - ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DES CELLULES DU SILÈNE.

Le cycle de croissance de la suspension cellulaire de Silène est de 14 jours. Le transfert de cellules prélevées au début de la phase stationnaire dans du milieu neuf se traduit par une reprise immédiate de la croissance sans phase de latence. Le temps de doublement est alors de 55 h. (DUBOIS, RAMBOUR et VASSEUR, 1976).

La teneur en ARN de l'ensemble des cellules augmente continuellement pendant les 6 ou 7 premiers jours de la culture puis atteint un palier, suivant fidèlement la courbe de croissance cellulaire (figure 1). La teneur en ARN d'une cellule

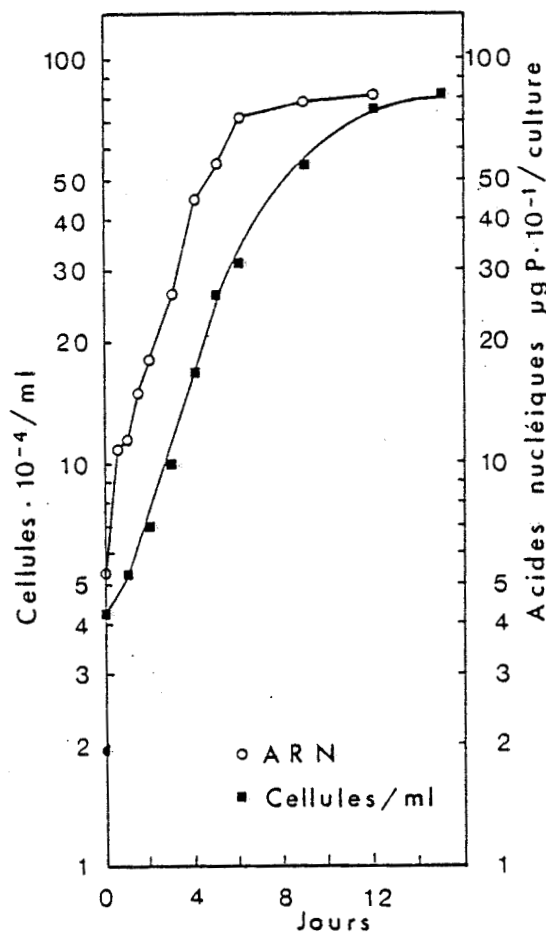


Figure 1 : Croissance et teneur en ARN d'une suspension cellulaire du Silène cultivées pendant 14 j.

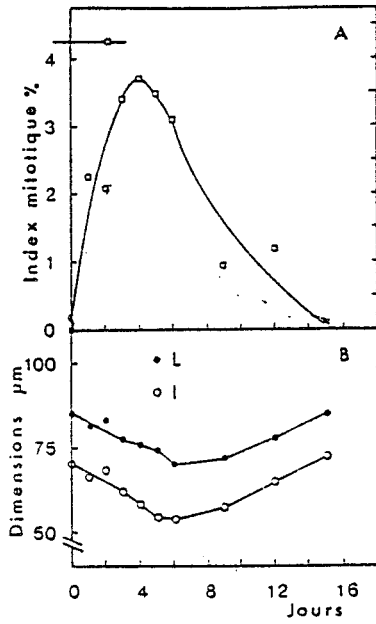


Figure 3 : A : Variations journalières de l'index mitotique, (IM)*

B : Taille cellulaire au cours de la croissance.

L et I représentant respectivement la plus grande et la plus petite dimension des cellules.

$$* \frac{IM(J+1) - IM(J)}{IM(J)} \times 100$$

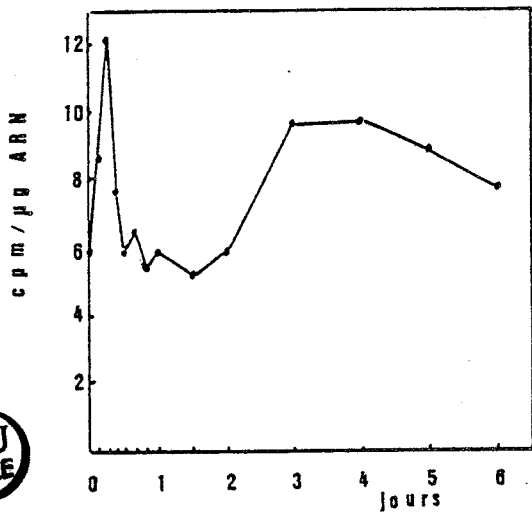
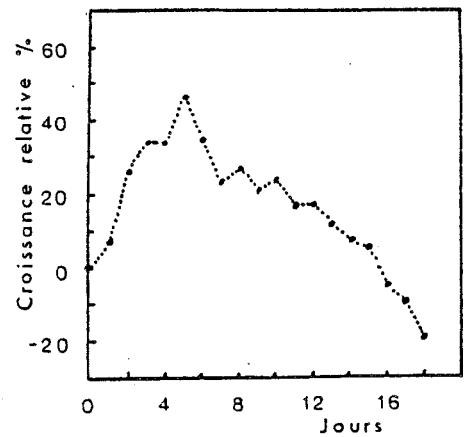


Figure 4 (a) : Evolution de l'activité spécifique au cours des 6 premiers jours de culture.



(b) : Variations quotidiennes du taux de croissance.

Ce calcul est fait de la façon suivante :

$$\frac{ME(J+1) - ME(J)}{ME(J)} \times 100$$

ME = masse de matière fraîche

ou ce qui revient au même, d'un nombre fini de cellules (10^6); tend vers un maximum au 4e jour de la culture puis décroît régulièrement à la phase stationnaire (figure 2). Cette valeur

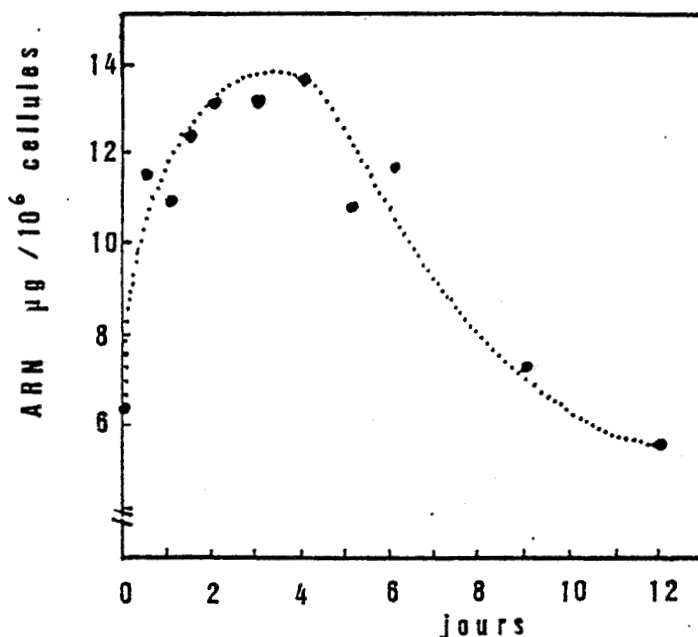


Figure. 2 : Evolution de la teneur en ARN au cours de la culture.

(Les résultats sont exprimés en µg de phosphore pour 10^5 cellules).

maximale correspond au moment où les cellules sont petites, riches en cytoplasme, et où les vacuoles sont peu développées ; l'index mitotique est le plus élevé et certaines divisions cellulaires semblent synchronisées (figure 3). L'introduction de phosphore radioactif ^{32}P dans le milieu de culture, 30 minutes avant chaque prélèvement, permet de suivre l'incorporation du radio-élément dans les acides nucléiques et dans les ARN en particulier. L'évolution de l'activité spécifique rend compte des synthèses des acides ribonucléiques dans les cellules tout au long de la culture. Ces biosynthèses sont particulièrement importantes dans les premières heures (6ème h.) qui suivent le transfert des cellules dans du milieu neuf, puis au 3ème et 4ème jour, peu avant que le taux de croissance cellulaire n'atteigne son maximum (figure 4 a et b).

TABLEAU 1

Activités spécifiques des ARN extraits à 4° C (extrait 1) et à 55° C (extrait 2) après 6 h. et 3 j. de culture.

Durée de la culture	extrait 1			extrait 2		
	cpm	A 260	AS	cpm	A 260	AS
6 h.	473 251	10,4	45 504	72 760	0,54	134 243
3 j.	467 750	8,33	56 152	45 018	0,45	94 940
extraits 1 + 2						
6 h.	cpm		A 260	A S		
	546 011		10,94	49 900		
3 j.	512 768		8,8	58 348		

Les valeurs de la radioactivité (cpm) et de l'absorbance à 260 nm (A 260) sont rapportées à 1 g de cellules. L'activité spécifique (AS) est le rapport de la radioactivité à l'absorbance. Les cellules sont cultivées sur un milieu neuf pendant 4 h. ou 70 h., puis l'adénosine est introduite aseptiquement. La durée de marquage est de 2 h.

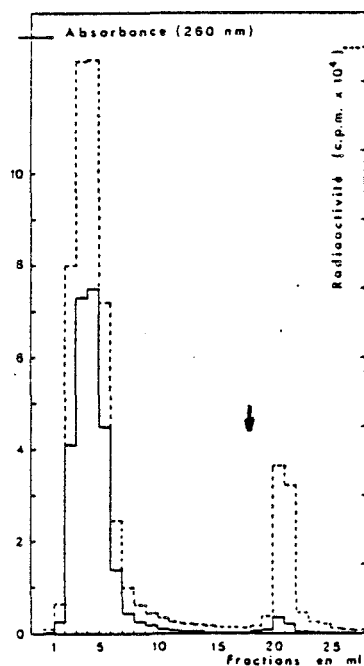


Figure 5 : Fractionnement des ARN par chromatographie d'affinité sur colonne de Sépharose poly (U).

1 ml de la solution d'ARN (320 µg) est déposé au sommet de la colonne maintenue à 20° C et contenant 300 mg de Sépharose 4B poly (U) (Pharmacia). La colonne est lavée par 18 ml de tampon NETS ("filtrat"). La température de la colonne est amenée à 50° C et l'élution de la fraction retenue (↓) se fait par 10 ml de tampon ETS.

A l'époque où cette étude a été menée, l'intérêt d'une analyse plus détaillée de la nature des ARN synthétisés à ces deux stades de la culture était d'autant plus grande que l'existence d'ARN polyadénylés venait d'être montrée dans les cellules de végétaux supérieurs (VAN DE WALLE et al., 1973 ; DELSENY et al., 1974 ; ESNAULT et al., 1975 ; CELLA et al., 1976). L'adénosine ^{14}C constituait donc un précurseur radioactif privilégié dans l'étude des synthèses d'ARN. Nous avons alors utilisé une méthode d'extraction thermique séquentielle qui permet l'obtention de deux populations moléculaires, localisées dans des compartiments cellulaires distincts.

Les résultats reportés dans le tableau 1 montrent que la teneur globale des ARN extraits "à froid" et à "chaud" n'est pas très différente pour des cellules de 6 h. ou de 3 j. Par gramme de matériel frais on n'observe qu'une différence de 2 unités de densité optique mesurée à 260 nm, ce qui correspond à environ 0,08 mg d'ARN soluble de levure. L'incorporation de l'adénosine est cependant légèrement plus importante dans les cellules de 3 jours, ce qui laisse supposer que la synthèse des ARN considérés globalement est un peu plus active. Les valeurs des activités spécifiques sont cependant très proches. Pourtant à chacun des stades de la culture, la mesure des activités spécifiques des ARN extraits à 4° C ou à 55° C révèle des différences nettes (tableau 1). L'incorporation est toujours plus importante dans la population moléculaire extraite "à chaud" que dans celle extraite "à froid" ; enfin elle est plus élevée à 6 h. qu'à 3 j., alors que pour les ARN extraits à 4° C c'est l'inverse qui est observé.

L'adénosine est-elle incorporée dans tous les types d'ARN ou l'est-elle préférentiellement dans les ARN poly A⁺ qui représentent une part importante des ARN messagers (DARNELL et al., 1971) ? La chromatographie sur Sépharose poly (U) des ARN totaux qui permet de séparer cette fraction messagère

(figure 5) apporte une réponse à cette question (tableau 2).

TABLEAU 2

Chromatographie sur colonne de Sépharose poly(U) des ARN extraits à 4° C et à 55° C, de cellules âgées de 6 h. ou de 3 j.

		extrait 1			extrait 2		
		cpm	A 260	AS	cpm	A 260	AS
6 h.	Filtrat	1 003 950	20,7	48 500	797 400	8,31	95 956
	Eluat	257 700 (20,4 %)	1,9 (8,2 %)	137 074	154 900 (16,3 %)	0,53 (6 %)	292 264
	Total	1 261 650	22,58	55 874	952 300	8,84	107 726
3 j.	Filtrat	357 600	7,56	47 300	213 750	2,02	105 816
	Eluat	64 240 (15,2 %)	0,45 (5,6 %)	142 745	63 900 (23 %)	0,30 (13 %)	213 000
	Total	421 840	8,01	52 664	277 650	2,32	119 676

Des aliquotes de 1 ml contenant les ARN extraits à 4° C ou à 55° C sont déposées au sommet d'une colonne de Sépharose poly(U).
Les nombres entre parenthèses correspondent aux pourcentages par rapport aux totaux.

Après 6 h. de culture, la proportion d'ARN poly A⁺ dans les 2 types d'extraits rassemblés est de 7,7 % alors que celle de la radioactivité est de 18,6 %. La valeur de l'activité spécifique est de 169.794. Quant aux ARN poly A⁻ qui ne sont pas retenus par les séquences poly (U) de la colonne et qui par conséquent filtrent à travers le Sépharose, leur activité spécifique est 61.902 soit 2,75 fois moindre.

Des valeurs sensiblement identiques se retrouvent dans les cellules âgées de 3 j. Les ARN polyadénylés représentent-en effet 7,26 % de l'ARN total, ils contiennent 18,3 % de la radioactivité incorporée et leur activité spécifique est de 170.853 soit 2,9 fois celle des ARN poly A⁻ (AS : 59 640).

Par ailleurs la valeur des activités spécifiques des ARN poly A⁺ retenus sur la colonne et qui pour être récupérés doivent être élués, varie selon que l'extraction a eu lieu

à 4° C ou à 55° C (tableau 3). Elle est en effet double dans les extraits chauds mais pratiquement identique que les cellules aient 6 h ou 3 j. De la même façon, l'incorporation de l'adénosine dans les molécules polyadénylées extraites à 4° C est semblable quel que soit le stade auquel les cellules ont été prélevées.

TABLEAU 3

Activités spécifiques des ARN poly A⁺ et poly A⁻ des extraits 1 et 2 de cellules de 6 h. et de 3 j.

		extrait 1 + 2		
		A 260	cpm	AS
6 h.	poly A ⁺	2,43 (7,7 %)	412 600 (18,6 %)	169 794
	poly A ⁻	29,1	1 801 350	61 902
	Total	31,42	2 213 950	-
3 j.	poly A ⁺	0,75 (7,26 %)	128 140 (18,3 %)	170 853
	poly A ⁻	9,58	571 350	59 640
	Total	10,33	699 490	-

Les nombres entre parenthèses donnent les pourcentages par rapport aux absorbances ou radioactivités totales des extraits.

L'hydrolyse des ARN poly A⁺ par la ribonucléase pancréatique A et la ribonucléase T₁ permet d'isoler la séquence polyadénylée qui est épargnée par cette hydrolyse enzymatique (DARNELL et al., 1971 ; LEE et al., 1971). En effet les sites d'action spécifique de la ribonucléase A sont les liaisons phosphodiester des bases pyridiniques, alors que la T₁ attaque les liaisons proches de la guanosine. Le mélange réactionnel est donc chromatographié sur une colonne de Sépharose poly (U) qui laisse filtrer les nucléotides résultant de l'hydrolyse et retient les séquences polyadényliques. La radioactivité retenue correspond, chez des cellules de 6 h. au tiers de l'adénosine incorporée dans les ARN polyadénylés extraits "à froid" ou "à chaud". Dans les cellules de 3 j. elle n'en

représente que le quart (tableau 4). Or, nous avons vu précédemment que la proportion des ARN poly A⁺ était sensiblement équivalente quel que soit le stade auquel les cellules étaient prélevées.

TABLEAU 4

Chromatographie sur colonne de Sepharose poly (U) des séquences poly adényliques

		extrait 1	extrait 2
	Radioactivité totale	634 500	90 100
6 h.	Filtrat	406 900	59 600
	Eluat	227 600 (36 %)	30 500 (34 %)
	Radioactivité totale cpm	110 900	90 200
3 j.	Filtrat	81 200	67 200
	Eluat	29 700 (27 %)	23 000 (25,5 %)

Les fractions précédemment retenues sont hydrolysées à 37° C pendant 45 min. par les RNAses A et T₁, puis déprotéinées à l'aide d'un mélange phénol/chloroforme (V/V) puis chromatographiées sur colonne de Sepharose poly (U).

Deux hypothèses peuvent être envisagées : ou bien la séquence polyadénylique est plus longue dans les ARN poly A⁺ de cellules de 6 h., ou bien le turnover de l'adénosine y est plus élevé. Nous avons donc mesuré la taille moyenne des fragments polyadénylés. L'éluat des colonnes de Sépharose poly (U) est précipité par de l'éthanol absolu froid en présence de 0,2 mg d'ARN soluble de levure qui sert d'entraîneur de la précipitation. Après centrifugation, le culot est soumis à une hydrolyse alcaline qui va libérer de l'AMP qui est le nucléotide intracaténaire et l'adénosine qui est le nucléoside terminal. La quantité de molécules d'adénosine équivaut donc au nombre total de chaînes polyadénylées. Le rapport AMP/adénosine traduit la longueur moyenne des chaînes.

Le tableau 5 montre d'abord que l'AMP représente effectivement de 93 à 98 % de la radioactivité des fragments polyadényliques dont la taille moyenne est d'environ 130 nucléotides dans les ARN de cellules de 6 h. ainsi que dans ceux extraits "à froid" de cellules cultivées pendant 3 j. Lorsque, dans ces dernières, l'extraction a été effectuée "à chaud", les séquences poly A ne renferment plus en moyenne que 90 nucléotides.

TABLEAU 5

Chromatographies de l'hydrolysate des séquences poly A.

Durée de la culture	Extrait 1		Extrait 2		
	solvant 1	solvant 2	solvant 1	solvant 2	
6 h.	Radioactivité appliquée (cpm)	25 830	25 726	14 362	14 722
	AMP	25 638	-	14 200 (99 %)	-
	Adénosine (cpm)	-	192 (0,75 %)	-	114 (0,77 %)
	Taille moyenne (nombre d'AMP)	133		126	
3 j.	Radioactivité appliquée (cpm)	39 622	57 233	10 102	13 732
	AMP (cpm)	38 028 (98 %)	-	9 420	-
	Adénosine (cpm)	-	435 (0,75 %)	-	143 (1 %)
	Taille moyenne (nombre d'AMP)	127		90	

Le système solvant 1 isole l'AMP, le solvant 2 l'adénosine.

La taille moyenne de la séquence poly A est calculée par le rapport

$$\frac{\text{AMP (cpm)}}{\text{Adénosine (cpm)}} \times \frac{\text{radioactivité totale appliquée dans le solvant 2}}{\text{radioactivité totale appliquée dans le solvant 1}}$$



Enfin si les ARN de transfert et les ARN ribosomiaux légers et lourds sont caractérisés par des valeurs définies de leur constante de sédimentation, l'ensemble des ARN messagers polyadénylés ou non se distingue par son caractère hétérodispersé. Cela signifie qu'ils se répartissent très largement dans un gradient linéaire de densité.

Nous avons donc procédé à des centrifugations en gradient de saccharose (5 à 20 %) d'ARN totaux et d'ARN poly A⁺ extraits "à froid" et "à chaud" de cellules de 6 h.

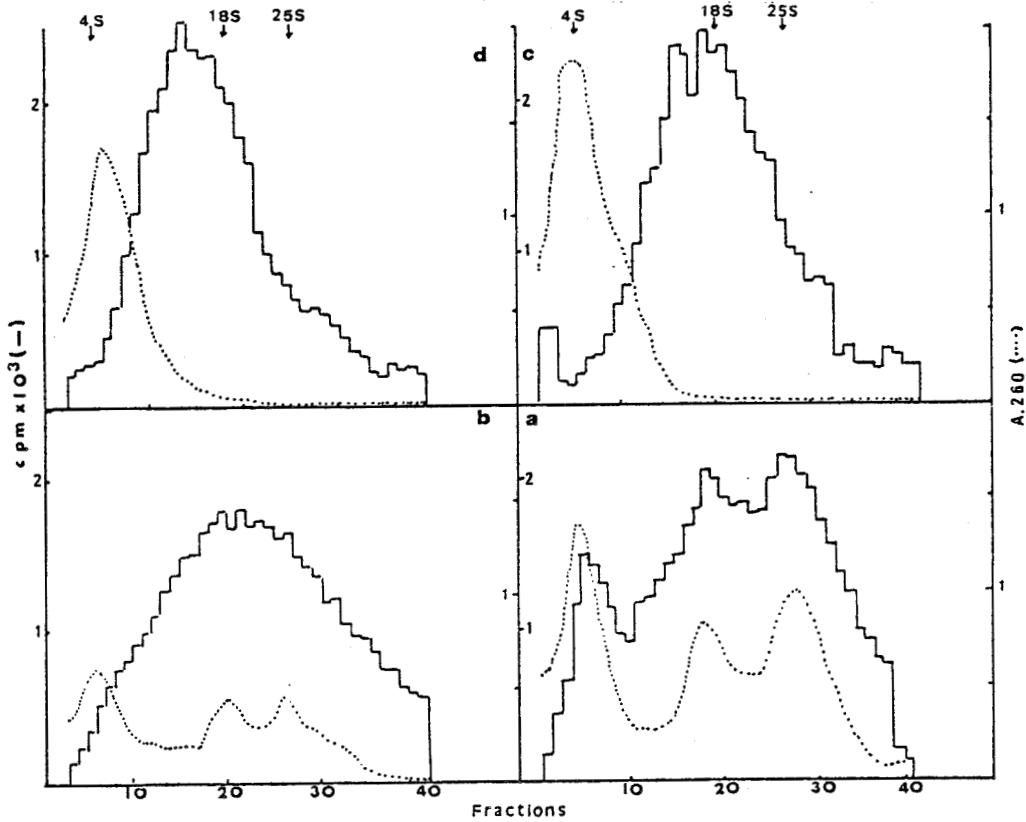


Figure 6 : Répartition des ARN totaux (a - b) et des ARN poly A⁺ (c - d) de cellules de 6 h. après centrifugation en gradient linéaire de saccharose.

Les échantillons à analyser (environ 1 à 2 unités A 260 dans 150 μ l) sont déposés au sommet d'un gradient de 5 ml de saccharose (5 à 20%). La centrifugation s'effectue à 20° C pendant 3 h. à 180 000 g (50 000 rpm rotor SW65L Beckman). L'éluion est faite par un dispositif ISCO et l'absorbance mesurée dans une unité de lecture UAS. Des fractions de 150 μ l sont prélevées pour la mesure de la radioactivité.
 a et c : extraction à 4° C
 b et d : extraction à 55° C

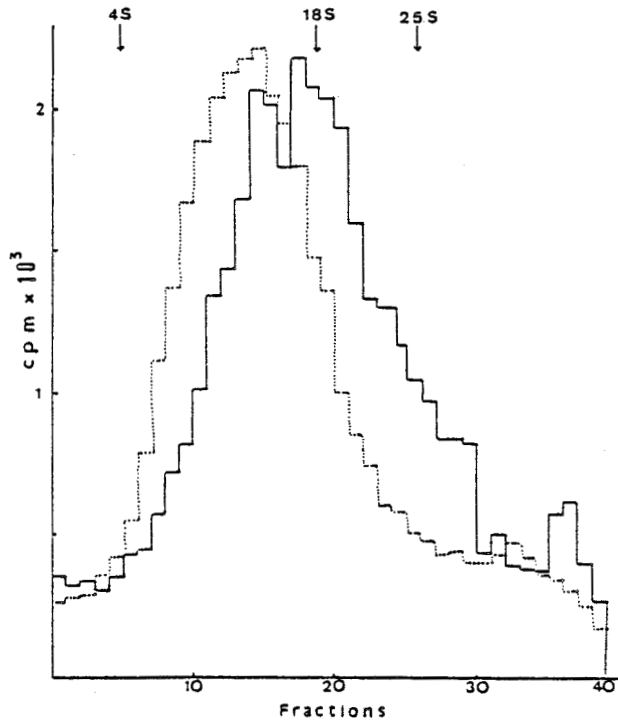


Figure 7 : Répartition de la radioactivité d'ARN poly A⁺ de cellules de 3 j. après centrifugation en gradient linéaire de densité (180 000 g, 3 h.).
 (—) radioactivité en cpm des molécules extraites "à froid" ; (....) radioactivité en cpm de celles extraites "à chaud".

La figure 6 résume les résultats obtenus. Les profils de l'absorbance à 260 nm des ARN extraits à 4° C ou à 55° C présentent 3 pics : le premier correspond aux ARN de transfert 4 S et à l'ARN ribosomal 5 S qui pénètrent peu dans le gradient, alors que les deux autres se rapportent aux ARN ribosomaux 18 et 25 S. Lorsque l'extraction a été effectuée à 55° C, la séparation des ARN 18 et 25 S est moins nette et le pic correspondant à l'espèce la plus lourde est peut être contaminé par la présence de molécules plus lourdes.

Les courbes de radioactivité des ARN extraits "à chaud" ou "à froid" diffèrent par contre plus nettement.

Pour les espèces moléculaires extraites à 4° C, la radioactivité est fortement marquée au niveau des ARN 4 et 5 S ainsi que des composants ribosomaux 18 et 25 S (figure 6 a). Pour les ARN extraits "à chaud" le marquage se retrouve dans tout le gradient, mais surtout dans les espèces moléculaires qui se situent entre 15 et 25 S (figure 6 b).

L'analyse des ARN poly A⁺ correspondants démontre leur caractère hétérodispersé (figure 6 c, d). La plupart se répartissent autour de la valeur 18 S lorsqu'ils ont été extraits "à froid", alors qu'ils migrent un peu moins loin dans le gradient s'ils ont été obtenus "à chaud". Le grand pic d'absorbance à 260 nm correspond à l'ARN soluble de levure qui est utilisé comme entraîneur de la précipitation des ARN polyadénylés.

Ce décalage entre les distances de migration des ARN poly A⁺ extraits à des températures différentes se retrouve lorsque les cellules ont été prélevées après 3 j. de culture (figure 7).

Ce résultat pourrait être la conséquence d'une dégradation des ARN poly A⁺ et plus particulièrement de la séquence polyadénylique au cours de l'extraction à 55° C.

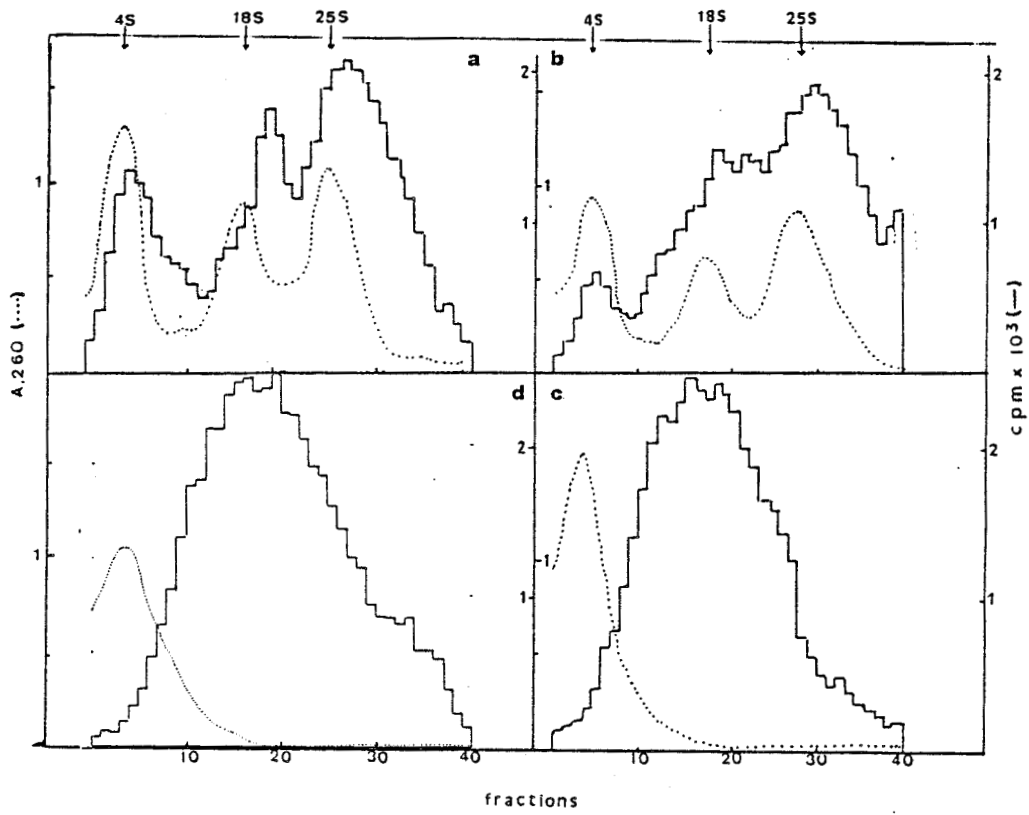


Figure 8 : Répartition, après centrifugation en gradient linéaire de densité (180.000 g, 3 h.) de la radioactivité des ARN totaux (a - b) et des ARN poly A⁺ extraits de façon séquentielle à pH 7,2 et 9, de cellules de 6 h. (c -d)
a et d : extraction à pH 7,2
b et c : extraction à pH 9

Nous avons alors adopté une méthode d'extraction à 4° C basée sur l'emploi successif de deux tampons dont l'un est proche de la neutralité (pH 7,6) et l'autre nettement alcalin (pH 9) (BRAWERMAN et al., 1972). Les ARN poly A⁺ ainsi obtenus peuvent posséder des séquences polyadényliques de taille identique quel que soit le pH du tampon (ESNAULT et al., 1975) ou au contraire différente. Dans certains cas le segment poly A est en effet plus court dans les ARN extraits à pH 7,6 (BRAWERMAN, 1973).

Appliqué à des cellules de Silène prélevées après 6 h de culture ce procédé a abouti à des résultats identiques à ceux obtenus par la méthode d'extraction thermique séquentielle.

La figure 8 montre en effet que les ARN poly A, obtenus à pH 9, se répartissent sensiblement de la même façon dans le gradient de saccharose que ceux extraits à 55° C. Dans les cellules du Silène, la différence de migration des deux populations d'ARN poly A⁺ dans un gradient de saccharose n'est donc apparemment pas liée à une dégradation de la séquence polyadénylique par la température. Par contre, la comparaison des profils de radioactivité des ARN totaux, extraits à pH 9 ou à 55° C, révèle une différence très nette de leur répartition en gradient de densité (figure 6 b, 8 b). L'extraction à chaud entraîne en effet la disparition plus ou moins prononcée des ARN légers (4 et 5 S) ainsi que de l'ARN ribosomal 25 S. Ou bien, les deux procédés entraînent des espèces moléculaires différentes parce que la force ionique du tampon pH 9 est supérieure à celle du tampon utilisé à 55° C, ce dernier contenant de l'acétate de sodium 10 mM alors que le premier renferme du Tris 100 mM, ou bien, l'accroissement de température provoque une hydrolyse de certains types de molécules.

II - DISCUSSION

Avant de comparer nos résultats à ceux cités dans la littérature, il nous a paru utile de faire le point sur le rôle joué par la séquence polyadénylée des ARN nucléaires ou cytoplasmiques.

Afin de ne pas alourdir cet exposé, nous n'avons retenu que les grandes lignes générales qui résument l'état de nos connaissances actuelles provenant très souvent de l'étude de cellules animales et dont on trouvera le détail dans LEWIN (1980) et BRAWERMAN (1981).

- 1) La séquence polyadénylée des ARN hétérodispersés nucléaires et des ARN messagers.

La transcription des gènes par l'ARN polymérase II nucléoplasmique génère une longue molécule d'ARN hétérodispersé (hn RNA) dont la synthèse est très rapide puisque 5.000 nucléotides peuvent être transcrits en moins d'une minute. Cette molécule va subir une série de transformations séquentielles qui constituent la maturation. Parmi ces événements figure l'addition d'une séquence polyadénylée à l'extrémité 3' de certains hn RNA. Cette polyadénylation s'effectue nucléotide après nucléotide; il n'existe, en effet, aucun réservoir de segments poly A libres ; elle compte parmi les événements lents de la maturation et n'interviendrait qu'après un certain délai, une fois la transcription achevée.

Le poly A des hn RNA nucléoplasmiques a une taille moyenne sensiblement identique, dans les différentes catégories de molécules natives, et représente de 0,5 à 1 % du hn RNA total.

La présence de séquences polyadényliques à l'extrémité 3' des ARN messagers a également été montrée; là encore la longueur moyenne serait constante et indépendante de la taille du messager. Les fragments poly A peuvent, du fait de leur

résistance à la ribonucléase pancréatique A, être isolés et analysés en gradient de densité : leur constante de sédimentation, légèrement inférieure à celle des ARN de transfert 4 S, est identique quelle que soit leur origine ; ils seraient constitués d'environ 200 nucléotides.

Le turnover des segments poly A a été beaucoup étudié. Dans le cytoplasme quelques nucléotides (une dizaine au maximum) peuvent s'ajouter, cependant on assiste plutôt à un raccourcissement au cours du vieillissement de l'ARN messager. Ce phénomène ne modifie pourtant pas la capacité de traduction des messagers puisqu'il se rencontre dans des cellules dont la synthèse protéique a été inhibée. Enfin la traduction d'ARN poly A⁺ natifs est semblable à celle de "vieux" ARN poly A⁺ dont la séquence polyadénylée a été raccourcie. La longueur du segment terminal ne semble donc pas influencer la capacité de traduction "in vitro". Par ailleurs cette diminution de la taille du poly A n'affecte pas tous les ARN messagers de la même façon : chez le Lapin ou la Souris le poly A des ARN messagers natifs de la globine compte environ 150 nucléotides, alors que celui isolé de cellules sanguines matures se répartit en trois classes discrètes de 40, 60 ou 100 nucléotides. Le pourquoi de ce raccourcissement, éventuellement sélectif, reste inexplicé.

Comme la longueur moyenne du poly A des m RNA et des hn RNA est sensiblement identique, on a pensé que le hn RNA était le précurseur des messagers conservés et transportés dans le cytoplasme. Cette hypothèse est corroborée par de nombreuses expériences effectuées avec des inhibiteurs métaboliques : la cordycépine qui est analogue de l'adénosine, bloque la réaction de polyadénylation sans modifier la transcription, mais elle empêche l'apparition d'ARN messager marqué dans le cytoplasme. Le DRB* inhibe la synthèse de hn RNA d'environ 70 % mais celle des ARN messagers de 95 %.

* DRB : 5,6 dichloro-1-β-D ribofuranosyl benzimidazole, inhibiteur de la synthèse des hn RNA et des mRNA.

Ces observations plaident en faveur d'une relation précurseur - produit, entre hn RNA et ARN m, dans laquelle la polyadénylation joue un rôle, sans qu'il soit possible de le définir. Chez certaines cellules animales, 50 % des hn RNA seraient dégradés dans le noyau et moins de 10 % se retrouvent dans l'ARN messenger poly A. Comme le taux de hn RNA poly A⁺ est souvent voisin de celui des m RNA poly A⁺, l'hypothèse selon laquelle la majorité des séquences polyadénylées sont conservées pour favoriser le transport des messagers dans le cytoplasme est séduisante. Mais comment expliquer alors la présence et le transfert d'ARN poly A⁻ dans le cytoplasme ? Environ 30 % des messagers non polyadénylés sont des précurseurs d'histones et la fraction restante ne semble pas provenir de molécules polyadénylées qui auraient perdu leur séquence poly A terminale. En effet, le profil de migration en gradient de densité des m RNA poly A⁻ est identique à celui des m RNA poly A⁺ (maximum à 16 S chez les mammifères et 22 S chez l'Oursin). Le traitement des polysomes par la puromycine permet d'obtenir deux populations messagères, l'une poly A⁻, l'autre poly A⁺ qui sont toutes deux capables de synthétiser des protéines et dont la stabilité est identique. Ces deux types de molécules pourraient alors représenter des séquences totalement différentes. L'utilisation de sondes moléculaires connues d'ADN complémentaire (cDNA), issu de la transcription reverse de messagers, et, l'analyse comparée des électrophorèses des protéines traduites "in vitro", ont montré que l'ARN m poly A⁻ est un sous ensemble de l'ARN m poly A⁺. Les deux types d'ARN synthétisent des protéines identiques, mais ceux qui sont polyadénylés en produisent plus.

Les ARN poly A⁻ ne peuvent-ils cependant contenir des séquences absentes des ARN poly A⁺ ? La question n'a apparemment pas reçu de réponse satisfaisante.

L'existence de messagers, polyadénylés ou non, dans les polysomes et la démonstration d'une homologie au moins partielle des séquences des 2 types de molécules, soulignent bien la difficulté que l'on a de comprendre le rôle du segment polyadénylé.

Ainsi les messagers de la globine peuvent être poly A⁺ ou poly A⁻. L'incorporation des uns et des autres dans des oocytes de Xénope, utilisés comme système de traduction "in vivo", conduit à des résultats différents : les ARN poly A⁻ ne synthétisent plus de globine 20 h après leur injection, alors que les ARN poly A⁺ en fabriquent encore. Ceci témoignerait en faveur d'une stabilisation de la molécule messagère par le poly A.

En conclusion, on voit donc que les résultats sont souvent contradictoires et qu'ils varient selon les systèmes d'analyse utilisés ou les espèces étudiées.

Il semblerait, mais de nombreuses expériences de vérifications sont nécessaires, que la séquence poly A jouerait deux rôles.

D'abord, elle pourrait intervenir, au moins partiellement dans le contrôle de la stabilité des molécules messagères cytoplasmiques, en les préservant de l'intervention d'endo-ou d'exonucléase. Ce rôle protecteur pourrait être assuré par une liaison poly A - protéine. Si la dégradation de l'ARN m cytoplasmique exige l'ablation de la séquence poly A, un processus de contrôle devrait opérer. Or une protéine cytoplasmique soluble capable de se lier à la protéine attachée au poly A a été mise en évidence. La perte de la séquence polyadénylée pourrait aussi être le résultat d'une hydrolyse par une endonucléase de la région non codante de l'extrémité 3' qui précède la séquence poly A. La diversité structurale de cette région expliquerait la possibilité de clivages différentiels des ARN m. Mais si un tel mécanisme existait, il

faudrait alors abandonner l'idée d'une relation entre raccourcissement du poly A et stabilisation de l'ARN messenger. Etant donné que certains messagers, comme ceux des histones par exemple, ne sont pas polyadénylés, il faut bien admettre l'existence d'un autre processus de stabilisation de ces molécules.

Pour ce qui est des ARN nucléaires, le poly A joue sans doute un rôle de protection des molécules qui l'ont acquis, alors que les autres seraient détruites au cours de la maturation. Mais on peut également attribuer une autre fonction à la séquence poly A : elle participerait à la sélection des régions terminales 3' des chaînes d'ARN messenger durant leur genèse dans le noyau. Cette hypothèse résulte de l'étude de la maturation de l'ARN messenger viral : les régions transcrites de l'ADN sont polycistroniques, si bien que l'excision libère plusieurs extrémités 3' mais un seul fragment donnera naissance à un messenger. La maturation est donc très spécifique puisque un seul site de terminaison 3' accrochera du poly A. Ce dernier pourrait également participer à l'épissage de l'extrémité 3' au reste de l'ARN messenger excisé. Il est évident que les mécanismes moléculaires qui interviendraient au cours de tous ces remaniements éventuels restent inconnus.

2) ARN polyadénylés et séquences poly A des cellules végétales.

Comme pour les suspensions cellulaires d'Arachide (VERMA et MARCUS, 1974) ou de Rose (RAMAGOPAL et al., 1977) le transfert de cellules de Silène, prélevées pendant la phase stationnaire, dans du milieu neuf entraîne un accroissement de leur taux d'azote protéique (DUBOIS et al., 1976) qui culmine vers le 3ème ou 4ème jour de culture. C'est à ce moment que leur index mitotique est le plus élevé et que leur cytoplasme est le plus dense. En même temps intervient une synthèse importante d'ARN dont 7 % est polyadénylé et représente vraisemblablement une fraction messagère. Comme 18 % de la radioactivité incorporée s'y retrouve (Tableau 3), son activité spécifique est élevée, ce qui signifie ou bien une synthèse active de ce type d'ARN ou bien un taux de renouvellement rapide de

la séquence polyadénylée indépendamment du reste de la molécule. La stabilité des ARN messagers est généralement très grande chez les végétaux et chez les graines en particulier où, certains messagers seraient transcrits lors de la maturation de la graine puis stockés. L'imbibition puis la germination entraîne une modification de l'expression génique (MARCUS et al., 1975 ; WALBOT et al., 1975 ; DELSENY et al., 1975) et certains ARN messagers, mis en réserve, seraient traduits en même temps que des messagers nouvellement transcrits (DELSÉNY et al., 1980). De tels événements ont aussi été décrits dans des tissus de Soja transplantés dans un milieu riche en cytokinines (FOSKET et TEPFER, 1978). L'introduction des techniques de chromatographie d'affinité a permis la séparation des ARN messagers poly A⁺ et l'étude de la durée de vie de la molécule entière ou de la séquence poly A. Chez le Radis, 60 % du poly A a une durée de demi-vie d'environ 30 min., alors que pour les 40 % restants elle est de 4 à 5 heures ; cependant la disparition de la séquence polyadénylée ne modifie en rien la capacité de traduction *in vivo* de l'ARN messager (DELSÉNY et al., 1975). Ce qui signifie que la présence du fragment polyadénylique n'est pas nécessaire à la traduction, fait bien connu chez les cellules animales. De plus, le taux de renouvellement du poly A est indépendant de celui du reste de la molécule messagère : par des marquages par l'uridine tritiée qui s'incorpore dans la partie non polyadénylée de la molécule, ou par l'adénosine ¹⁴C, on a en effet montré que le renouvellement du fragment poly A est très rapide, sa durée de vie étant inférieure à une heure (ASPART et al., 1979 ; DELSENY et al., 1980).

Cette disparité de la longévité des différents ARN poly A⁺ ou du poly A par rapport au reste de la molécule se retrouve dans des suspensions cellulaires : dans les cellules de Soja, coexistent des ARN poly A⁺ dont la durée de vie est brève (moins d'1 heure) et d'autres pour lesquelles elle est de 4 à 5 heures (SILFLOW et KEY, 1979). Cependant, si le renouvellement des molécules poly-adénylées se déroule tant dans le noyau que dans le cytoplasme des cellules animales, rien de tel n'a été mis en évidence dans le règne végétal.

La mise en culture de cellules de Silène provoque une synthèse d'ARN dès la 6ème heure. La teneur et l'activité spécifique des espèces polyadénylées sont identiques à celle des ARN poly A⁺ de cellules de 3 j. (tableau 3).

Dans d'autres suspensions cellulaires, la culture de cellules prélevées en phase stationnaire provoque un accroissement du nombre de polysomes pendant la phase de latence (VERMA et MARCUS, 1974 ; CELLA et al., 1976). Chez la Rose, le contenu en polysomes croît graduellement pendant la phase exponentielle de croissance puis diminue progressivement (RAMAGOPAL et al., 1977). Pourtant la synthèse d'ARNm n'est guère modifiée au cours du cycle de culture, alors que celle de l'ARN ribosomal varie beaucoup (RAMAGOPAL et MARCUS, 1979).

Les cellules de Silène semblent répondre de la même façon puisque l'ARN poly A⁺ est constant au cours de la culture en effet le taux de molécules polyadénylées, de cellules prélevées en fin de phase stationnaire et remises dans leur milieu de culture auquel a simplement été ajouté de l'adénosine ¹⁴C pendant 2 heures, est toujours d'environ 7 %. (Comme ce type d'expérimentation n'a été réalisé que deux fois, nous ne l'avons pas fait figurer dans nos résultats). La synthèse précoce d'ARNm pourrait donc bien correspondre à celle d'ARN ribosomiaux ou d'ARNm poly A⁻. L'intervention d'une synthèse d'ARN précédant la répllication d'ADN a été montrée dans des racines ou des embryons de Fève (JAKOB et BOVEY, 1969 ; FUKUEI et al., 1977). Un remaniement de la distribution des ribosomes s'observe au cours de la culture de cellules de Soja : au cours de la croissance tous les ribosomes se retrouvent dans les polysomes, alors qu'en phase stationnaire 45 % des ribosomes sont libres. Le potentiel de traduction s'accroît donc avant même que l'ADN ne se réplique. Pourtant aucune protéine spécifique n'a pu être mise en évidence à aucun moment du cycle de croissance (FOSKET, 1981). Si dans les cellules de Silène, un surcroît d'ARNm est transcrit à la 6ème heure de culture, il est sans doute essentiellement poly A⁻ et code pour des histones ou d'autres protéines. Comme dans les cellules animales, l'ARNm

des végétaux peut en effet être bimorphique (GALAU et al., 1981).

Que la quantité d'ARN poly A⁺ n'augmente pas au début de la mise en culture, peut surprendre puisque les cellules se trouvent plongées dans un milieu contenant une substance de croissance qui est consommée au cours de la croissance de diverses suspensions cellulaires (LEGUAY et GUERN, 1977 ; DUBOIS, 1980). La teneur en ARN poly A⁺ est souvent stimulée par les hormones comme le 2,4 D, qui accroît le taux d'ARN poly A⁺ d'hypocotyles de Soja (ZURFUH et GUILFOYE, 1982), ou l'acide gibbérellique, qui augmente la quantité d'ARNm poly A⁺ de couches à aleurone de l'Orge (JACOBSEN et ZWAR, 1974 , HIGGINS et al., 1976).

Cette différence de comportement des cellules de Silène vis à vis de l'hormone pourrait bien être liée à leur perte d'aptitude à la différenciation. Le segment polyadénylé comprenant environ 130 nucléotides présente une longueur moyenne constante sauf pour les molécules extraites à 55° C de cellules de 3 jours. Cette longueur est identique à celle calculée dans d'autres matériels : le poly A d'ARN extrait de cals de Riz compte entre 100 et 150 nucléotides (MANAHAN et al., 1973), celui provenant de racines de Fève en comporte 200 que l'extraction ait été effectuée à pH 7,2 ou 9 (ESNAULT et col., 1975). Que la taille moyenne des séquences poly A extraites "à chaud" de cellules de 3 jours soit plus courte que celles des molécules obtenues à froid est à priori surprenant ; en effet même si certains raccourcissements ont été signalés, on accorde généralement une longueur constante au poly A, du moins dans les cellules animales. Nous ne pensons pas que cette réduction de la longueur moyenne soit une conséquence de la méthode utilisée : les séquences poly A ont en effet la même taille, qu'elles soient extraites de cellules de 6 h, à 55° C ou à 4° C (mais à pH 9) et les ARN poly A⁺ correspondants ont la même constante de sédimentation. On peut alors s'interroger sur la nature des molécules obtenues à 55° C ou à pH 9 et qui ne sont pas extractibles à froid et à pH 7,2. A partir d'assertions d'autres auteurs (TEYSSERE, 1974) nous avons admis

sans l'avoir vérifié, que la méthode "à chaud" extrayait l'ARN nucléaire. Comme il représente environ 5 % de l'ARN total (tableau 1) cette hypothèse est plausible, mais il pourrait très bien représenter une population moléculaire enchâssée dans des structures hydrophobes qui ne seraient pas dissociées par les méthodes d'extraction habituelles, comme les polysomes liés au réticulum endoplasmique par exemple.

Chez l'Erable la quantité de poly A⁺ extrait de polysomes libres est en effet plus importante que celle extraite de polysomes liés (CELLA et al., 1976). A moins que certains ARN poly A⁺ ne forment des duplex avec d'autres ARN riches en UMP par exemple (TOMASZEWSKI et BUCHOWICZ, 1981) et n'exigent des conditions d'extraction plus drastiques. Toutes ces hypothèses mériteraient une vérification minutieuse. Quoiqu'il en soit, ces ARN et tout particulièrement les ARN poly A⁺ ont une activité d'incorporation de l'adénosine extrêmement importante (tableaux 1 et 2) et sont donc ou nouvellement synthétisés ou rapidement renouvelés.

D'autre part il ne faut pas oublier que ces valeurs : 90 ou 130 nucléotides, représentent des moyennes ; elles masquent l'éventualité d'une hétérogénéité des longueurs du poly A. Chez l'Orge les segments poly A sont distribués dans deux classes de taille : les uns ont 250 nucléotides, les autres 70 (JACOBSON et ZWAR, 1974). L'emploi de méthodes d'analyse plus sophistiquées comme l'hybridation de l'ARN avec des sondes d'ADN complémentaires (cDNA), obtenues par transcription reverse d'ARN poly A⁺, ainsi que l'étude par électrophorèse bidimensionnelle des produits de la traduction *in vitro* des messagers isolés, a montré que dans les hypocotyles de Soja par exemple, il existait au moins trois classes de séquences messagères (WALKER et KEY, 1982). Le traitement de ces hypocotyles par de l'acide indolyl acétique provoque deux types de réponse : les unes très rapides comme l'élongation cellulaire qui intervient 10 à 20 min. après l'addition d'AIA, les autres plus tardives qui se manifestent après quelques heures et qui

annoncent la division cellulaire. Or l'AIA entraîne la disparition de certains messagers en même temps que l'augmentation relative d'autres séquences, à moins qu'il ne s'agisse de synthèses en cascade de molécules messagères. On peut donc imaginer un programme de réponses à une action hormonale. L'analyse du spectre de protéines synthétisées *in vitro* à partir de messagers isolés après traitement court par l'AIA, ne permet pas de déceler de différences significatives. La réponse à l'hormone est vraisemblablement très spécifique et serait liée à des modifications cellulaires précoces, concernant l'élongation cellulaire et les remaniements pariétaux (THEOLOGIS et RAY, 1982).

L'augmentation du taux de certaines molécules messagères, sous l'effet d'un facteur hormonal par exemple, correspond-elle à une stimulation de la transcription proprement dite, de la maturation, ou à un ralentissement de la dégradation ? La réponse est d'autant plus difficile que l'emploi d'inhibiteurs de la transcription comme l'actinomycine D n'est pas d'un grand secours. L'analyse des résultats obtenus après une action du 2,4 D sur des hypocotyles de Soja plaide plutôt en faveur d'une stimulation de la transcription (GUILFOYLE, 1980). Mais une fois encore, les observations sont très contradictoires : le 2,4 D réprime en effet l'expression de certains ARNm d'hypocotyles de Soja, ce qui signifie qu'ils ne sont pas traduits en protéines, de plus ces messagers se retrouvent dans les ARN poly A⁺ de tissus soumis ou non à l'action de l'hormone. La régulation de la traduction des messagers pourrait donc s'effectuer à un stade post-transcriptionnel (BAULCOMBE et KEY, 1980).

Notre approche expérimentale n'a donc pas permis de voir si le taux de certains ARN poly A⁺ variait au cours d'un cycle de croissance de cellules de Silène qui ne subissent que des phénomènes de grandissement ou de divisions cellulaires. Le segment poly A incorpore 33 % de la radioactivité après 6 h de culture et seulement 25 % après 3 jours (tableau 4). Comme la teneur en ARN poly A demeure apparemment constante durant le

cycle de croissance, il faut admettre un turnover plus rapide en début de culture, mais puisque nous n'avons obtenu que des valeurs moyennes, il est possible que ce renouvellement n'intéresse qu'une fraction de la population messagère, codant pour les enzymes impliquées dans les remaniements pariétaux ou dans l'absorption active de certains nutriments. On peut également envisager que la synthèse précoce d'ARN correspond à un ou plusieurs signaux, précédant la réplication de l'ADN ou la division cellulaire.

La modification des proportions relatives des différentes classes de messagers a été observée dans des cellules racinaires de Fève au cours de l'élongation de cellules sub-apicales. Le grandissement cellulaire s'y traduit pas une diminution du taux d'ARNm abondants (2.000 copies par cellule) et par l'apparition d'espèces nouvelles plus rares (50 à 60 copies par cellule) (VAILLANT et al., 1983). L'excision de ces racines provoque par ailleurs une chute de la protéosynthèse et la dégradation de certaines espèces messagères. Ainsi donc des chocs physiologiques ou le déroulement d'un programme de différenciation cellulaire modifient les proportions des différentes classes de messagers; et pourtant, 80 à 85 % des séquences se retrouvent dans des cellules méristématiques, en voie d'allongement ou arrivées à maturité (ESNAULT, 1985). Cette permanence d'une part importante de la population messagère est également observée dans des embryons de Soja ou de Coton qui se développent (GOLDBERG et al., 1981, GALAU et al., 1981) ou dans différents organes différenciés de Tabac (KAMELAY et GOLDBERG, 1980). Chez le Haricot, l'acide indolyl butyrique (A.I.B) induit la néoformation de racines adventives : 2 h après son application la synthèse de l'ARN total et poly A⁺ est accrue avant que ne commencent les divisions cellulaires (KATHARAJ et al., 1977). Chez *Phaseolus aureus*, l'application d'A.I.B. induit une réponse morphogène identique, mais se traduit par une diminution de l'ARN total et de l'ARN poly A⁺ ce qui pourrait refléter une redistribution des fonctions cellulaires

quand un programme de différenciation se met en place, sans qu'une relation simple ne puisse être établie entre les modifications du métabolisme de l'ARN poly A⁺ et le nombre de racines différenciées ultérieurement. La difficulté d'interprétation vient du fait que les cellules, qui vont donner naissance aux initiales racinaires, ne représentent qu'une infime partie des cellules hypocotylaires et qu'il est impossible de déterminer dans quelles limites le métabolisme de l'ARN de ces cellules est modifié (JARVIS et al., 1985).

Ces difficultés, nous les avons rencontrées au cours d'un travail effectué en collaboration avec J. VASSEUR (1978) ; la néoformation de bourgeons à partir d'explants foliaires cultivés *in vitro* s'accompagne de modifications de la teneur en ARN poly A⁺ ; il n'était alors pas possible de savoir quelle était la part des cellules impliquées dans la différenciation, ni celle des cellules subissant le traumatisme de l'excision.

Que le métabolisme de l'ARN et de l'ARN messager intervienne dans la régulation de la croissance ou de la différenciation cellulaire paraît évident. Pourtant les réponses apportées restent confuses et contradictoires, vraisemblablement propres au matériel végétal. Il est en effet extrêmement difficile de procéder à des incorporations isotopiques mesurables pour des temps de marquage de moins de 2 h. En particulier, l'incorporation d'acides aminés dans les polypeptides est insuffisante pour suivre l'évolution du spectre des protéines, par électrophorèse bidimensionnelle, au cours d'une modification des phénomènes de croissance (THEOLOGIS ET RAY, 1982).

Aussi avons nous tenté d'approcher les mécanismes de régulation de la division cellulaire et de l'expression génique qui la conditionne en utilisant comme matériel la suspension cellulaire du Silène, avant d'aborder le problème de la différenciation de cellules végétales au cours de la culture *in vitro*. Plutôt que de suivre les évolutions des

différentes populations messagères en faisant appel à des techniques d'hybridation avec des sondes de cDNA ou à l'analyse de la traduction *in vitro* des ARNm, nous avons préféré rechercher l'existence et l'évolution éventuelle de marqueurs protéiques enzymatiques qui accompagnent ces phénomènes.

*Regulation de l'activité nitrate
réductase des cellules de Silène.*

I - REGULATION METABOLIQUE

1) Croissance des cellules de Silène et activité nitrate réductase. :

Le milieu de culture des cellules de Silène renferme habituellement 300 mg par litre d'azote nitrique qui constitue l'unique source azotée. Le saccharose à la concentration de 20 g par litre est la source de carbone et représente le facteur limitant de la croissance (BRASSART et al., 1978). Le nitrate est donc en excès (DUBOIS, 1980) et, après 7 jours, le milieu de culture contient encore 120 mg d'azote nitrique. L'activité nitrate réductase, nulle dans des cellules prélevées en phase stationnaire, apparaît après 12 h de culture, augmente rapidement pour culminer vers le 2ème jour et diminue très rapidement (figure 9).

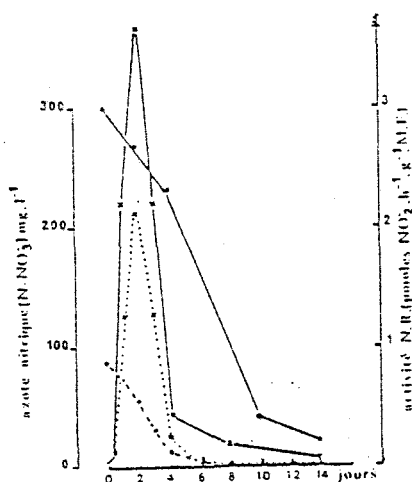


Figure 9 :

Evolution de l'activité nitrate réductase (X—X) (X...X) et de la teneur en azote nitrique (N-NO₃⁻) (●—●) (●...●) du milieu nutritif, au cours d'un cycle de culture de cellules de Silene alba. Les traits correspondent à un milieu de culture contenant initialement 300 mg l⁻¹ de (N-NO₃⁻), les traits discontinus sont relatifs à un milieu en contenant initialement 75 mg l⁻¹.

Après 7 jours elle n'est plus mesurable ni *in vivo*, ni *in vitro*, alors que l'absorption du nitrate se poursuit. On peut donc s'interroger sur le devenir du nitrate absorbé et lui attribuer un rôle dans le maintien de l'équilibre ionique, à moins qu'il ne soit réduit à un taux indiscernable par les méthodes de mesure habituelles. Comme la croissance cellulaire continue un apport azoté est nécessaire à la poursuite de la synthèse protéique.

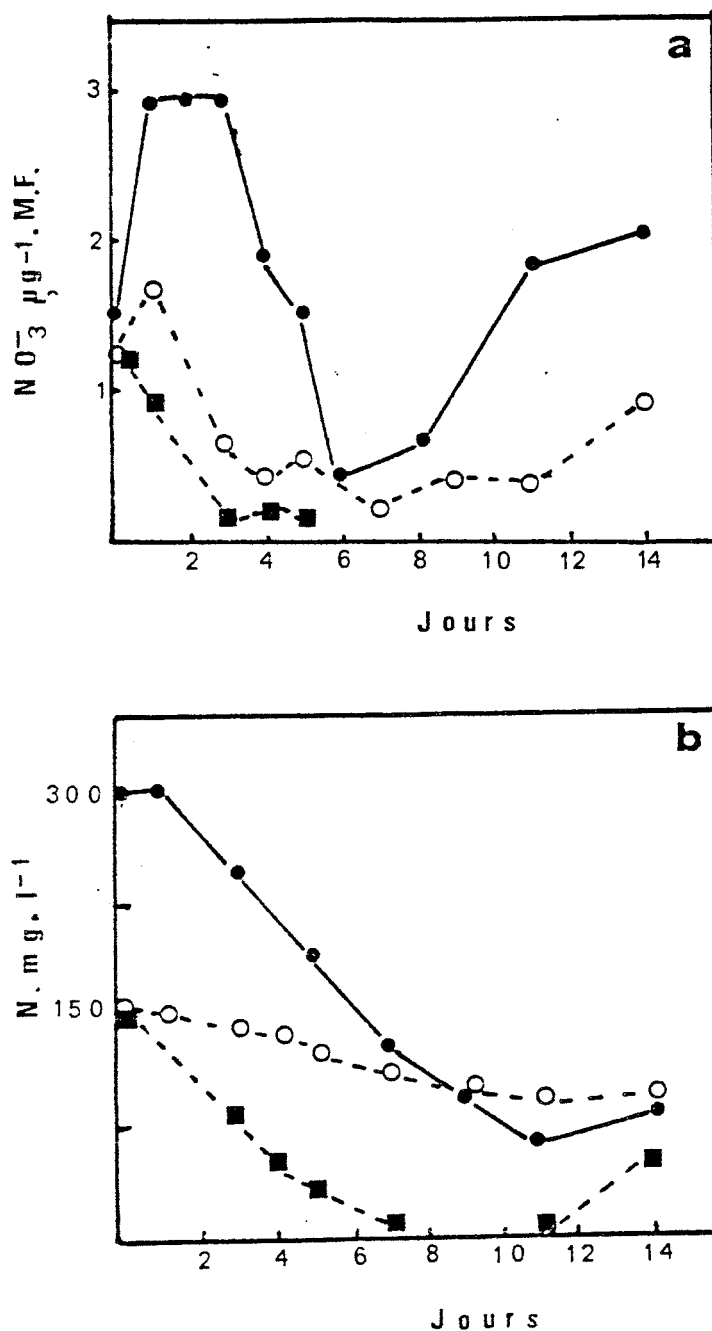


Figure 10 (a) : Teneur en NO_3^- de cellules cultivées en présence de nitrate (●—●), de nitrate d'ammonium (○--○) ou d'ammonium seul (■--■).

(b) : Evolution de la teneur en azote nitrique ou ammoniacal du milieu.

Variation de la concentration en N-NO_3^- (○--○) ou en N-NH_4 (■--■) lorsque la source azotée est $\text{NO}_3^- \text{NH}_4$.

Variation de N-NO_3^- lorsque la source est NO_3^- . (●—●)

Enfin, la diminution de la teneur en azote nitrique du milieu de culture de 75 % réduit la croissance finale de la suspension d'environ 20 %, mais ne modifie pas la vitesse de croissance cellulaire pendant les premiers jours de culture. Le profil d'activité nitrate réductase n'est pas changé mais le maximum d'activité est diminué d'environ 40 %. La chute de l'activité enzymatique suit de très près la disparition du nitrate du milieu (figure 9).

2) Teneurs en nitrate extra- et intracellulaire et activité nitrate réductase.

L'analyse de l'évolution de l'activité nitrate réductase a été reprise récemment mais en suivant simultanément les variations des taux de nitrate dans le milieu et dans les cellules. Dans celles-ci, la teneur en nitrate augmente très rapidement après la mise en culture, atteint un palier entre le 1er et le 3ème jour, puis diminue après l'apparition de l'activité nitrate réductase. Puis les cellules accumulent du nitrate en phase stationnaire (figure 10 a).

La disparition du nitrate du milieu s'effectue d'abord rapidement (170 mg en 7 jours), puis se ralentit pendant la seconde moitié du cycle de croissance alors que l'activité nitrate réductase n'est plus décelable dans les cellules et que du nitrate s'y accumule (figure 10 b).

L'absorption et l'accumulation du NO_3^- précèdent donc l'apparition de l'activité nitrate réductase. Un calcul sommaire montre qu'environ 23 μg d'azote nitrique sont absorbés par heure et par gramme de matière fraîche pendant les 3 premiers jours de culture, soit 1,64 μmoles de NO_3^- . Cette valeur s'accorde bien avec les activités nitrate réductase mesurées *in vitro* à 3 jours : de 1,5 à 2 μmoles de NO_3^- réduit par heure et par g de matière fraîche. Une culture de 14 jours représente une biomasse d'environ 30 g contenant de 100 à 105 mg de protéines ; en admettant que la valeur en azote soluble soit équivalente à celle de l'azote protéique, on peut estimer à 50 % la proportion d'azote nitrique métabolisé au cours d'un cycle de croissance.

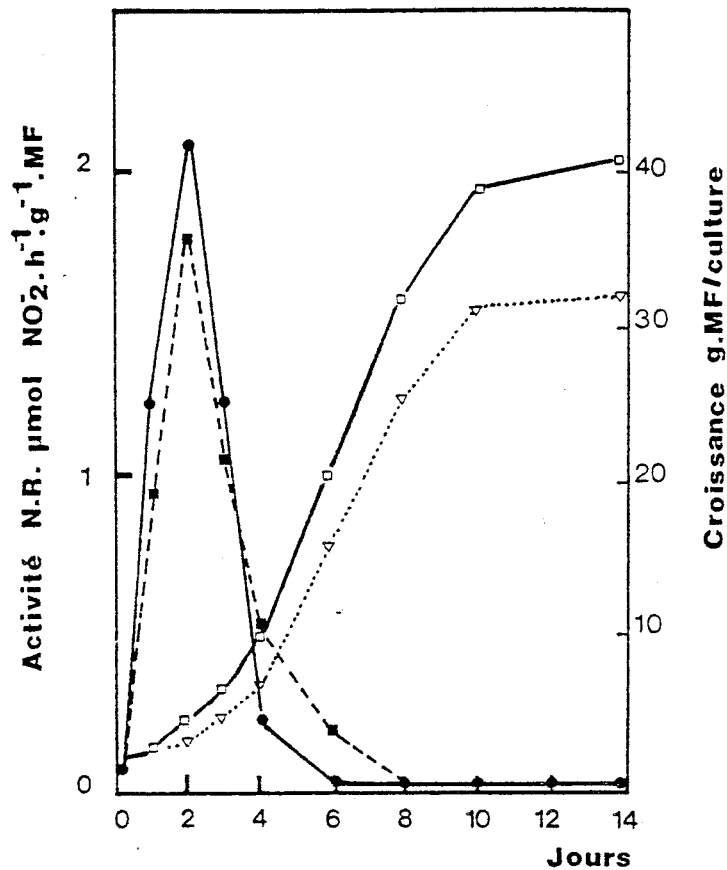


Figure 11 : Influence de l'ammonium (2mM) sur la croissance et l'activité nitrate réductase de cellules de *Silène* cultivées en présence de NO_3^- ou de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$. Croissance (□) et activité (●) en présence de 5mM de nitrate. Croissance (▽) et activité (■) en présence de 5mM de $\text{NO}_3^- + 2 \text{mM}$ de NH_4^+ . Les activités sont mesurées in vitro (les courbes d'activité sont identiques lorsque les mesures sont effectuées in vivo et les maximums sont environ 1,5 fois plus élevés.)

La diminution de l'activité nitrate réductase permet une accumulation de nitrate dans la cellule, vraisemblablement dans un pool de stockage vacuolaire. L'activité nitrate réductase est donc un phénomène régulé. En fin de phase stationnaire, de l'azote ammoniacal (14 mg.l^{-1} de milieu) apparaît dans le milieu de culture.

Nous avons vu que la réduction de la concentration en nitrate du milieu ne modifie pas la vitesse de croissance et n'entraîne pas de stockage dans un pool non accessible à la réduction. Cette condition expérimentale présente donc un très grand intérêt pour étudier la régulation enzymatique. Or certaines suspensions cellulaires comme celles du Tabac (FILNER, 1966) de l'Erable (KING, 1976) ou du Soja (POLACCO, 1976) prolifèrent normalement en présence d'azote organique comme seule source azotée ce qui n'est pas le cas pour les cellules de Silène (DUBOIS, 1980), encore que nous ayons mené à terme des cultures de Silène en présence de glutamine, comme source unique d'azote (BRASSART et al., 1984). Enfin, l'addition d'acides aminés à un milieu renfermant du nitrate peut stimuler la croissance de certaines cellules sans modifier l'activité nitrate réductase (BEHREND et METELES, 1975) alors que l'addition d'ammonium augmente et la croissance et l'activité de réduction de cellules de Rose (BAYLEY et al., 1972 ; MOHANTY et FLETCHER, 1976) ou au contraire inhibe la nitrate réductase (JORDAN et FLETCHER, 1980 ; RAMBOUR et al., 1983).

3) Action de l'ammonium sur l'activité nitrate réductase.

Lorsque le milieu de culture contient 75 mg l^{-1} d'azote nitrique (NO_3^- , 5 mM), la présence d'ammonium 2 mM inhibe la croissance cellulaire d'environ 25 % et modifie le profil de l'activité nitrate réductase au cours d'un cycle de croissance : l'activité maximale après 2 j est en effet diminuée d'environ 15 % mais elle se prolonge jusqu'au 7ème jour (figure 11). L'ammonium est utilisé plus rapidement que le nitrate dont il ralentit l'absorption. En effet le milieu de culture ne

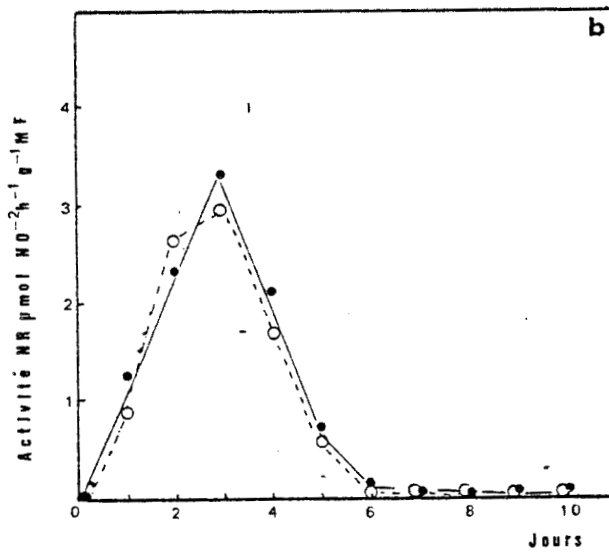
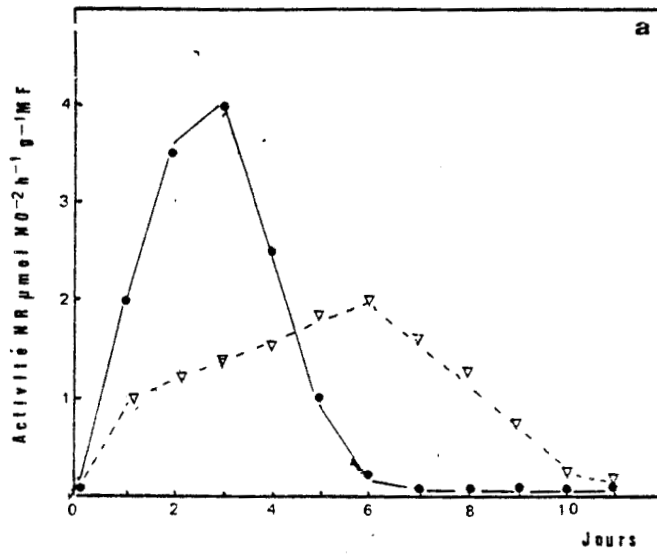


Figure 12 : Evolution des activités nitrate réductase de cellules de Silène cultivées sur du NO_3^- (●—●) ou du NO_3NH_4 (▽---▽). L'activité est mesurée in vivo (a) ou in vitro (b)

renferme plus de NH_4^+ dès le 4ème jour de culture, alors qu'il contient encore 50 % de la teneur initiale en nitrate après 5 jours. Dans le cas d'une nutrition nitrique stricte (NO_3^- seul dans le milieu) ce taux de 50 % est atteint dès le 3ème jour de culture.

Les cellules de Silène sont donc susceptibles d'utiliser à la fois NH_4^+ et NO_3^- , mais le premier est consommé plus rapidement que le second et la diminution de l'activité nitrate réductase pourrait être la conséquence du ralentissement de l'absorption de NO_3^- .

4) Activité nitrate réductase de cellules cultivées en présence de nitrate d'ammonium.

Les cellules cultivées en présence de nitrate d'ammonium ont une croissance identique à celle de cellules poussant en présence de nitrate seul.

Alors que l'activité nitrate réductase maximale s'observe habituellement vers le 2ème ou le 3ème jour, elle se situe vers le 6ème jour quand les cellules croissent dans une solution de nitrate d'ammonium. Par ailleurs, le profil d'activité est plus étalé dans le temps et le maximum d'activité est plus faible (figure 12 a) quand les mesures sont menées *in vivo*. La mesure de l'activité *in vitro* montre cependant des profils identiques, que les cellules soient cultivées avec NO_3^- ou $\text{NO}_3^- \text{NH}_4^+$ (figure 12 b) même si les activités sont souvent légèrement plus faibles dans ce dernier cas.

L'examen de l'évolution de la teneur en nitrate et en ammonium du milieu, révèle que NH_4^+ disparaît rapidement alors que le NO_3^- décroît très lentement. Cependant de l'ammonium réapparaît dans le milieu dès le début de la phase stationnaire. Quant aux cellules, elles accumulent du NH_4^+ au premier jour de la culture mais il est ensuite très rapidement

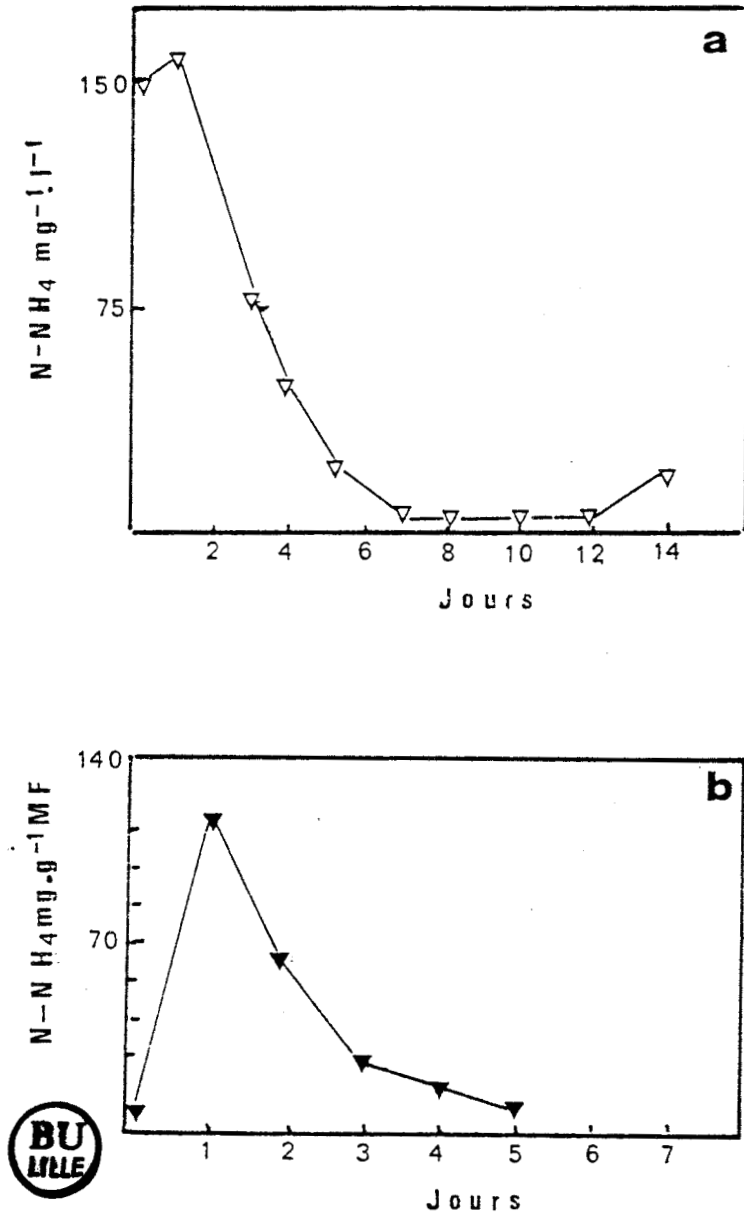


Figure 13 : Evolution de la teneur en azote ammoniacal
 a) du milieu de culture lorsque les cellules sont cultivées en présence de $\text{NO}_3 \text{NH}_4$
 b) de cellules cultivées avec $\text{NO}_3 \text{NH}_4$.

métabolisé. Le nitrate est également absorbé et accumulé dans les cellules dès le premier jour, mais en quantité nettement moindre qu'en présence de NO_3^- comme unique source azotée; il est ensuite métabolisé puis stocké en fin de phase stationnaire (figure 13).

- 5) Activité nitrate réductase de cellules de Silène cultivées en présence d'ammonium comme source unique d'azote.

La culture de cellules de Silène est impossible en milieu ammoniacal non tamponné (BRASSART et al., 1978). En effet l'absorption de l'ammonium par la cellule déclenche immédiatement une sortie de protons dans le milieu externe qui s'acidifie et empêche toute croissance cellulaire. L'addition de MES 50 mM permet une croissance normale pendant 7 jours (figure 14). Ensuite le pouvoir tampon est affaibli et le milieu devient acide.

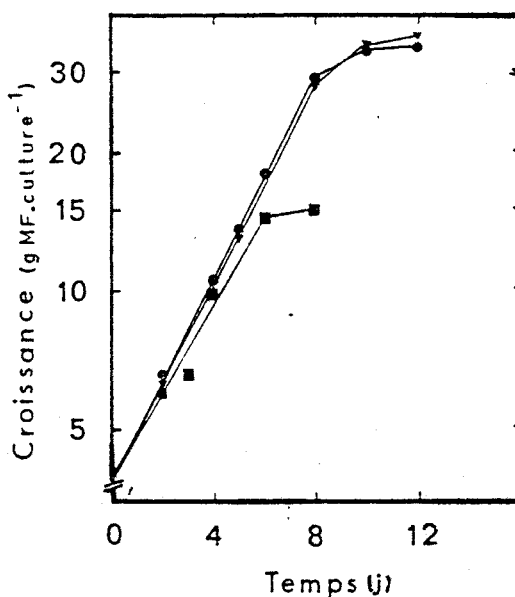


Figure 14 : Croissance des cellules de *Silene alba* sur différentes sources azotées (●), Nitrate ; (▲), glutamine ; (■), ammonium.

En présence d'ammonium seul, l'activité nitrate réductase est toujours nulle. L'ion NH_4^+ est rapidement absorbé pendant la 1ère journée, puis il disparaît ensuite plus lentement. Les cellules accumulent de l'ammonium en tout début de culture ; puis il est rapidement métabolisé. Si des

Tableau 6

Evolution des teneurs en NH_4^+ du milieu nutritif et de cellules cultivées en présence d'ammonium seul (20 mM).

Durée de la culture en j.	0	1	3	4	5
NH_4^+ en $\mu\text{moles g}^{-1}$ de M.F.	traces	11,6	6,2	2,5	3,5
NH_4^+ du milieu en moles l ⁻¹	21	19	15,6	13,5	11,7

cellules sont prélevées à un moment quelconque du cycle de croissance et transférées dans un milieu ne contenant que du NO_3^- , l'activité nitrate réductase réapparaît après une phase de latence d'environ 12 heures et atteint un maximum 48 h après le transfert.

L'ammonium inhibe donc l'activité nitrate réductase partiellement en présence de NO_3^- et totalement en son absence.

Nous avons alors étudié l'action de NH_4^+ sur l'activité nitrate réductase pendant des périodes plus courtes.

Les cellules sont cultivées pendant 19 heures dans un milieu ne contenant que du nitrate, puis elles sont transférées dans un milieu tamponné ne contenant que de l'ammonium. L'activité nitrate réductase diminue alors très rapidement mais de façon transitoire. Le résultat est identique quand une solution tamponnée de NH_4^+ est ajoutée aseptiquement au milieu de culture (figure 15).

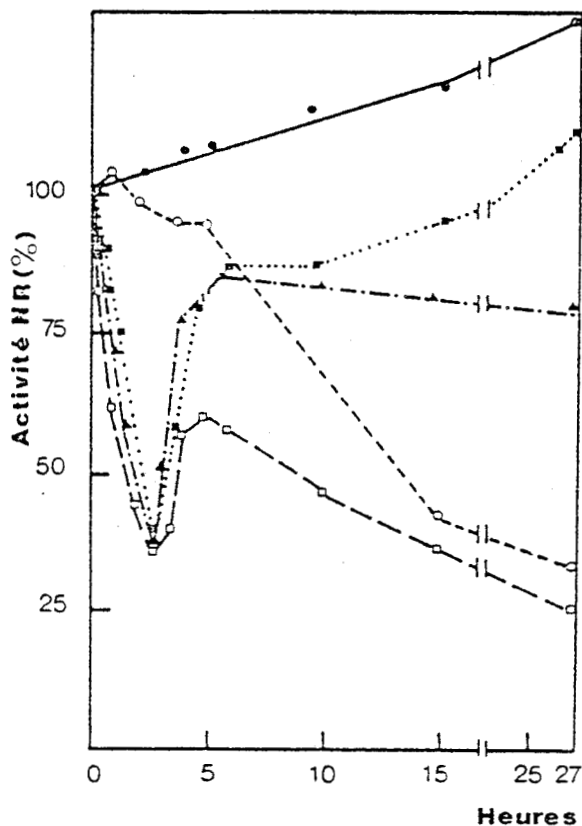


Figure 15 : Action de NH_4^+ (5mM) de la 6-méthylpurine ($2,5 \mu\text{g}.\text{mI}^{-1}$) et de la cycloheximide ($2 \mu\text{g}.\text{mI}^{-1}$) sur l'activité de la nitrate réductase préalablement induite par le nitrate. Activités mesurées in vivo en présence de NO_3^- (●) ; de NH_4^+ (■) ; de NH_4^+ + cycloheximide (□) ; de cycloheximide seule (○) ; de NH_4^+ + 6-méthylpurine (▲).

Lorsque l'activité est diminuée de 50 %, les cellules sont prélevées, congelées et broyées ; la nitrate réductase est extraite en présence de leupeptine 10 μM et son activité est mesurée *in vitro*, après 30 min. d'incubation en présence de NO_3^- et de NH_4^+ 5mM. Dans ces conditions, l'activité enzymatique a la même valeur que celle mesurée dans une culture témoin, à laquelle il n'a pas été ajouté d'ammonium.

L'inhibition passagère et rapide de la nitrate réductase peut avoir deux causes. Ou bien l'ammonium est métabolisé préférentiellement au nitrate parce que son absorption est plus rapide, ou bien il exerce une inhibition allostérique sur la nitrate réductase.

Cette dernière éventualité exige une analyse *in vitro* de l'activité nitrate réductase. Les cellules sont donc cultivées pendant 48 heures en présence de NO_3^- , puis l'enzyme est extraite à 4° C en présence de leupeptine 10 μM . L'activité est ensuite mesurée après une incubation de 30 min. à 30° C soit en présence de nitrate seul, de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ 5 mM, de $\text{NO}_3^- +$ de l'acide glutamique 5 mM ou encore de $\text{NO}_3^- +$ glutamine 5 mM. Les résultats reportés dans le tableau 6 montrent que l'ammonium, l'acide glutamique ou la glutamine n'exercent aucune inhibition sur l'activité nitrate réductase.

Enfin l'enzyme a été préincubée pendant 40 min. avec les différents effecteurs à 4°, 15° ou 25° C ; l'activité enzymatique diminue d'autant plus que la température de préincubation a été élevée ; par ailleurs l'ammonium, l'acide glutamique ou la glutamine stabilisent l'enzyme à 15° C (tableau 7).

Tableau 7 : Action de l'ammonium (NH_4^+) de l'acide glutamique (ac. glut.) et de la glutamine (Gln) sur l'activité nitrate réductase (pourcentage) mesurée *in vitro*.

Conditions de préincubation	t = 0 min, 4°C	t = 40 min		
		4°C	15°C	25°C
Témoin	100 ^a	96	71	55
+ NH_4^+	108	100	87	65
+ ac. glut.	112	110	100	57
+ Gln	118	106	103	58

^aCent pourcent d'activité correspondent à la formation de 0,155 μmol de $\text{NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéine.

L'ammonium, pas plus que la glutamine ou l'acide glutamique n'exerce d'inhibition allostérique sur la nitrate réductase, son action s'exercerait essentiellement sur l'absorption du nitrate.

Il était par ailleurs nécessaire de vérifier que son action inhibitrice ne s'effectue ni au niveau de la traduction, ni de la transcription. De la cycloheximide ou de la 6-méthylpurine, ont donc été introduites soit en présence d'ammonium, soit seules (figure 15). L'addition de cycloheximide à la 19^{ème} h provoque une inhibition d'environ 66 %; 27 h plus tard, alors que pour une durée de contact identique la 6-méthylpurine ne provoque qu'une inhibition de 20 %. Enfin l'addition simultanée de 6 méthylpurine ou de cycloheximide et de NH_4^+ ne modifie pas l'inhibition due à l'ammonium. L'activité a toujours tendance à revenir à son niveau initial, mais la cycloheximide ou la 6-méthylpurine exercent ensuite leur action inhibitrice propre.

L'inhibition de l'activité nitrate réductase par NH_4^+ ne s'exerce donc ni au niveau de la transcription, ni de la traduction.

- 6) Activités de la glutamine synthétase et de la glutamate déshydrogénase de cellules de Silène cultivées en présence de diverses sources azotées.

Comme dans les conditions habituelles de culture la nitrate réductase n'est active que durant la première moitié d'un cycle de culture et que le nitrate stocké en fin de culture ne représente qu'un faible pourcentage du nitrate initial, nous avons été amenés à nous intéresser à l'évolution d'enzymes qui catalysent le métabolisme de l'ammonium. Nous avons retenu la glutamine synthétase (GS) et la glutamate déshydrogénase (GDH) parce qu'elles contrôlent deux voies possibles mais distinctes de l'utilisation du NH_4^+ .

L'activité de la GDH varie peu au cours d'un cycle de culture lorsque le nutriment azoté est du nitrate ; elle augmente légèrement au 2ème jour de culture, puis diminue lentement et remonte en phase stationnaire (figure 16). Quant à la glutamine synthétase, son activité est multipliée par trois dès le début de la culture puis elle décroît légèrement et chute en fin de phase stationnaire (figure 17).

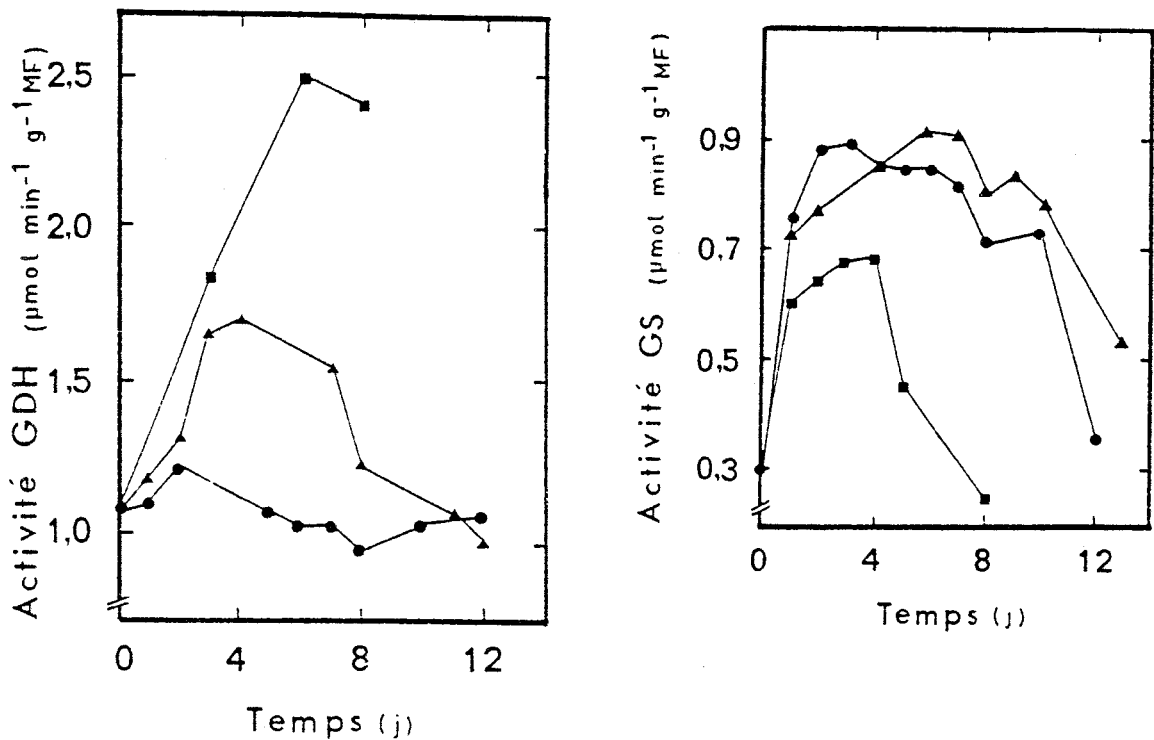


Figure 16 : Variations de l'activité GDH des cellules de *Silene alba* au cours de la croissance, en présence de différentes sources azotées : (●—●) nitrate ; (▲—▲) glutamine ; (■—■) ammonium.

Figure 17 : Variations de l'activité GS de cellules de *Silene alba* au cours de la croissance, en présence de différentes sources azotées : (●—●) nitrate ; (▲—▲) glutamine ; ammonium (■—■).

Bien que la GDH soit légèrement plus active, les deux systèmes enzymatiques transforment sensiblement la même quantité d'ammonium. Au 3ème jour de culture, la GDH et la GS transforment environ 2 μmoles de NH_4^+ par heure et par gramme de matière fraîche, ce qui correspond assez bien aux 1,5 à 2 μmoles de nitrate réduit par la nitrate réductase au même moment. Au 9ème jour la GDH et la GS utilisent approximativement 1,65 μmoles de NH_4^+ alors que l'activité nitrate réductase n'est plus mesurable. Bien que présentant des profils d'activité très dissemblables, ces deux enzymes fonctionnent pendant toute la durée de la culture et diffèrent donc de la nitrate réductase.

On pouvait alors se demander si les activités GS et GDH mesurées globalement correspondaient à une ou plusieurs isoenzymes. Une chromatographie sur DEAE cellulose a été réalisée en utilisant un gradient discontinu de NaCl de 0 à 0,5 M. L'activité GS se retrouve dans une seule fraction qui a été éluée par du NaCl 0,15 M (figure 18). L'activité

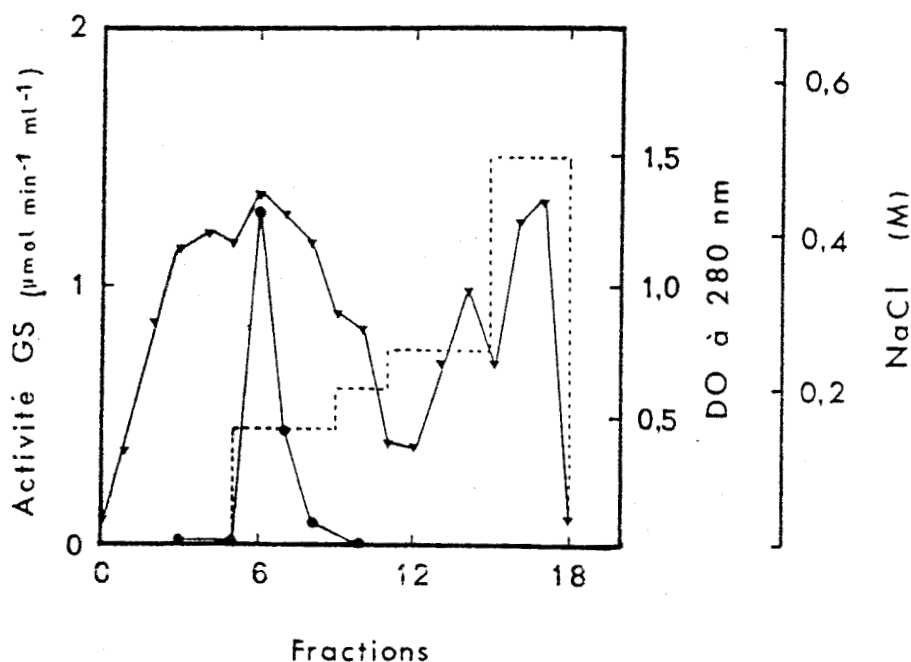


Figure 18 : Chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose d'un extrait de cellules de *Silene alba*. Elution par un gradient discontinu en NaCl (tirets). L'activité GS (●) est déterminée sur 1 ml d'éluat des différentes fractions. La densité optique des fractions (▼) est lue à 280 nm.

globale est donc le fait d'une seule isoforme de la GS qui de par sa position sur l'éluotogramme serait d'origine cytoplasmique.

L'analyse électrophorétique montre que la GDH est représentée par trois isoenzymes. L'une est très active et présente pendant toute la durée de la culture ; les deux autres nettement moins actives varient selon le stade de croissance des cellules (figure 19). La bande majeure est colorable par le bleu de Coomassie alors que les deux bandes mineures ne le sont pas. Lorsque la source azotée est la glutamine, la croissance est normale si le milieu est tamponné et le profil de l'activité GS ressemble beaucoup à celui observé en présence de nitrate. La GDH se trouve par contre représentée par 2 ou 3 isoformes. Le zymogramme varie en effet au cours de la culture ; au 3ème jour, seules deux isoenzymes sont détectables, alors qu'au 7ème jour il en apparaît une troisième. La modification concerne une bande mineure (figure 19).

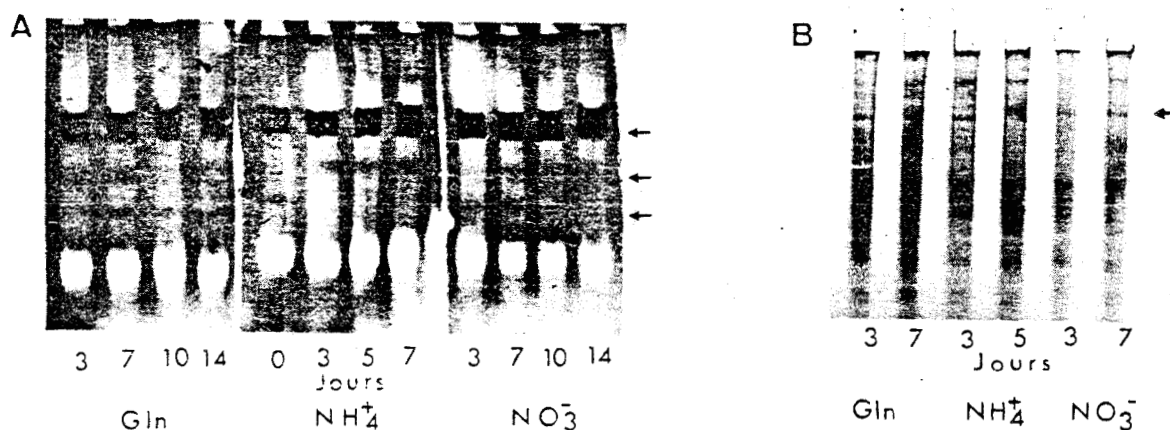


Figure 19 : Électrophorèse en gel de polyacrylamide d'extraits totaux obtenus à partir de cellules de *Silene alba* prélevées à différents stades de croissance et en présence de diverses sources d'azote. A, Mise en évidence de l'activité GDH par les sels de tétrazolium d'extraits issus de cellules cultivées en présence de glutamine (Gln), d'ammonium (NH_4^+) ou de nitrate (NO_3^-). Les flèches indiquent la position des bandes d'activité. B, Mise en évidence des protéines par le bleu de Coomassie. La flèche indique l'emplacement de la bande qui présente le maximum d'activité GDH. Les abréviations J₃, J₅ et J₇ signifient que les cellules ont été prélevées après 3, 5 ou 7 jours de culture.

Lorsque le milieu ne contient que de l'ammonium l'activité est localisée dans deux bandes : l'une très importante, présente quelle que soit la source azotée, l'autre faiblement active, mais constante pendant toute la durée de la culture. L'activité GS quant à elle, est toujours plus faible qu'en présence de nitrate ou de glutamine (figure 17).

La GS est constamment représentée par une seule isoenzyme alors que la GDH subit des modifications de sa composition isoenzymatique selon les conditions de culture ; la bande majeure est toujours présente quelle que soit la source azotée utilisée, mais les bandes mineures varient, d'une part avec l'âge des cultures, et d'autre part en fonction de la nature de l'azote fourni.

Comme l'ammonium joue, de toute évidence, un rôle important sur l'absorption du NO_3^- , nous avons voulu voir quelle action pouvaient exercer des inhibiteurs de la GS ou de la glutamate synthase (GOGAT) sur les activités nitrate réductase, glutamate deshydrogénase et glutamine synthétase.

- 7) Action de l'azaserine et de la méthionine sulfoximine sur les activités nitrate réductase, glutamate, deshydrogénase et glutamine synthétase.

L'azaserine inhibe l'activité de la glutamate synthase (GOGAT), la méthionine sulfoximine (MSX) celle de la glutamine synthétase. Nous avons voulu voir si l'inhibition de ces enzymes influait sur l'activité nitrate réductase par un mécanisme de régulation en retour.

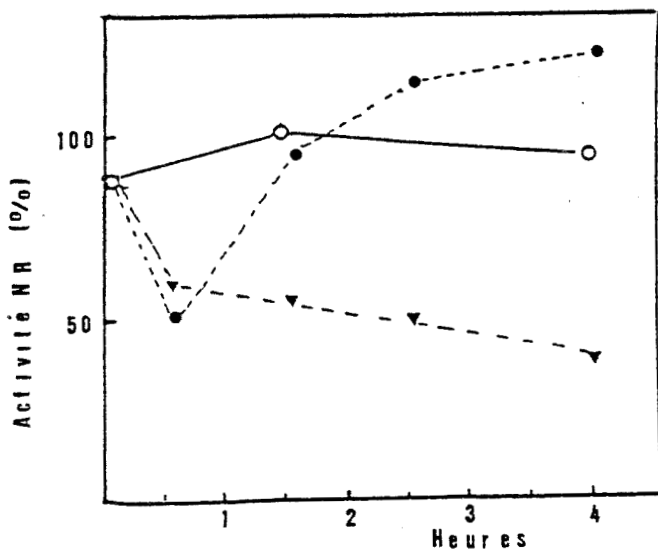


Figure 20 : Activité N.R. mesurée in vivo de cellules cultivées en présence de NO_3^- 5 mM (○-○), de NO_3^- + azaserine 5 mM (▼-▼) ou de NO_3^- + MSX 5 mM (●-●). 100 % d'activité ; $3,7 \mu\text{moles NO}_2^-.h^{-1}.g^{-1}$ MF.

BU
LILLE

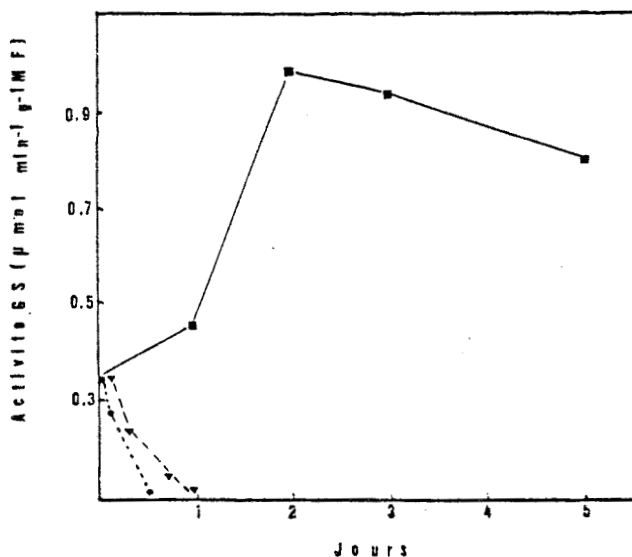


Figure 21 : Activité de la GS de cellules cultivées avec du NO_3^- (■-■) et en présence de MSX 0,1 mM (●-●) ou d'azaserine 0,1 mM (▼-▼). (Protocole expérimental décrit dans le texte).

a - Activité nitrate réductase de cellules de *Silène* cultivées en présence d'azaserine ou de MSX.

L'addition d'azaserine à un milieu de culture dans lequel se développent depuis 2 jours des cellules de *Silène* provoque une chute rapide de l'activité nitrate réductase qui décroît ensuite plus lentement et s'annule après 24 heures.

Quant à la MSX, son action rappelle l'inhibition exercée par l'ammonium : l'activité diminue brutalement 30 minutes après son introduction puis elle remonte, pour atteindre des valeurs égales ou parfois supérieures à celles mesurées dans des cellules témoins (figure 20) ; puis l'activité décroît et n'est plus décelable après 3 ou 4 jours de culture.

Le blocage de l'activité de la GS amène sans doute une accumulation d'ammonium qui pourrait être métabolisé par la GDH, à moins que la MSX n'intervienne sur le système de perméation du nitrate (RIGANO et al., 1982). Pour choisir parmi ces hypothèses, nous avons mesuré les teneurs en nitrate et en ammonium intra- et extracellulaires, ainsi que l'évolution des activités GS et GDH.

Des essais préliminaires nous avaient montré que la MSX inhibait bien l'activité GS, mais ne modifiait pas de façon significative l'activité GDH dans les heures qui suivent son introduction. Aussi avons nous modifié notre protocole expérimental : les cellules, prélevées en phase stationnaire, sont cultivées 48 heures dans un milieu sans azote de façon à permettre la métabolisation du nitrate stocké ; puis sont ajoutés, dans l'ordre et à 1 heure d'intervalle, l'inhibiteur et l'azote nitrique ou ammoniacal.

Cette approche présente l'avantage de permettre l'analyse de l'action de la MSX ou de l'azaserine sur la perméation de l'ion et sur les activités enzymatiques.

b - Influence de l'azaserine et de la MSX sur les activités NR, GDH et GS de cellules cultivées avec du NO_3^- .

La fourniture de nitrate à des cellules carencées en azote pendant 2 jours, provoque, 3 heures plus tard, l'apparition d'une activité nitrate réductase qui augmente progressivement jusqu'à la 48ème heure.

Une préincubation avec de l'azaserine (0,1 mM) ou de la MSX (0,1 Mm), diminue l'ampleur de l'activité de réduction. L'azaserine exerce une action beaucoup plus sévère et plus rapide que la MSX (tableau 8).

Tableau 8

Action de l'azaserine et de la MSX sur l'activité NR mesurée *in vivo*.

contact avec NO_3^- (20 mM) en h.	Activité N.R. $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ M.F.		
	Témoin	MSX	Azaserine
3	0,113	0,044	0,010
24	0,521	0,192	0
48	0,622	0,118	0

L'azaserine ne modifie pas l'activité GS pendant les 3 premières heures mais la fait chuter brutalement ensuite (figure 21) ; elle augmente par contre l'activité GDH après 24 heures (figure 22) ; du nitrate est détectable dans les cellules ($2 \mu\text{moles} \cdot \text{g}^{-1}$ MF à 10 h.; $3,5 \mu\text{moles} \cdot \text{g}^{-1}$ MF à 24 h.) et de l'ammonium apparaît dans le milieu ($15 \text{ mg N-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1}$ à 24 h.). Au delà de 24 heures, les mesures sont inutiles puisque de nombreuses cellules meurent.

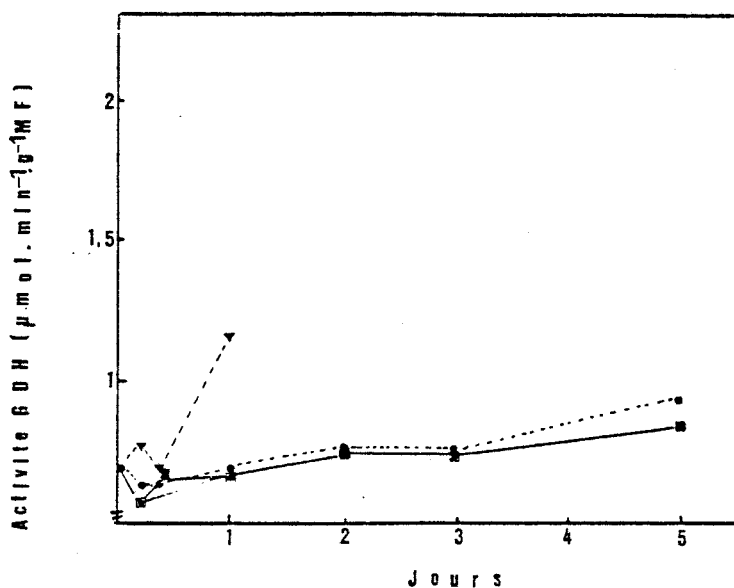


Figure 22 : Action de la MSX, 0,1 mM (●...●) et de l'azaserine 0,1 mM (▼--▼) sur l'activité GDH de cellules de Silène cultivées en présence de nitrate 20 mM. Témoin (■—■)

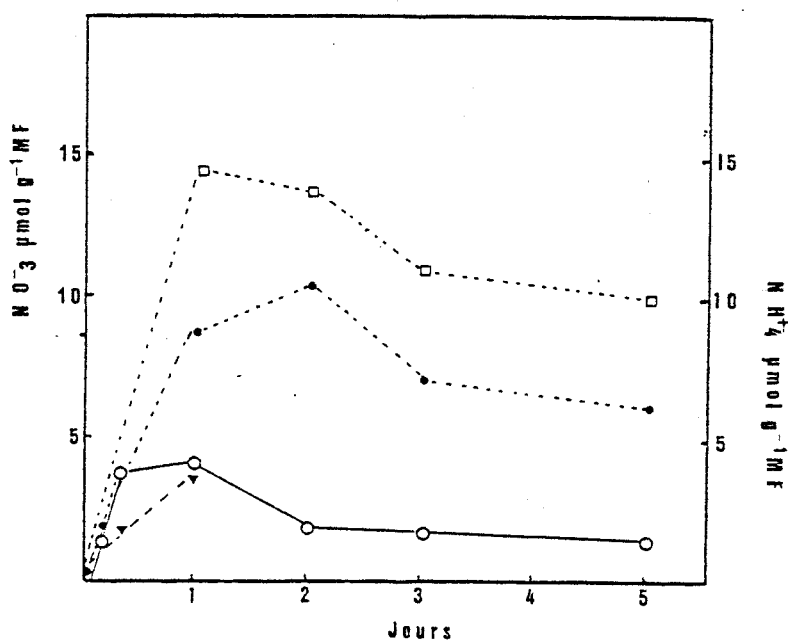


Figure 23 : Teneur en NO_3^- de cellules cultivées en présence de :

- NO_3^- 20 mM comme unique source d'azote (○—○)
- NO_3^- + MSX 0,1 mM (□---□)
- de NO_3^- + azaserine 0,1 mM (▼--▼).

Teneur en NH_4^+ de cellules cultivées en présence de NO_3^- 20 mM + MSX 0,1 mM (●-...-●).



La GOGAT est donc une enzyme essentielle du métabolisme azoté et indispensable au maintien de la vie cellulaire.

La MSX inactive rapidement la GS mais ne modifie l'activité de la GDH qu'après 5 jours (figures 21 et 22). Le nitrate prélevé (figure 24) est réduit ou stocké dans les cellules (figure 23). De l'ammonium est accumulé dans les cellules (figure 23) ou rejeté dans le milieu (figure 24).

La GS est une enzyme clé dans le métabolisme de l'azote. Comparée à celle de la GOGAT, son inhibition est cependant moins dramatique pour la survie immédiate des cellules qui ne meurent qu'après 4 à 5 jours.

c - Action de l'azaserine et de la MSX sur les activités GS et GDH de cellules cultivées en présence de NH_4^+ (20 mM).

Rappelons d'abord que l'activité NR n'est détectable ni *in vitro*, ni *in vivo* dans ces conditions de culture.

L'ammonium est utilisé à la fois par la GS et la GDH mais celle-ci est nettement plus active que la première qui est partiellement inhibée. L'ammonium disparaît du milieu (figure 25) et s'accumule dans les cellules pendant les toutes premières heures puis il est métabolisé d'autant plus rapidement, que l'activité GDH s'accroît (figures 26 et 27).

En présence d'azaserine la teneur en NH_4^+ du milieu n'est pas modifiée alors que celle des cellules augmente rapidement ; quant à l'activité GDH, elle diminue rapidement (figure 27). ; celle de la GS est nulle.

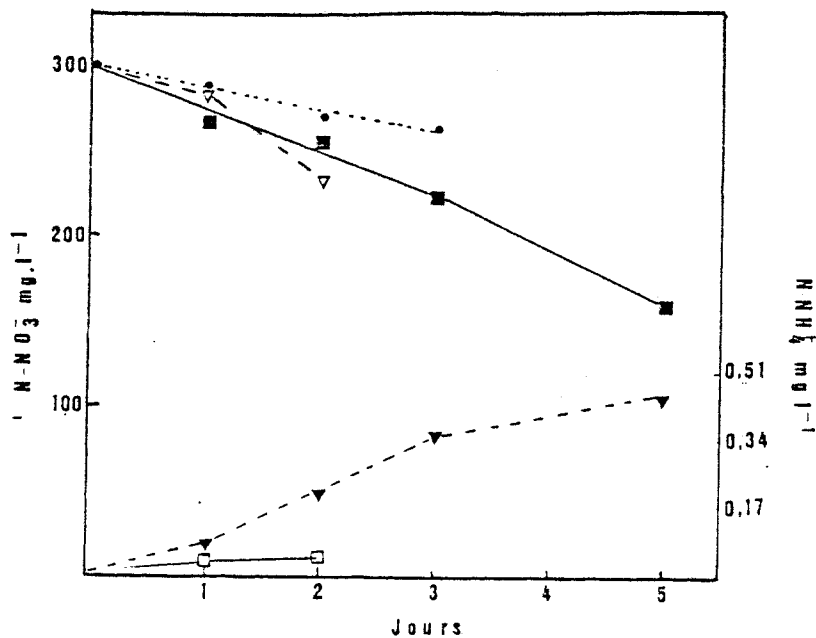


Figure 24 : Variations de la concentration en azote nitrique du milieu de culture.

Les cellules sont cultivées en présence de NO_3^- seul (■—■) ; de NO_3^- + MSX 0,1 mM (●---●) ; de NO_3^- + azaserine 0,1 mM (▽--▽).

Ammonium formé dans le milieu en présence de NO_3^- + MSX 0,1 mM (▼--▼) ou de NO_3^- + azaserine 0,1 mM (□—□).

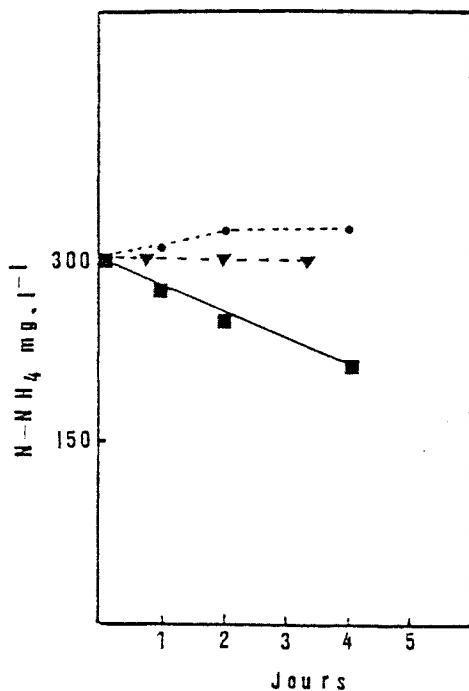


Figure 25 : Variations de la concentration en NH_4^+ du milieu de culture.

Les cellules sont cultivées en présence de NH_4^+ seul (■—■) ; de NH_4^+ + MSX 0,1 mM (●---●) ; de NH_4^+ + azaserine 0,1 mM (▽--▽).

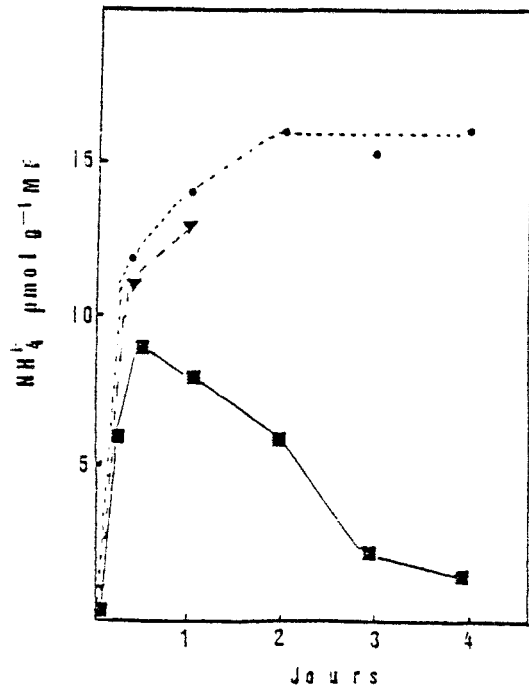


Figure 26 : Evolution de la teneur en NH_4^+ de cellules cultivées en présence de NH_4^+ (\blacksquare - \blacksquare) ; de NH_4^+ + MSK 0,1 mM (\bullet - \bullet) ; de NH_4^+ + azaserine 0,1 mM (\blacktriangledown - \blacktriangledown) .

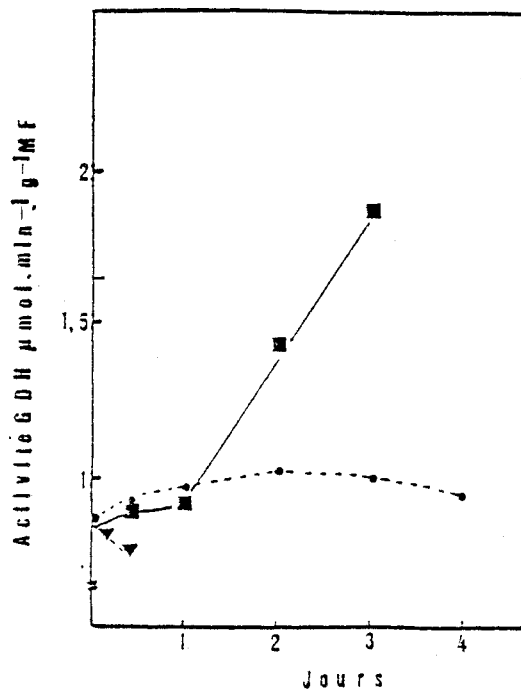


Figure 27 : Activité GDH de cellules cultivées en présence de NH_4^+ (\blacksquare - \blacksquare) ; de NH_4^+ + MSK x 0,1 mM (\bullet - \bullet) ; de NH_4^+ + azaserine 0,1 mM (\blacktriangledown - \blacktriangledown) .

La MSX provoque une accumulation intracellulaire d'ammonium (figure 26) dont une partie pourrait être rejetée dans le milieu : on y observe en effet, un léger accroissement de la concentration en NH_4^+ (figure 25).

L'activité de la GDH est par ailleurs inhibée à partir du 2ème jour (figure 27). On comprend donc pourquoi, dans de telles conditions, les cellules périssent après 4 ou 5 jours.

Les résultats obtenus en présence de nitrate ou d'ammonium montrent que les inhibiteurs de la GOGAT ou de la GS n'interviennent ni sur la perméation du nitrate, ni sur les mouvements de l'ammonium. Les modifications de l'activité nitrate réductase sont imputables à une régulation métabolique par l'ammonium qui agit sur l'enzyme *in vivo*. Or, nous avons vu que le NH_4^+ ne se comporte pas comme effecteur négatif de la nitrate réductase *in vitro*. Il est par ailleurs peu probable que les propriétés catalytiques de l'enzyme soient radicalement différentes *in situ* ou en tube. On peut donc penser que la cellule dépense, soit pour expulser de l'ammonium, soit pour réguler son pH, de l'énergie qui n'est pas disponible pour l'assimilation du nitrate. L'une des enzymes particulièrement sensible aux modifications de la charge énergétique est la GS (WEISSMAN, 1976).

II - REGULATION GENETIQUE

1) Induction de la nitrate réductase des cellules de *Silène*

Le transfert de cellules de *Silène* dans un milieu neuf ne provoque l'apparition d'une activité nitrate réductase qu'après une phase de latence d'une dizaine d'heures. Des cellules prélevées pendant la phase stationnaire, puis mises dans du milieu dépourvu en nitrate sont capables de croître faiblement (12 % environ de la croissance d'une culture effectuée sur le milieu complet). Mais l'activité de la nitrate réductase n'est alors détectable ni par la méthode *in vivo*,

ni par la méthode *in vitro*. L'addition de NO_3^- (5 mM) après 18 ou 46 heures de culture entraîne l'apparition, en quelques heures, d'une activité de réduction du nitrate ; comme les pentes des courbes d'activités sont sensiblement parallèles (figure 28) la vitesse de l'induction est indépendante du moment auquel le nitrate est ajouté.

Ces observations plaident en faveur d'une induction de la nitrate réductase par son substrat, hypothèse largement développée dans la littérature et très généralement admise par la plupart des auteurs (voir le chapitre Historique). Nous avons donc abordé l'étude de la régulation génétique de l'enzyme dans des conditions expérimentales qui excluaient le plus possible l'intervention de phénomènes de régulation métabolique. Les cellules ont donc été cultivées dans un milieu ne contenant que 25 % de la concentration habituelle en nitrate ; dans ces conditions, celui-ci n'est pas en excès et ne s'accumule pas dans la vacuole et le profil de l'activité nitrate réductase suit de très près son utilisation.

Nous avons observé les modifications de l'activité nitrate réductase en introduisant, dans le milieu de culture, des inhibiteurs de la transcription comme la 6-méthylpurine ou de la traduction tels le chloramphénicol (chlor) ou la cycloheximide (CHI).

Les cellules sont transférées dans un milieu neuf contenant l'une de ces substances et l'activité est mesurée 24 h. plus tard. La figure 29 permet de voir que le chloramphénicol ne la modifie que très peu, tandis que la 6-méthylpurine est inhibitrice pour toutes les concentrations utilisées et que la cycloheximide l'est pour une dose de $4 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

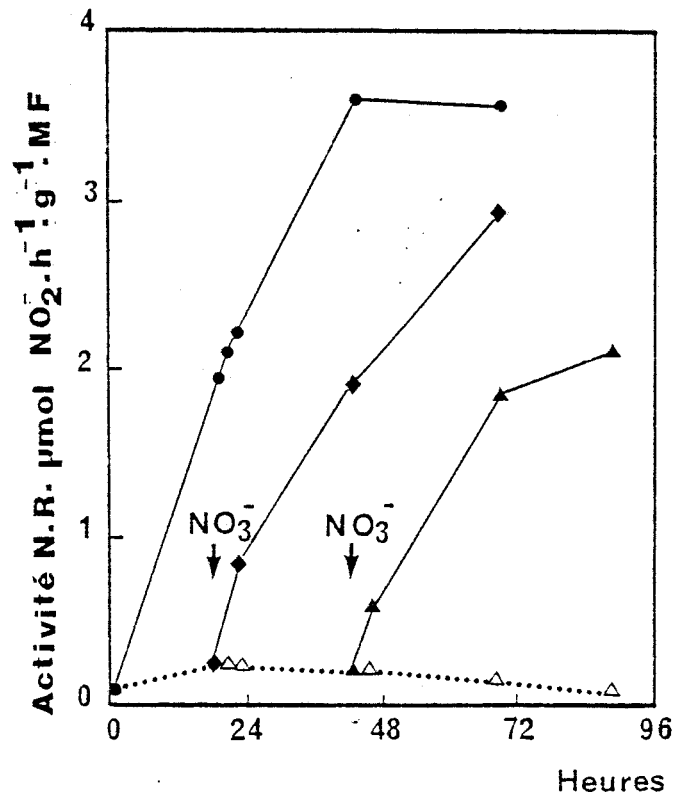


Figure 28 : Action de l'azote nitrique sur l'activité nitrate réductase. L'apport en nitrate s'effectue soit dès le début de la culture (●—●), soit après 19 h. (◆—◆) ou 46 h. (▲—▲) de culture. (Δ·····Δ) le milieu de culture est carencé en azote. L'activité de la nitrate réductase est mesurée in vivo.

Ces résultats suggèrent que l'apparition de l'activité nitrate réductase nécessite la transcription préalable d'ARN et que la synthèse enzymatique est essentiellement localisée dans le cytoplasme.

Pour la suite de ce travail, nous avons retenu la 6-méthyl-purine ($2,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et la cycloheximide ($4 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Nous avons d'autre part vérifié que des cellules traitées pendant 48 h. par l'une de ces deux substances, sont susceptibles de reprendre une prolifération normale lorsqu'elles sont remises sur un milieu témoin.

Comme il a été montré que la cycloheximide n'est pas un inhibiteur spécifique de la synthèse protéique *in vivo* (Mc MAHON, 1975) et que ses effets varient selon la concentration à laquelle elle est employée (DELSENY et al., 1977), nous avons voulu savoir si dans nos conditions expérimentales, elle était inhibitrice de la synthèse protéique. Nous l'avons donc introduite dans le milieu dès le transfert des cellules et nous avons procédé à un marquage des protéines synthétisées lors des 24 premières heures de la culture en fournissant pendant 1 h., à intervalles réguliers, de la leucine tritiée ($2,5 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$). Les cellules sont ensuite recueillies, lavées, broyées, et traitées par une solution à 5 % d'acide trichloracétique à 4° C pendant une nuit. La radioactivité des fractions acidosolubles et acidoprécipitables est mesurée. Les résultats sont reportés dans le tableau 9.

Dans une culture témoin, l'absorption de la ^3H -leucine et son incorporation dans la fraction protéique acidoprécipitable s'effectuent rapidement après le transfert des cellules.

Le traitement des cellules par la cycloheximide provoque toujours un accroissement de la radioactivité intracellulaire et une inhibition de l'incorporation de la leucine dans la fraction précipitée par l'acide. L'absorption de la leucine marquée par les cellules traitées est donc modifiée et multipliée par un facteur voisin de 2, quelle que soit l'heure du prélèvement.

Tableau 9
Incorporation de la L-leucine ^3H (G-150 mCi/mole) dans les protéines

Heure du prélèvement	6 h		12 h		18 h		24 h	
	Témoin	CHI	Témoin	CHI	Témoin	CHI	Témoin	CHI
Fraction précipitable (f_1).....	11 407	1 350	6 725	1 470	2 930	1 094	2 900	2 200
Fraction acidosoluble (f_2).....	71 260	144 346	60 875	134 910	58 747	117 142	30 690	73 000
Radioactivité totale ($f_1 + f_2$)..	82 667	145 696	67 600	136 380	61 677	118 236	33 590	75 200
$f_1/(f_1 + f_2) \times 100$	13,8	0,92	9,94	1,07	4,75	0,92	8,63	2,92

La radioactivité déterminée en présence de liquide scintillant "Aqualuma" et exprimée en coups par minute par milligramme de protéines est mesurée aux temps indiqués, la leucine ayant été ajoutée 1 h. auparavant.

Le dosage des protéines s'effectue selon la méthode de LOWRY et al.. La signification du rapport ($f_1/f_1 + f_2$) est donnée dans le texte.

Par conséquent, il nous a paru indispensable de rendre compte de cette modification de l'absorption de la leucine marquée dans l'estimation des variations de la synthèse protéique. Le calcul du rapport : radioactivité incorporée / radioactivité totale (quantité de coups par minute incorporés + quantité de coups par minute de la fraction acidosoluble) permet de relier le marquage de la fraction protéique à la fréquence du marquage du pool métabolique lors de la synthèse, quelles que soient les conditions expérimentales (SACHER, 1967).

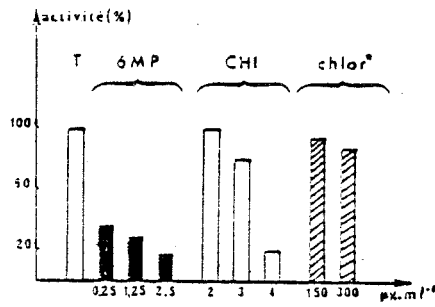


Fig. 29

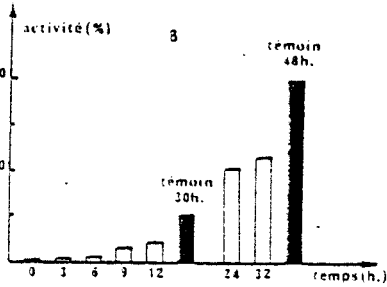
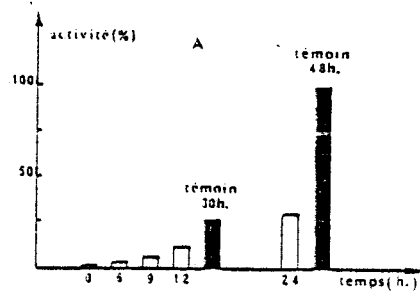


Fig. 30

Figure 29 : Action de divers inhibiteurs sur l'activité NR
 Les inhibiteurs sont ajoutés dès le début de la culture, les activités sont mesurées après 24 h. Une activité de 100 % correspond à la formation de $0,82 \mu\text{M}$ de $\text{NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de matière fraîche. T, témoin ; 6 MP, 6 méthyl-purine ; CHI, cycloheximide ; Chlor : chloramphénicol. * Comme la lumière peut dégrader le chloramphénicol (HOXMARK et NORDBY, 1977), toute l'expérimentation a été menée à l'obscurité qui ne modifie ni la croissance, ni l'activité NR des cellules (POULLE, 1979).

Figure 30 : Action séquentielle de la cycloheximide (A) et de la méthyl-purine (B) sur l'activité NR des cellules de Silene. Lorsque la cycloheximide ou la 6 méthyl-purine sont introduites après 0,3, 6 ou 9 h. de culture, les activités NR sont mesurées à la 30e heure et comparées à celles de cultures âgées de 30 h. (témoin 30 h.). Lorsque ces substances ont été ajoutées après 24 ou 32 h., les activités sont mesurées après 48 h. de culture. Par convention, 100 % d'activité représentent la formation de $2,92 \mu\text{M}$ de $\text{NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de matière fraîche dans une culture âgée de 48 h. (témoin 48 h.).

La cycloheximide inhibe fortement la synthèse protéique pendant au moins 18 h., et son inhibition reste importante après 24 h.

Ayant montré d'une part, que la synthèse de la nitrate réductase est induite et d'autre part, que la cycloheximide inhibe à la fois la synthèse protéique et l'apparition de l'activité enzymatique, nous avons voulu déterminer à quel moment de la culture s'effectuaient la transcription et la traduction. Aussi, avons-nous étudié l'action de la 6-méthylpurine et celle de la cycloheximide sur l'activité nitrate réductase, en fonction du moment de leur introduction dans le milieu de culture.

On s'aperçoit (figure 30 A et B) que l'activité enzymatique est toujours diminuée mais qu'elle l'est d'autant moins que la drogue a été ajoutée plus tardivement et que les ARNm ainsi que le complexe protéique ont été synthétisés.

Ces résultats montrent que la transcription des gènes codant pour le complexe enzymatique intervient essentiellement après 6 h. de culture et que la traduction la suit immédiatement.

A la lumière des résultats précédents, il semble évident que le transfert des cellules sur un milieu neuf contenant du nitrate provoque l'induction de l'enzyme. Par ailleurs, les cellules de *Silène* présentent deux périodes de synthèse de l'ARN, l'une dès la 6e heure de culture, l'autre plus tardive, vers le 3e jour. D'autre part, l'étude de l'évolution des index mitotiques montre que les toutes premières divisions cellulaires sont partiellement synchrones.

On peut donc penser que parmi les ARN transcrits dès la 6e heure, et dont une partie, polyadénylée ou non, est vraisemblablement une fraction messagère, se trouvent des ARNm nitrate réductase.

L'induction du complexe nitrate réductase pourrait alors se situer parmi les premiers événements déclenchés par le transfert dans un nouveau milieu pourvu en nitrate.

2) Induction de la nitrate réductase du *Silène* et existence d'une inactivase.

Lors d'une étude de l'induction de la nitrate réductase d'explants racinaires de la Chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus*, var. Witloof) nous avons parfois observé, sous l'effet d'inhibiteurs de la transcription ou de la traduction ajoutés quelques heures après la mise en culture, un accroissement de l'activité enzymatique. Parmi les hypothèses retenues, on pouvait envisager qu'une inactivase était alors réprimée, permettant ainsi l'expression accrue de la nitrate réductase. De telles protéines existent en effet chez de nombreux végétaux. Nous avons donc repris l'étude de la régulation de la nitrate réductase du *Silène* à la lumière de ces résultats. Afin de réduire au maximum les fluctuations dues à une hétérogénéité du matériel cellulaire prélevé, nous avons modifié nos conditions expérimentales, tout en veillant à ce que le rapport masse de cellules cultivées/volume de milieu, soit identique à celui des cultures habituelles. Les cellules, provenant toutes d'une même culture mère, sontensemencées à raison de 200 mg pour 3 ml de milieu, dans des tubes placés ensuite sur un agitateur rotatif.

Comme pour des cellules cultivées selon le procédé habituel, l'introduction de cycloheximide ou de 6 méthylpurine dès le début de la culture entraîne une inhibition totale de l'activité nitrate réductase mesurée quelques heures

plus tard. La cordycepine a un effet semblable. Il est par ailleurs intéressant de constater que l'activité nitrate réductase n'apparaît qu'après une phase de latence de 2 à 3 h. dans les cellules témoins.

L'addition de 6-méthyl-purine, de cordycepine ou de cycloheximide 3 ou 4 heures après la mise en culture conduit à des résultats différents (figure 31).

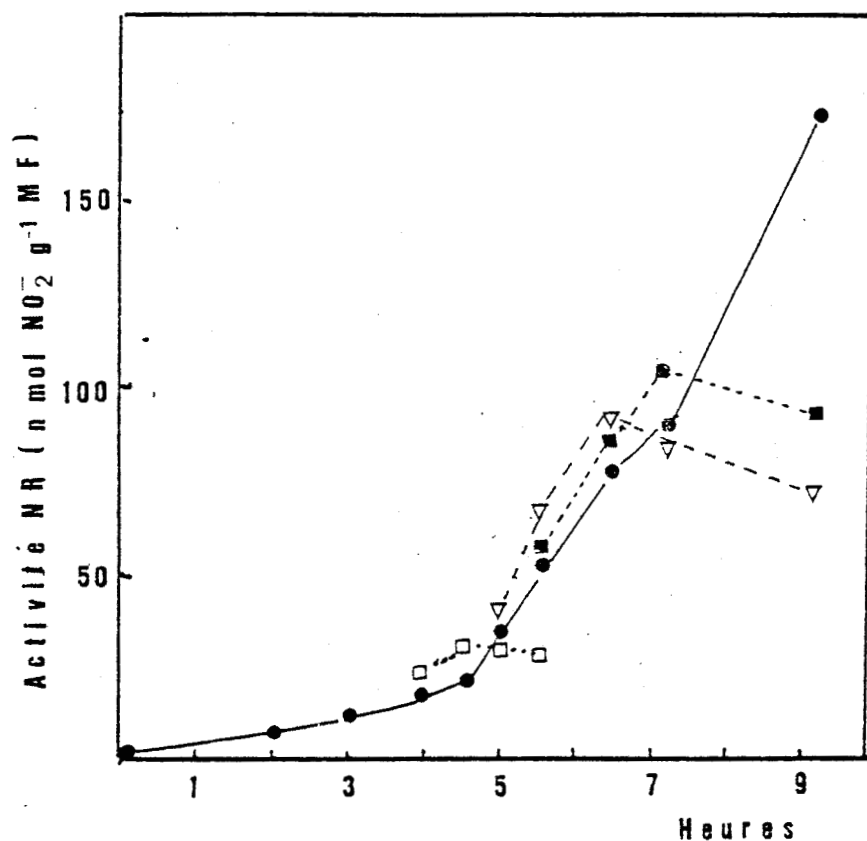


Figure 31 : Influence de la cycloheximide, de la cordycepine et de la 6-méthyl-purine ajoutés après 4 h. de culture sur l'activité nitrate réductase de cellules de Silène.

(□.....□) cycloheximide ; (■---■) cordycepine ; (▽-▽) 6-méthyl-purine ; (●—●) témoin .

L'activité est mesurée in vivo.

La cycloheximide augmente l'activité nitrate réductase d'environ 10 %, 30 min. après son introduction, elle devient ensuite inhibitrice. La stimulation par la 6-méthylpurine (25 %) apparaît après 1 h 30, celle due à la cordycepine (16 %) après 3 h ; toutes deux exercent ensuite une action fortement inhibitrice. D'autre part, les trois inhibiteurs employés empêchent l'incorporation de leucine ^3H dans la fraction précipitable par l'acide trichloracétique froid à 10 % ; l'inhibition est de 80 % en présence de cycloheximide, de 50 % avec la cordycepine et de 20 % avec la 6-méthylpurine. Ces trois substances modifient donc directement ou indirectement la synthèse protéique. On peut cependant s'interroger sur la nature des modifications observées. En plus d'une action spécifique, tout inhibiteur métabolique est susceptible de provoquer des effets secondaires. Nous avons donc tenté d'isoler un facteur protéique inactivateur de la nitrate réductase.

Des cellules de 9 j. qui ne présentent pas d'activité nitrate réductase mesurée *in vivo* ou *in vitro*, ont été congelées par de l'azote liquide puis broyées. La poudre obtenue est mise en suspension dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 à raison de 2 ml de tampon par gramme de matériel frais. Après centrifugation à 7 000 g pendant 20 min. à 4° C, le surnageant est recueilli. On lui ajoute des quantités croissantes de sulfate d'ammonium. Une première fraction est précipitée lorsque le taux de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ atteint 40 % de la saturation, une seconde lorsqu'il atteint 70 % et une troisième pour 90 % . Les fractions I, II et III sont gardées au froid. Pendant ce temps on procède à l'extraction de la nitrate réductase de cellules de 2 jours dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,5, contenant de la leupeptine 10 μM et du FAD 10 μM (2 ml de tampon par g. de cellules). L'enzyme est précipitée par du sulfate d'ammonium à 40 % de sa saturation, puis solubilisée dans le même tampon. A des volumes de 0,100 ml de l'enzyme sont ajoutées des aliquotes de 0,100 ml des fractions I, II ou III. Ces

solutions sont mélangées et mises à 30°C pendant 15 min. Après cette courte préincubation, commence l'incubation en présence de 1 ml de tampon, de 0,1 ml de KNO_3 0,1 M et de 0,05 ml de NADH 1,2 mM pendant 15 min. à 30° C. Puis on révèle le nitrite formé.

Les fractions I et II ne modifient pas significativement l'activité nitrate réductase, alors que la fraction III la diminue de 39 % (12 nmole par essai au lieu de 20).

Enfin les fractions I, II et III ont été essayées selon le même protocole expérimental avec une préparation purifiée de nitrate réductase d'Epinard ; la fraction III inhibe son activité de 19 %.

Les cellules de *Silène* renferment donc, en fin de cycle de croissance, une substance précipitable par le sulfate d'ammonium à forte concentration et capable d'inactiver la nitrate réductase ; elle est vraisemblablement de nature protéique et aurait un taux de renouvellement très rapide. Ces résultats demandent cependant à être confirmés et la caractérisation d'une inactivase chez le *Silène* nécessite encore un travail important.

III - REGULATION DE LA NITRATE REDUCTASE. APPROCHE IMMUNOLOGIQUE.

Les résultats reportés jusqu'à présent, plaident en faveur d'une induction de la nitrate réductase du *Silène* par son substrat. Cette conclusion repose, pour l'essentiel, sur des modifications de l'activité de l'enzyme par des inhibiteurs métaboliques comme la 6-méthyl-purine, la cordycepine ou la cycloheximide. L'utilisation de telles substances qui agissent soit sur la transcription, la polyadénylation ou la traduction n'est cependant jamais satisfaisante dans la mesure où elles peuvent exercer des effets secondaires

difficiles à analyser. D'autre part l'ammonium inhibe l'activité nitrate réductase totalement quand il est la source d'azote unique ou temporairement lorsqu'il est ajouté à un milieu contenant du nitrate ; cette inhibition ne s'exerce pas au niveau génique, mais plutôt par une modification de la perméation du nitrate ou de l'utilisation du potentiel réducteur. Comme l'ammonium inhibe également la GS et favorise l'activité de la glutamate deshydrogénase, nous avons abordé la problème de la régulation de la nitrate réductase par l'utilisation de méthodes immunologiques. Une relation étroite entre l'existence d'une activité nitrate réductase et la présence d'antigènes reconnus par un sérum anti-nitrate réductase a, en effet, été décrite chez *Neurospora crassa* (AMY et GARRETT, 1980) et l'Orge (SOMERS et col., 1983). De tels faits confortent la théorie de l'induction de l'enzyme par son substrat.

Des anticorps polyclonaux ont été fabriqués chez les lapins, contre de la nitrate réductase purifiée du *Silène* (voir : Matériel et Méthodes).

Les immunsérums ont été essayés en présence d'enzyme purifiée, d'extraits obtenus à partir de cellules cultivées sur différentes sources azotées ; nitrate, ammonium ou glutamine. En présence de NO_3^- , l'activité nitrate réductase n'est décelable que pendant les premiers jours de culture, alors qu'avec l'ammonium ou la glutamine employés seuls, elle n'est jamais détectable.

Des aliquotes d'extrait enzymatique provenant de cellules cultivées pendant 2 jours en présence de NO_3^- , sont mélangées à des volumes identiques d'immunsérum dilué selon une progression géométrique de raison 1/2. On laisse s'effectuer la réaction de précipitation à 40° C pendant 2 h. Les activités enzymatiques sont mesurées dans les surnageants.

L'activité est diminuée de moitié en présence de sérum dilué 12 ou 13 fois (figure 32). Lorsque la réaction de précipitation par les anticorps est essayée avec un mélange d'extraits de cellules cultivées 2 jours avec du NO_3^- et de cellules cultivées 2 jours sur NH_4^+ , la courbe d'activité de la nitrate réductase subit une translation le long de l'axe des abscisses ; la concentration en immunosérum nécessaire pour inactiver l'enzyme de 50 % est multipliée par un facteur 2 (figure 32).

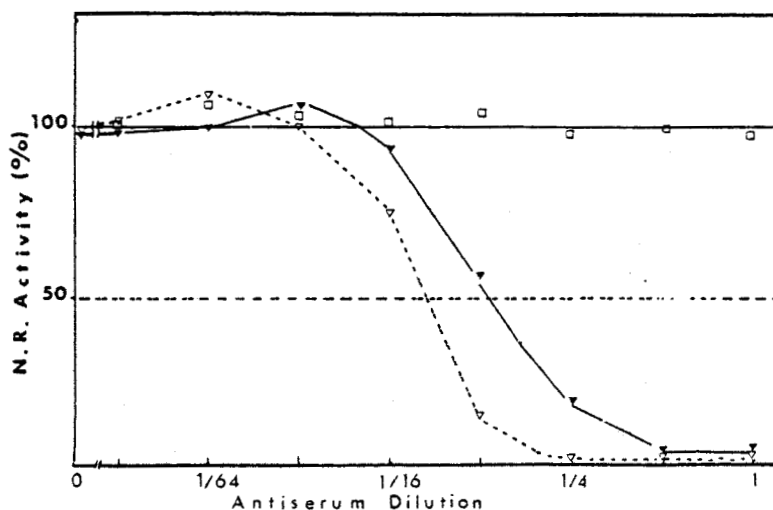


Figure 32 : Immunoabsorption de la nitrate réductase du Silène
 - 100 % d'activité = 16 nmol NO_2^- par essai (100 μg de protéine)
 - dilutions de l'antisérum : 1 = 0,100 ml de sérum non dilué.

Les dilutions sont effectuées par addition de sérum physiologique selon une progression géométrique de raison 1 : 2. (▽--▽) Activité NR mesurée après précipitation de l'enzyme extraite de cellules cultivées 2 j. avec NO_3^- . (▼—▼) Activité NR mesurée après l'addition de 0,05 ml d'extrait de cellules cultivées 2 j avec NH_4^+ à l'extrait précédent. (□—□) Activité NR en présence de sérum prélevé sur un lapin non immunisé.

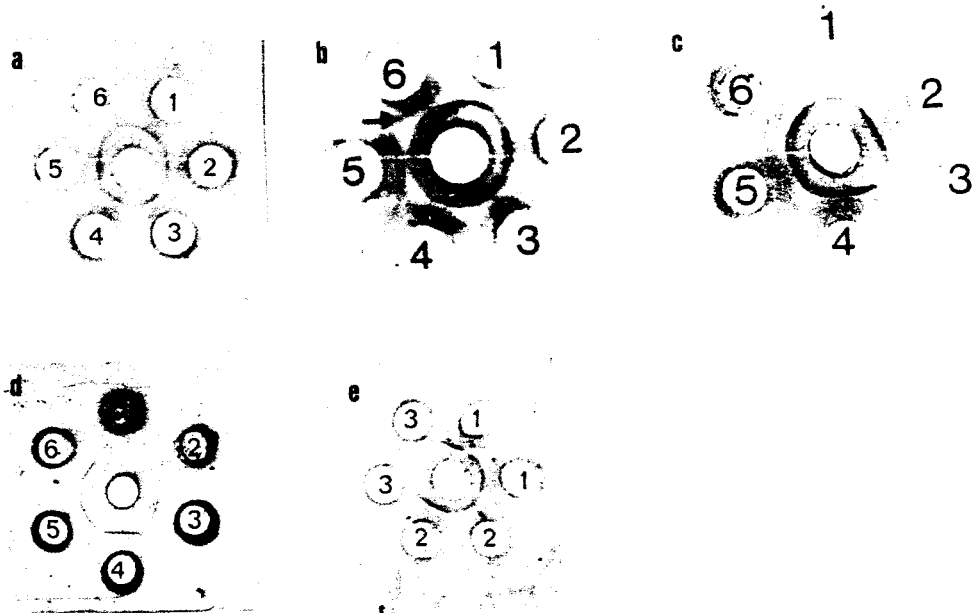


Figure 33 : Immunodiffusion selon OUCHTERLONY en gels d'agar.

Chaque puits central a reçu 8 μ l d'un immunosérum anti-nitrate réductase de *Silène*.

Les puits périphériques contiennent 8 μ l d'un extrait brut de cellules prélevées à différents stades de croissance et cultivées en présence de divers nutriments azotés.

a) Cellules cultivées avec du NO_3^- pendant :
1 : 14 j. (ANR = 0) ; 2 : 1 j. (ANR = 3,6,9) ; 3 : 2 j. (ANR = 12,2) ; 4 : 3 j. (ANR : 6,6) ; 5 : 4 j. (ANR = 1,4) ; 6 : 7 j. (ANR = 0).

b) Cellules cultivées avec du NH_4^+ pendant ; -
2) 1 j. ; 3 : 2 j. ; 4 : 3 j ; 5 : 4 j. ; 6 : 6 j.
Le puits n° 1 contient un extrait provenant de cellules de 14 j. cultivées avec du NO_3^- .

c) Cellules cultivées avec du NH_4^+ pendant 2 j.
(puits 1 et 2) 3 j. (n° 5 et 6) ; cellules cultivées 2 j. avec du NO_3^- (n° 3 - 4).

d) Puits 1 et 2 : tampon contenant 2 % de caséine.
Puits 3 et 4 : NADH nitrate réductase purifiée, éluee par KCl 1 M (activité spécifique : 1,2 unités/mg de protéine) ; 5 et 6 : NADH : NR éluee par du NADH (activité spécifique : 1,5 unités/ mg de protéine).

e) Cellules cultivées avec de la glutamine pendant 5 j. (1) ; 10 j. (2). Tampon contenant 0,2 % de caséine (3).

Les cellules cultivées en présence d'ammonium contiennent donc des antigènes qui entrent en compétition avec la nitrate réductase de cellules cultivées avec du NO_3^- , dans la réaction de précipitation antigènes-anticorps. Ce résultat demandait à être vérifié autrement ; par la méthode d'immuno-diffusion d'Ouchterlony par exemple.

L'immunsérum ne réagit pas avec du tampon contenant de la caséine mais reconnaît la nitrate réductase purifiée, qu'elle soit éluée du bleu Sépharose par le NADH ou le KCl (voir Matériel et Méthodes) (figure 33 d). Il précipite également des antigènes présents dans des cellules cultivées sur nitrate et prélevées après 24 h., 48 h., 3 j., 4 j. ou 7 j. de culture (figure 33 a). L'identité antigénique est totale. Des cellules qui ne manifestent plus d'activité de réduction du nitrate contiennent des antigènes reconnus par les anticorps anti-nitrate réductase.

Ces anticorps mis en présence d'extraits de cellules cultivées avec de l'ammonium ou de la glutamine comme sources azotées uniques réagissent également de manière positive (figure 33, b, e). Lorsque les extraits cellulaires proviennent de suspensions cultivées en présence d'ammonium, il apparaît une seconde zone dont nous ne pouvons dire s'il s'agit d'un second arc de précipitation ou d'une zone et diffusion des protéines (flèche : figure 33 b).

L'identité antigénique est totale que les cellules soient cultivées avec du nitrate ou de l'ammonium.

Ceci pose donc la question de l'existence d'un matériel antigénique, identique durant tout le cycle de culture, et présent quelle que soit la source azotée fournie aux cellules. S'agit-il d'une forme inactive de l'enzyme, d'un précurseur ou d'une forme de dégradation ? Nous discuterons de ces diverses éventualités ultérieurement.

Caractéristiques de la nitrate réductase du Silène

- *Comportement antigénique*
- *Origine du pouvoir réducteur*
- *Influence de l'acide abscissique sur l'activité nitrate réductase.*

I - ETUDE DE LA SPECIFICITE ANTIGENIQUE DES NITRATE-REDUCTASES DU SILENE ET DE L'EPINARD

De nombreuses difficultés ont surgi quand la purification de la nitrate réductase du *Silene* a été entreprise dans le laboratoire : enzyme très labile, l'addition de caséine au milieu d'extraction était nécessaire à la conservation de l'activité (POULLE, 1979). Bien que son élimination fût possible, le risque d'une contamination de la préparation enzymatique par la caséine subsistait et l'obtention d'anticorps spécifiques de la nitrate réductase pouvait s'en trouver compromise. Partant du postulat qu'une enzyme qui accomplit des fonctions catalytiques identiques dans différentes espèces devrait, malgré la spéciation, conserver une identité antigénique au moins partielle, nous avons tenté de contourner la difficulté en purifiant la nitrate réductase d'Epinard, remarquablement stable, afin de l'utiliser comme source antigénique pour fabriquer des anticorps, capables de reconnaître la nitrate réductase du *Silene*. Cet immunosérum nous l'avons obtenu et nous l'avons essayé contre des nitrate réductases d'Epinard, de *Silene* et d'*Echerichia Coli* (Sigma) (figure 34).

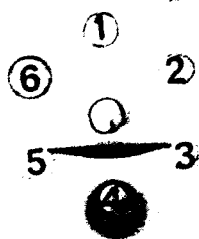


Figure 34 : Réactions de précipitation par double diffusion.
Le puits central contient 8 μ l d'immunosérum anti-NR d'Epinard.

Les puits 1, 2 et 3 contiennent de la nitrate réductase d'*E Coli*. Le puits 4 contient 8 μ l de NR purifiée d'Epinard. Les puits 5 et 6 renferment 8 μ l de NR purifiée de *Silene*.

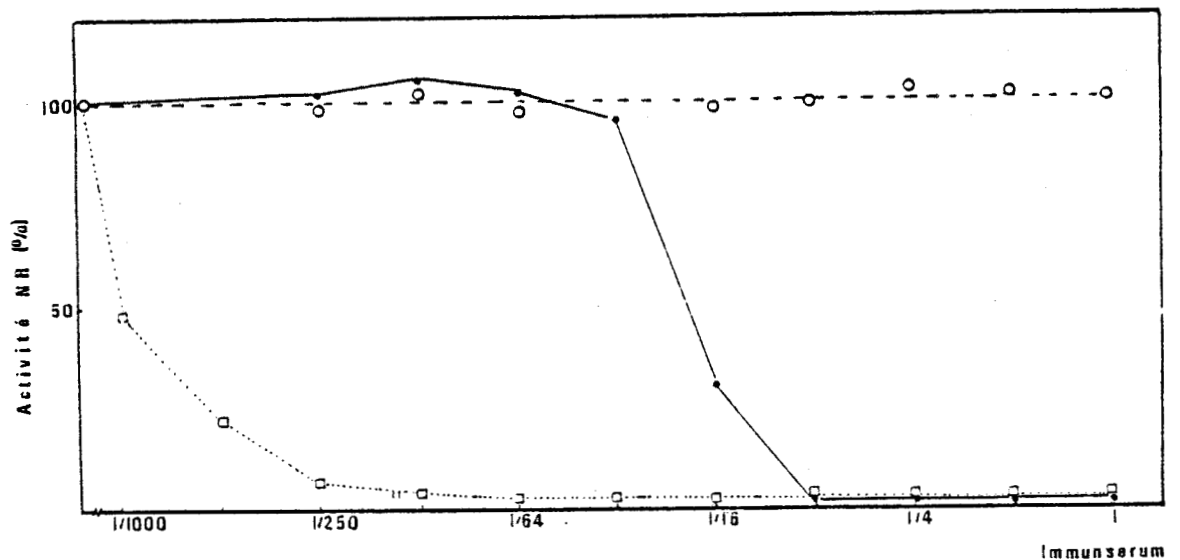


Figure 35 : Immunoabsorption de la nitrate réductase du Silène par un immunsérum d'Epinard.
100 % d'activité = 21 nmol NO_2^- par essai (80 μg de protéines). Le chiffre 1 correspond à 100 μl de sérum non dilué ; puis les dilutions sont effectuées par du sérum physiologique selon une progression géométrique de raison 1 : 2.

(○-○) sérum d'un Lapin non immunisé

(□-□) sérum anti Epinard x enzyme de Silène

(●-●) sérum anti Epinard x enzyme d'Epinard



Figure 36 : Réaction de double diffusion d'un immunsérum d'Orge et de nitrate réductases d'Epinard et de Silène.
Le trou central contient 8 μl d'immunsérum dirigé contre la NR d'Orge*. Les puits n° 1, 2, 6 contiennent de la NR purifiée d'Epinard, les n° 3, 4, 5 de la NR purifiée de Silène.

* L'immunsérum d'Orge a été donné par le Dr SOMERS au Dr NOTTON qui m'en a fait bénéficier lors d'un stage à Bristol.

La réaction de précipitation avec les antigènes d'Epinard est nettement positive, alors qu'elle est négative avec les enzymes du *Silene* ou d'*E Coli*. Comme les nitrate réductases bactériennes contrôlent une réaction de désassimilation de l'azote alors que celles des végétaux supérieurs catalysent des réactions d'assimilation, l'absence d'une reconnaissance antigène bactérien-anticorps d'Epinard n'est pas surprenante. Plus étonnante est l'absence de toute précipitation de l'enzyme du *Silene*. Nous avons voulu vérifier que notre méthode de purification enzymatique n'aboutissait pas à l'obtention de molécules par trop dégradées qui ne seraient plus reconnues par les anticorps. Nous avons donc procédé à des expériences de double diffusion avec cette fois des extraits bruts de cellules de *Silene* : là encore les réactions étaient négatives ; elles l'étaient aussi avec un immunosérum fabriqué contre de la nitrate réductase d'Epinard par le groupe du Dr NOTTON à Bristol.

Nous avons alors étudié la réaction croisée anticorps Epinard x nitrate réductase de *Silene* par une méthode d'immunoabsorption : 100 μ l d'une préparation d'enzyme de *Silene* sont mis en contact pendant 2 heures avec un volume équivalent d'une solution d'anticorps dont la concentration varie selon une progression géométrique de raison 1/2. Après centrifugation, l'activité du surnageant est mesurée (figure 35). L'immunosérum dilué au 1/250ème inactive encore la nitrate réductase du *Silene*, alors qu'aucune réaction de précipitation n'est détectable par les méthodes d'immunodiffusion habituelles.

Ou bien la nitrate réductase du *Silene* présente une structure antigénique particulière ; elle n'est en effet pas reconnue non plus par des anticorps dirigés contre la nitrate réductase de l'Orge (figure 36), ou bien l'immunosérum d'Epinard contient une classe d'anticorps extrêmement spécifiques, incapables de précipiter l'enzyme du *Silene* mais se fixant sur, ou près, du site catalytique empêchant ainsi la réaction de réduction.

Nous avons dû reconsidérer le problème et procéder à la purification de la nitrate réductase du *Silene* (voir Matériel et Méthodes).

Les anticorps dirigés contre la nitrate réductase de *Silene*, reconnaissent l'enzyme purifiée éluée de colonnes de bleu-Sephadex par du NADH 0,100 mM, du KNO_3 0,4M ou du KCl 1M ainsi que celle contenue dans un extrait brut (figure 37) ; ils présentent aussi une légère réaction croisée avec l'enzyme purifiée ou des extraits bruts d'Epinard en immunodiffusion ou en immunoabsorption (figure 38).

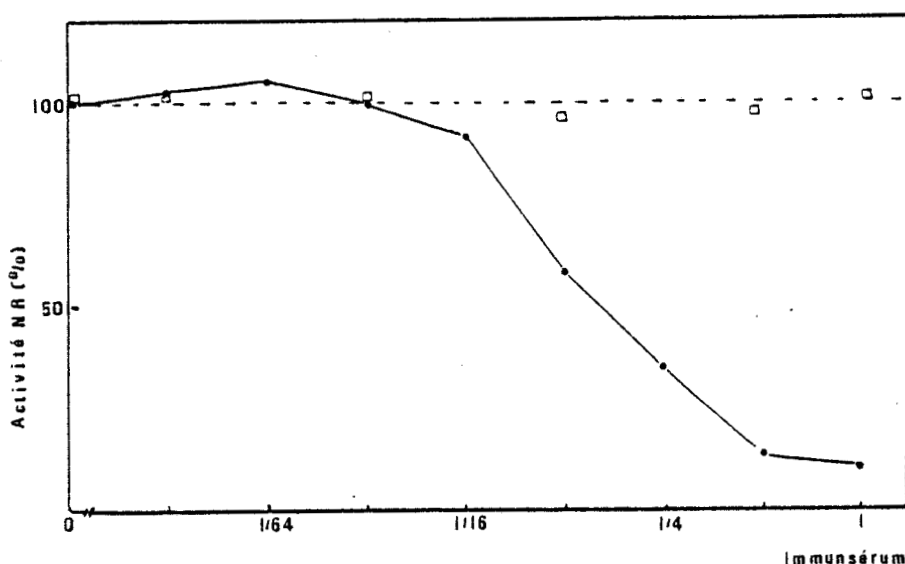


Figure 38 : Immunoabsorption de la nitrate réductase d'Epinard par un immunsérum de *Silene*.
100 % d'activité = 78 nmol NO_2^- par essai (32 ug de protéines). Le chiffre 1 correspond à 100 μl de sérum non dilué ; puis les dilutions sont effectuées par du sérum physiologique selon une progression géométrique de raison 1 : 2.
(□-□) sérum d'un Lapin non immunisé

Les anticorps anti-nitrate réductase du *Silene* semblent dirigés contre des déterminants plus banals de la protéine enzymatique que ceux de l'Epinard, ils peuvent donc provoquer la précipitation d'autres nitrate réductases.

Ces anticorps dirigés contre la nitrate réductase du *Silene*, pourraient reconnaître des déterminants de l'apo-protéine et leur action inhibitrice de l'activité enzymatique dépendrait uniquement de leur capacité à précipiter l'enzyme.

Comme l'immunsérum d'Epinard est capable de provoquer des réactions croisées avec d'autres nitrate réductases (l'Orge par exemple, communication personnelle du Dr NOTTON), nous nous sommes demandé si l'enzyme de *Silene* ne possédait pas une structure très particulière. Il a en effet souvent été dit que la culture *in vitro* de tissus végétaux entraînait l'apparition de variations génétiques d'autant plus importantes qu'elle se prolonge plus longtemps. Par ailleurs l'obtention de suspensions cellulaires exige l'introduction de 2.4 D dans le milieu nutritif. L'immusérum a donc été essayé par immunodiffusion contre des extraits bruts de plantules, de feuilles et de racines de *Silene*, récolté au champ. Il provoque une réaction de précipitation dans tous les cas ; les plantules semblent posséder deux formes antigéniques distinctes (figure 39).

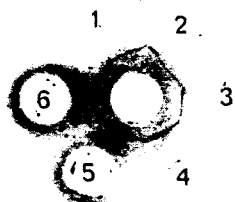


fig 37

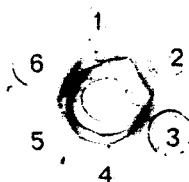


fig 39

Figure 37 - 39 : Réaction de double diffusion d'un antisérum de *Silene* et

- (1) d'enzyme purifiée éluée d'une colonne de Bleu de Sephadex par du NADH (0,1 mM), (1, 2) du KNO_3 (0,4 M) (3, 4) et du KCl (1M) (5, 6) (figure 37).
- (2) d'extraits de plantules (4, 5, 6), de feuilles (3), de racines (1) de *Silene* (figure 39)

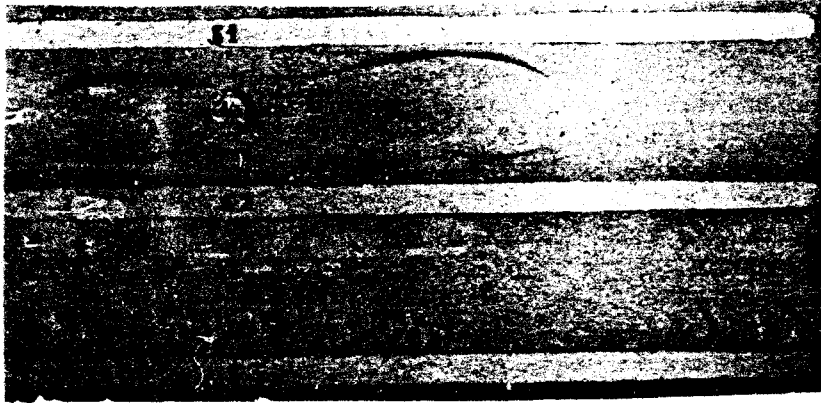


Figure 40 : Immunoélectrophorèse selon GRABAR et WILLIAMS des nitrate réductases d'Epinard et de Silène.

La migration s'effectue sous une tension de 6,5 V par cm de gel à parcourir ; 40 μ l de sérum sont ensuite déposés dans la gouttière ; la diffusion s'effectue en chambre humide pendant 24 h.

On remarque que l'enzyme d'Epinard (1) donne naissance à 2 arcs de précipitation ; l'un du côté cathodique, l'autre du côté anodique. L'enzyme de Silène (2) ne présente qu'un arc situé vers l'anode (\downarrow).

- S_1 : sérum anti NR d'Epinard (origine notre laboratoire)
- S_2 : sérum anti NR d'Epinard (origine Bristol, don du Dr NOTTON).
- S_3 : serum anti NR de Silene.



Le comportement antigénique des nitrate réductases du Silène et de l'Epinard a aussi été comparé par immunoélectrophorèse analytique. Comme dans les expériences de double diffusion, l'immunsérum d'Epinard ne reconnaît pas l'enzyme du Silène, alors que les anticorps du Silène reconnaissent très faiblement la nitrate réductase d'Epinard. D'autre part l'electrophorèse en gel d'agarose sépare deux antigènes de l'Epinard reconnus par l'immunsérum homologue : l'un migre vers l'anode, l'autre vers la cathode (figure 40). Cette réaction s'observe aussi bien avec de l'enzyme purifiée d'Epinard qu'avec un extrait brut. Le "composant anodique" ne migre pas à la même distance que l'enzyme du Silène et présente toutes les activités caractéristiques d'une nitrate réductase (réactions avec le NADH, les sels de tétrazolium, le dichloroindophénol, le FMN ou le méthyl viologène réduits); le composant cathodique ne présente de réduction du nitrate qu'avec le FMNH₂.

Ou bien la nitrate réductase de l'Epinard est plus fragile que celle du Silène, lorsqu'elle est soumise à un champ électrique, ou bien la région de la molécule qui intervient dans l'expression d'une activité terminale est différente. Il est cependant curieux d'observer que la perte de cette composante cathodique n'empêche pas l'expression des activités de l'autre partie de la molécule.

Afin de pouvoir aborder ultérieurement l'étude de la structure de l'enzyme du Silène et de la comparer à celle de l'Epinard, nous avons préparé des anticorps monoclonaux dirigés contre les deux nitrate réductases.

L'enzyme d'Epinard provient du laboratoire du Docteur NOTTON. Celle du Silène a été extraite dans notre laboratoire ; elle ne présente qu'un seul arc de précipitation en immunoélectrophorèse en double dimension, en présence d'un immunsérum polyclonal.

Tableau 10

Propriétés des anticorps monoclonaux de l'Epinard et du Silène



Origine de l'Antigène	Origine de l'anticorps										
	Epinard					Silène					
n° du clone	7 412	7 414	7 422	7 423	7 431 B	7 432	7 434	7 431 A	7 432	7 434	
Epinard	activité {	NADH	100	100	0	0	0	20	0	100	
		MV	90	50	25	75	100	100	100	100	0
	Préc.	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Silène	activité {	NADH	100	70	65	70	65	60	65	100	70
		MV	50	65	67	65	100	100	100	0	50
	Préc.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Le signe + signifie que l'antigène est faiblement précipité par la méthode d'Ouchterlony
 activité MV : activité de réduction du NO_3^- en présence de méthyl viologène réduit
 activité NADH : activité globale NADH : nitrate réductase
 100 % d'activité : 82 nmol NO_2^- par essai (100 µg de protéines).

Huit clones ont été sélectionnés, 4 produisent des anticorps dirigés contre l'enzyme du Silène ; 7431 A, 7431 B, 7432, 7434, les 4 autres contre l'enzyme de l'Epinard, 7412, 7414, 7422, 7423.

Les premiers résultats obtenus très récemment sont reportés dans le tableau 10. L'absence de réaction de précipitation en double diffusion est souvent observée avec les anticorps monoclonaux ; elle résulte de la spécificité de l'épitope contre lequel s'est formé l'anticorps.

Les anticorps de l'Epinard affectent surtout l'activité terminale (activité méthyl viologène-nitrate réductase) des deux enzymes, alors que ceux du Silène inhibent plutôt l'activité NADH : nitrate réductase (activité globale). Les toutes premières expériences de reconnaissance des enzymes, par certains anticorps, effectuées après transfert des protéines sur feuilles de nitrocellulose ("Western blots") ont confirmé la possibilité de réactions croisées.

Les nitrate réductases de Silène et d'Epinard, comme celles d'autres espèces analysées de façon beaucoup plus approfondies par NOTTON et al., (1985) ou CHEREL et al., (1985) possèdent donc des déterminants communs. Ces observations confirment les résultats obtenus antérieurement avec des anticorps polyclonaux et selon lesquels les nitrate réductases des plantes supérieures auraient subi des modifications conformationnelles au cours de l'évolution, mais posséderaient en commun un site catalytique hautement conservé (SMARELLI et CAMPBELL, 1981 ; SNAPP et al., 1984).



TABEAU 11

Activité nitrate réductase de cellules de *Silene* de 2 j., en fonction de la nature du donneur d'électrons et du pH d'incubation.

donneur d'électrons	6,25	6,5	7	7,5
NADPH	0,05 ± 0,005	0,03 ± 0,006	0	0
NADH	0,290 ± 0,010	0,440 ± 0,030	0,680 ± 0,022	0,850 ± 0,020

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{moles de NO}_2^-$ formé par heure et par essai (150 μg de protéines). Les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5 % ($n = 6$).

II - ORIGINE DU POUVOIR REDUCTEUR DE LA NITRATE REDUCTASE DU SILENE

- 1) Affinité de la nitrate réductase du *Silene* pour les nucléotides pyridiniques et le nitrate.

L'enzyme, extraite de cellules de 3 jours qui ont poussé dans un milieu renfermant du nitrate 20 mM, est partiellement purifiée par des précipitations fractionnées par le sulfate d'ammonium et chromatographiée sur une colonne de DEAE cellulose. Comme les nitrate réductases de certains végétaux supérieurs peuvent utiliser le NADH ou le NADPH comme donneurs d'électrons, il était intéressant de préciser la nature du donneur chez le *Silene*. L'intensité de la réduction du nitrate, mesurée *in vitro*, et en présence de NADH 1,2 mM, varie selon le pH du milieu réactionnel. L'activité est maximale à pH 7,5 alors qu'elle est nulle en présence de NADPH 1 mM (tableau 11). Par contre une très faible activité NADPH : nitrate réductase s'observe pour des pH compris entre 6 et 6,75 avec un optimum à pH 6,25 ; elle correspond alors à 17 % de l'activité NADH : nitrate réductase mesurée à pH 6,25 et à 6 % de celle mesurée à pH 7,5 (tableau 11). Cette fonction NADPH : nitrate réductase est-elle réelle ou bien résulte-t-elle d'un artefact ?

Bien qu'il n'ait jamais été mesuré, il est vraisemblable que le pH du cytosol soit plus proche de 6 que de 7,5, mais il est également possible que la conformation de l'enzyme, extraite de son environnement cellulaire habituel, se modifie dans une solution tamponnée de pH 6 ou 6,5. En effet la nitrate réductase du *Silene* précipite à pH 5,5 (POULLE, 1979) et l'on imagine mal qu'elle le fasse, quand le pH du cytosol atteint cette valeur. On peut également envisager l'intervention d'une phosphatase qui à pH 6,25 transformerait le NADPH en NADH + Pi. Cette hypothèse paraît peu plausible ; on peut en effet mesurer à pH 6,25 l'activité NADPH nitrate réductase du *Silene*, puis celle d'un mélange contenant des quantités équivalentes d'enzyme purifiée d'Epinard et de préparation enzymatique de *Silene* ;

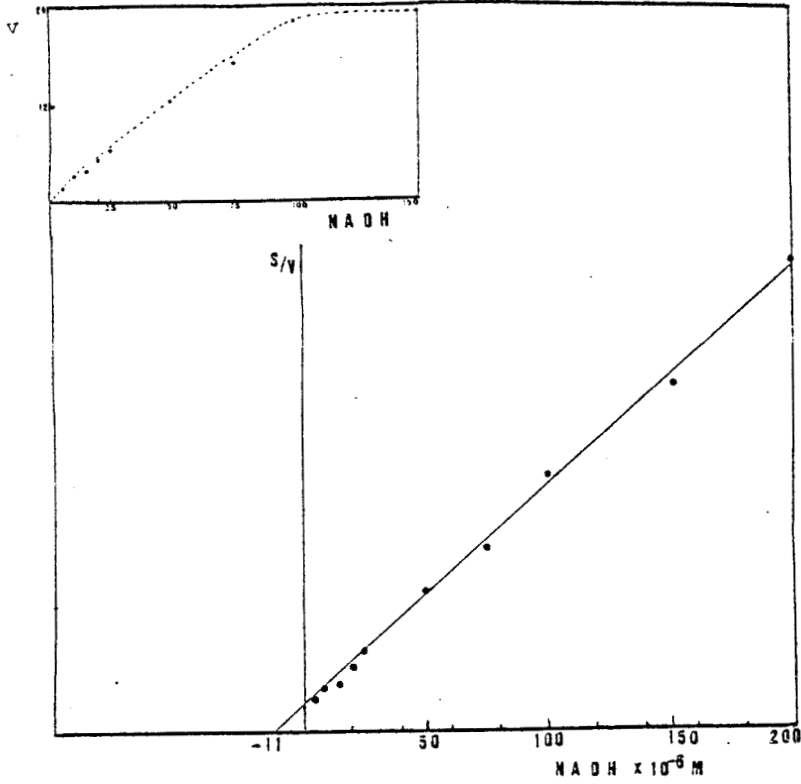


Figure 41 : Détermination du K_m NADH selon HANES.

En encart : vitesse de réaction en fonction de la concentration en NADH. (v : nmol NO₂⁻. min.⁻¹. mg⁻¹ prot.)

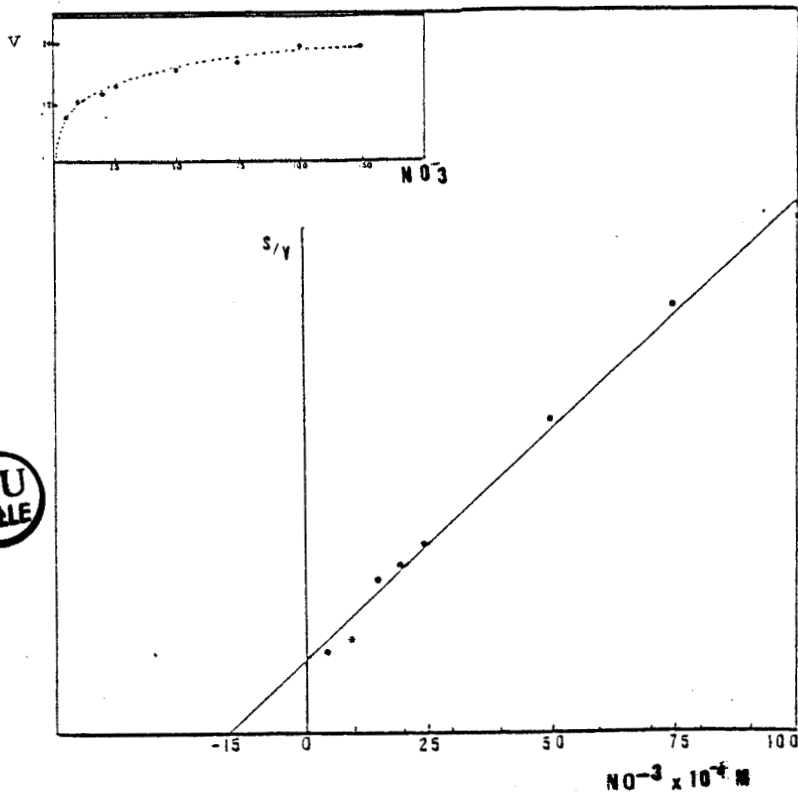


Figure 42 : Détermination du K_m NO₃⁻ selon HANES

En encart : vitesse de réaction en fonction de la concentration en NO₃⁻. (v : nmol NO₂⁻. min.⁻¹. mg⁻¹ prot.)

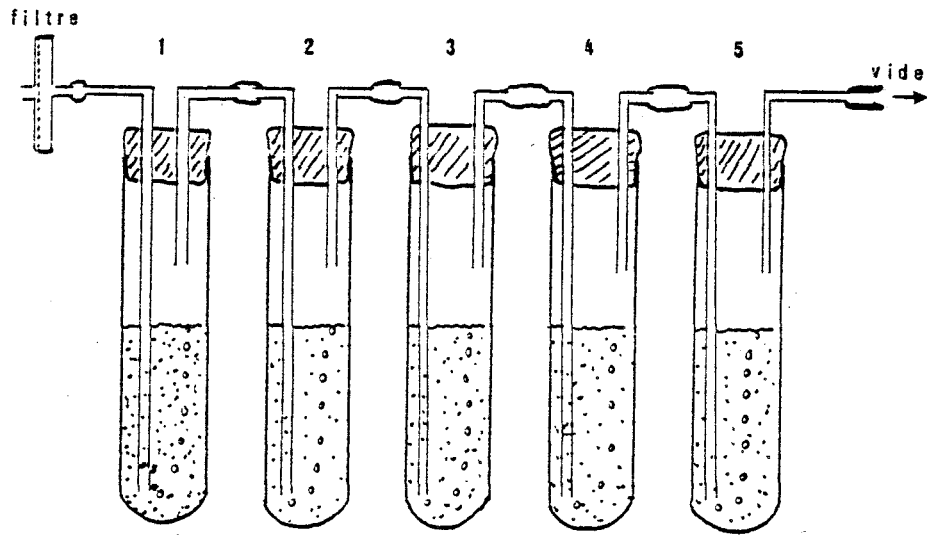
l'activité est identique dans les deux cas. Si une phosphatase avait libéré du NADH, l'enzyme d'Epinard qui est spécifique du NADH devrait contribuer à accroître l'activité globale. L'absence totale d'activité observée à pH 6,25 avec l'enzyme d'Epinard seule, exclut l'éventualité d'une contamination de la solution de NADPH par du NADH.

Etant donné l'éloignement des pH optima d'action avec les deux nucléotides et la faible activité NADPH : nitrate réductase, nous considérerons pour l'instant que la nitrate réductase du *Silene* est à classer parmi les NADH : nitrate réductases (E.C. 1.6.6.1.).

Nous avons alors mesuré l'affinité de l'enzyme pour le NADH et pour le nitrate en présence de NADH. L'évolution des vitesses de réaction en fonction des concentrations de NADH et de KNO_3 est donnée dans les figures 41 et 42. Elles obéissent à une cinétique de type michaelien. Les constantes d'affinité ont été déterminées selon les représentations de LINEWEAVER et BURK ($1/V = f(1/S)$) et de HANES ($S/V = f(S)$). Les valeurs des constantes d'affinité pour le NADH sont respectivement 7,2 et 11,2 10^{-6} M, pour le NO_3^- 7,7 et 15 10^{-4} M. Bien que ces deux représentations ne soient que des variantes de la même équation $V = \frac{V.S}{S + K_m}$, on a pu montrer que la méthode de HANES donnait le tracé le plus précis. Nous adopterons donc les valeurs suivantes : $K_m\text{NADH} = 11 \cdot 10^{-6}$ M et $K_m\text{NO}_3^- = 15 \cdot 10^{-4}$ M.

2) Action d'inhibiteurs du métabolisme énergétique sur l'activité nitrate réductase de cellules de *Silene* de 3 jours.

Puisque, selon les apparences, le NADH est la source électronique nécessaire à la réduction du nitrate, nous allons essayer de déterminer son origine.



Montage expérimental utilisé pour étudier l'action des inhibiteurs métaboliques.

Chaque tube renferme 10 ml de milieu d'incubation et 1 g de cellules.

L'air est filtré à travers un Millipore (Millex - GS - 0,22 μ m) et circule grâce à une légère dépression créée à l'aide d'une trompe à vide.

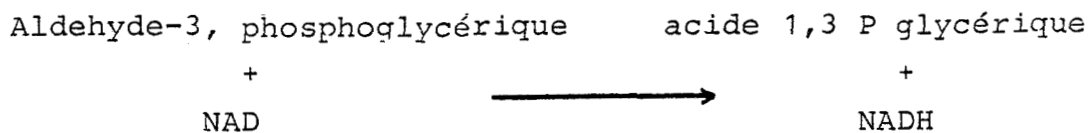
Tube 1 : Témoin ; les tubes 2, 3, 4 et 5 contiennent respectivement de l'iodoacétate, de l'acide malonique, de la roténone et de l'antimycine A.

Les cellules sont cultivées pendant 3 jours en présence de nitrate 5 mM, puis elles sont mises en contact pendant une heure avec divers inhibiteurs métaboliques qui affectent soit des enzymes de la glycolyse ou du cycle tri-carboxylique, soit le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire.

Des expériences préliminaires avaient en effet montré que l'introduction de ces différents inhibiteurs dans le milieu d'incubation n'avaient aucune incidence sur l'activité nitrate réductase mesurée *in vivo*. Pour que leur action fût effective, il fallait procéder à une préincubation des cellules pendant environ 1 heure, à température ambiante et sous un léger courant d'air stérile (voir schéma ci-contre). Puis, on procède à l'incubation proprement dite, à 27° C pendant 30 min., et l'activité nitrate réductase est mesurée *in vivo*.

Les inhibiteurs utilisés sont :

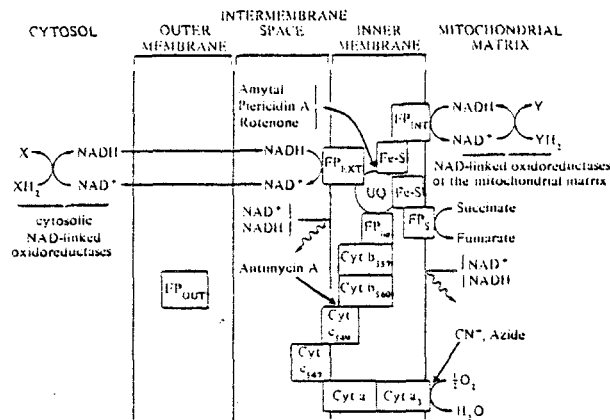
- l'iodoacétate qui réagit avec les groupements sulfhydriles de la glyceraldehyde 3, phosphate deshydrogénase enzyme tetramérique dont chaque constituant possède un NAD fortement lié (ce qui est exceptionnel chez les oxydoréductases à NAD) et qui catalyse la réaction :



L'inhibition de cette réaction empêche donc la genèse de NADH.

- l'acide malonique qui inhibe l'oxydation de l'acide succinique qui s'accumule, ce qui entraîne un ralentissement puis un arrêt de la respiration

Les mitochondries végétales diffèrent des mitochondries animales en ce qu'elles possèdent une deuxième NADH deshydrogénase située sur la face externe de la membrane interne. Cette enzyme apparemment composée d'une flavoprotéine catalyse le transfert d'une paire d'e⁻ (et de H⁺) de NADH de l'espace intermembranaire vers l'ubiquinone ; elle est donc responsable de la reoxydation du NADH produit dans le cytosol. La possession d'un tel système dispense la cellule végétale de recourir à un système de navette pour transférer les e⁻ du NADH produit à l'extérieur de la mitochondrie vers la chaîne respiratoire située dans la membrane interne.



Organisation probable de la chaîne respiratoire dans la membrane interne d'une mitochondrie végétale.

FS ext : "NADH deshydrogénase externe" = flavoprotéine

FP int : "NADH deshydrogénase interne" = flavoprotéine + protéines FS

FP out : "NADH deshydrogénase de la membrane externe qui ne transfère pas d'e⁻ vers la chaîne respiratoire.

⌋ : indique que la membrane est imperméable à cette molécule.



- la rotenone qui bloque l'activité NADH deshydrogénase d'une flavoprotéine, située sur la face externe de la membrane mitochondriale interne

- l'antimycine A qui inhibe l'activité de l'ubiquinol-cytochrome c oxydase qui effectue le transfert électronique du cytochrome b au cytochrome c₁ (voir encadré ci-contre).

L'iodoacétate inhibe l'activité nitrate réductase de cellules de *Silene* de 75 %, alors que l'acide malonique la stimule très légèrement (10 % dans le cas le plus favorable). La rotenone ne la modifie pas, alors que l'antimycine A la triple (tableau 12).

Incontestablement le NADH nécessaire à la réduction du nitrate par les cellules de *Silene* est essentiellement d'origine cytoplasmique, il proviendrait surtout de la glycolyse.

III - ACTION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE SUR L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE DE CELLULES DE SILENE.

Des observations fortuites nous avaient révélé que des cellules qui croissaient mal parce qu'elles avaient été ensemencées alors qu'elles étaient âgées de 16 ou 17 jours, présentaient une activité nitrate réductase qui était plus élevée et qui se prolongeait plus longuement au cours d'un cycle de croissance que celle de cellules réensemencées après 14 jours. Nous avons donc suivi l'évolution de l'activité nitrate réductase dans des cellules dont la croissance est ralentie par une hormone retardatrice : l'acide abscissique (ABA). Une expérience préliminaire avait en effet montré qu'il était capable d'entraîner une diminution de croissance 2 ou 3 jours après son introduction dans un milieu de culture contenant des cellules à croissance normale.

Des cellules de 14 jours sont donc transférées dans un milieu neuf contenant du nitrate 5mM. Après 48 heures de culture, de l'acide abscissique est ajouté aseptiquement de façon à amener sa concentration finale à 10^{-4} M. Les cellules

TABLEAU 12

Action de l'iodoacétate, de l'acide malonique, de la rotenone ou de l'antimycine A sur l'activité nitrate réductase de cellules de *Silene* de 3 jours.

Nature de l'inhibiteur :	ANR $\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$
. Témoin	8,4 ± 0,21
. Iodoacétate 10^{-3} M	2,1 ± 0,11
. Acide malonique 10^{-3} M	10 ± 0,6
. Rotenone 0,2 mM	8,23 ± 0,9
. Antimycine A 0,2 mM	31,9 ± 1,56

Les activités nitrate réductase sont mesurées in vivo ; elles sont représentées par leur moyenne ; les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5 % (n = 8). L'expérience a été répétée 3 fois.

sont ensuite prélevées toutes les 24 heures, pesées et utilisées afin de mesurer leur activité nitrate réductase *in vivo*. Le pH du milieu nutritif est également relevé ; il ne se modifie pas pendant la durée de l'expérience.

Après 3 ou 4 jours de culture, alors que les cellules ont donc été traitées par l'ABA pendant 24 ou 48 heures, ni la croissance, ni l'activité nitrate réductase ne sont modifiées.

C'est après 3 jours de contact avec l'hormone que la croissance est diminuée d'environ 28 % et que l'activité nitrate réductase est augmentée de 35 %. Si le traitement par l'hormone se prolonge encore 24 heures, la croissance des cellules traitées est ralentie de 22 % mais leur activité est accrue de 40 % par rapport à celle de témoins (tableau 13).

On peut donc dire, sans préjuger des causes réelles, qu'il existe pendant quelques jours au moins, une relation inverse entre la croissance et l'activité nitrate réductase des cellules de *Silene*.

Tableau 13

Aktion de l'acide abscissique ($10^{-4}M$) sur la croissance et l'activité nitrate réductase de cellules de *Silene*

Durée de la culture (j.)	Masse de matière fraîche (g.)		ANR $\frac{-1}{g} \cdot \frac{-1}{MF h}^{-1}$ $\mu\text{moles NO}_2$	
	Témoin	ABA	Témoin	ABA
3	5,64	5,49	9,5 ± 0,29	9,3 ± 0,31
4	8,90	8,40	10,20 ± 0,12	10,71 ± 0,20
5	12,1	8,65	6,83 ± 0,15	9,22 ± 0,27
6	16,5	11,9	3,75 ± 0,20	5,25 ± 0,17

Les activités nitrate réductase sont mesurées *in vivo* ; elles sont représentées par leur moyenne ; les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5 % ($n = 9$). L'expérience a été répétée 3 fois.

*Activité nitrate réductase d'explants racinaires
de Chicorée de Bruxelles cultivés "in vitro".*

Les modalités de la différenciation organogène d'explants tissulaires prélevés dans la racine tubérisée de la Chicorée de Bruxelles ou dans les feuilles étiolées qu'elle produit, ont été largement étudiées dans le laboratoire (LEFEBVRE, 1977, VASSEUR, 1979, SENE et al., 1983, VASSEUR et SENE, 1984, BACKOULA et al., 1984).

Notre objectif initial était donc de suivre l'évolution de l'activité nitrate réductase au cours de la culture *in vitro* d'explants tissulaires de cette Chicorée afin de savoir si la nitrate réductase pouvait constituer un marqueur de la différenciation organogène.

Avant d'entreprendre ce travail, il était indispensable de suivre les variations de l'activité nitrate réductase de la plante cultivée au champ et lors du forçage de la racine tubérisée.

A la fin de la première année de végétation, l'activité nitrate réductase est importante dans les feuilles vertes et très faible dans la racine tubérisée (DORCHIES et RAMBOUR, 1983 ; DORCHIES, 1984).

L'arrachage, puis le stockage de ces racines avant leur mise en forçage, entraîne la disparition de toute activité nitrate réductase qui n'est pas non plus décelable dans les bourgeons étiolés qu'elles produisent (DORCHIES et RAMBOUR, 1983). Les tissus de racines tubérisées ou de feuilles étiolées, qui possèdent une potentialité élevée de régénération de racines et de bourgeons, constituent donc un matériel intéressant pour aborder l'étude de la nitrate réductase dans la perspective que nous avons définie.

I - ACTIVITE NITRATE REDUCTASE D'EXPLANTATS RACINAIRES
CULTIVES IN VITRO.

1) Explants de 2 mm d'épaisseur.

Prélevés au niveau de l'assise génératrice de racines tubérisées qui ont séjourné en chambre froide, ils sont pauvres en nitrate et ne présentent, au moment de l'ensemencement aucune activité nitrate réductase (DORCHIES et RAMBOUR, 1983).

Puis cette activité ainsi que la teneur en nitrate des explants sont mesurées toutes les heures pendant les 48 premières heures (figure 43). La courbe de la teneur intratisulaire en nitrate présente trois paliers successifs : le premier pendant les 12 premières heures, le second s'étend de la 12ème à la 24ème heure, le troisième nettement plus élevé se prolonge pendant environ une journée. La teneur en NO_3^- augmente ensuite brutalement.

Quant à l'activité nitrate réductase, elle apparaît dès la première heure de culture, tout en demeurant très faible, puis après 6 h. elle augmente graduellement et évolue ensuite par oscillations successives en présentant des maxima vers la 20ème et la 44ème heure de culture.

Lorsque la culture est poursuivie pendant 16 j., l'activité est mesurée chaque jour, à la même heure, afin d'éviter les fluctuations observées précédemment (figure 44), elle est maximale au 2ème jour puis elle décroît ensuite pour augmenter en fin de culture. Quant à la teneur en nitrate, elle atteint un maximum vers le 2ème jours puis diminue ensuite régulièrement. Globalement l'activité nitrate réductase suit donc la teneur en nitrate des explants.

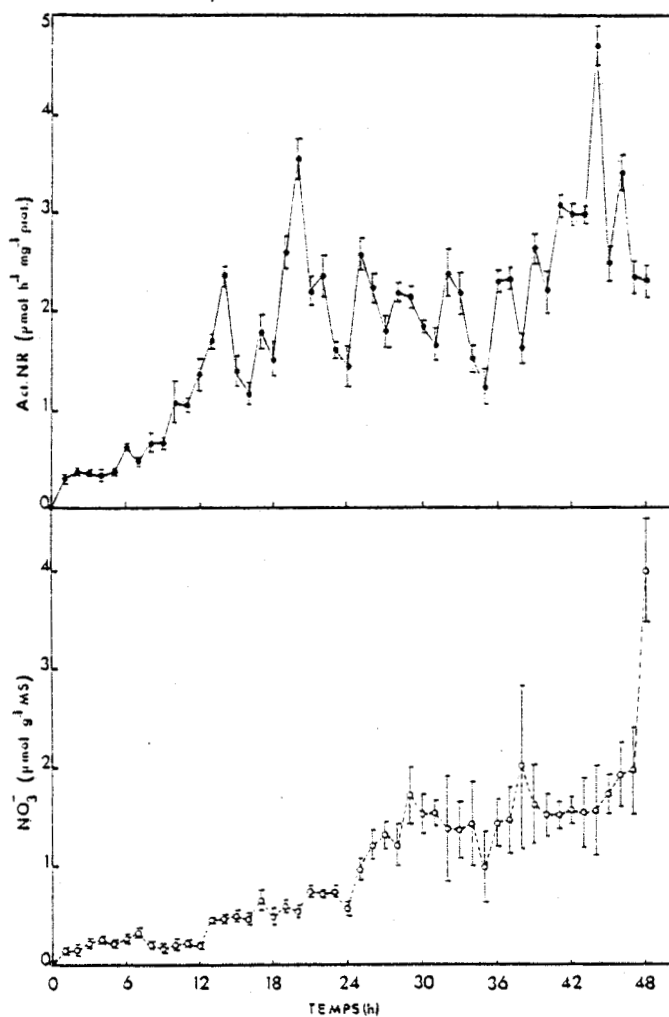


Figure 43 : *Activité nitrate réductase et teneur en nitrate d'explants racinaires, cultivés in vitro pendant 48 h. L'activité NR (●—●) et la teneur en nitrate (○—○) sont représentées par la moyenne et l'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n = 9).*



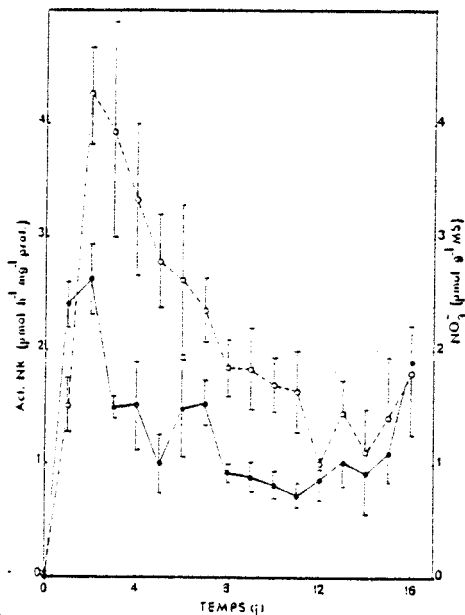


Figure 44 : Activité nitrate réductase et teneur en nitrate d'explants racinaires cultivés in vitro pendant 16 j. L'activité NR (●) et la teneur en nitrate (○) sont représentées par la moyenne et l'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % ($n = 9$).

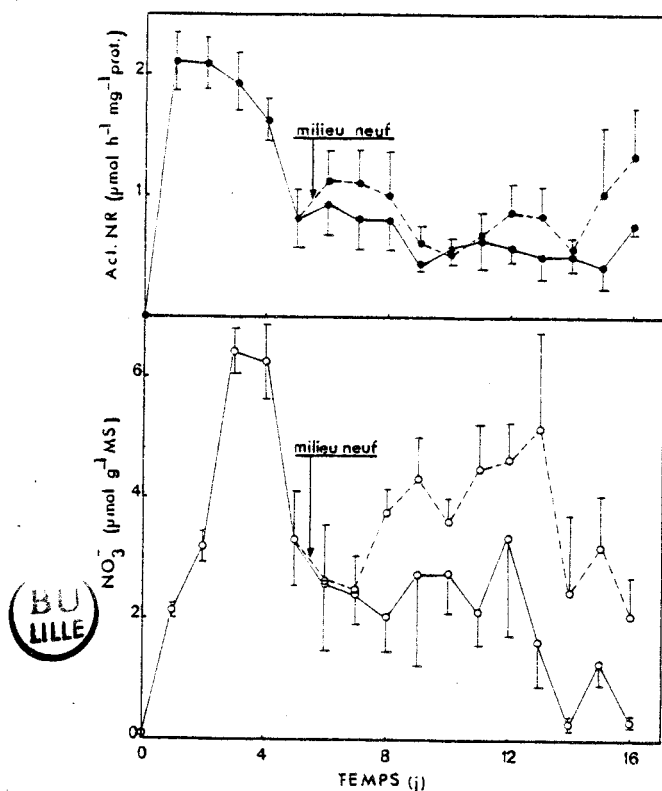


Figure 45 : Activité nitrate réductase et teneur en nitrate d'explants racinaires cultivés in vitro pendant 16 j. et d'explants transplantés sur un milieu neuf au 5e jour. Activité NR (●) ; teneur en NO_3^- (○). L'activité NR et la teneur en nitrate sont représentées par la moyenne et l'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % ($n = 9$).



Le transfert d'explants de 5 j. sur un milieu neuf s'accompagne dans les 24 heures qui suivent, d'un accroissement significatif de l'activité qui se maintient au même niveau pendant 3 j. avant de décroître. La teneur en nitrate des explants transplantés augmente après 48 heures puis décroît en fin de culture (figure 45).

Enfin la culture de certains explants est prolongée pendant 45 j. afin de permettre la croissance des racines et des feuilles néoformées qui peuvent atteindre 3 à 4 cm de long. L'activité nitrate réductase est alors mesurée et comparée à celle de racines et de feuilles de plantules issues de graines mises à germer en conditions aseptiques (tableau 13).

Tableau 14

Activité nitrate réductase mesurée *in situ* et *in vivo* dans des plantules et dans des feuilles et des racines néoformées.

* Feuilles cotylédonnaires

Matériel	Activité NR ($\text{nmol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF)		
	<i>in situ</i>	<i>in vivo</i>	
A	Feuilles	27 ± 4	69 ± 1
	Racines	68 ± 1	105 ± 16
B	Feuilles *	152 ± 12	49 ± 3
	Racines	396 ± 20	653 ± 34

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

A : Feuilles et racines néoformées à partir d'explants racinaires

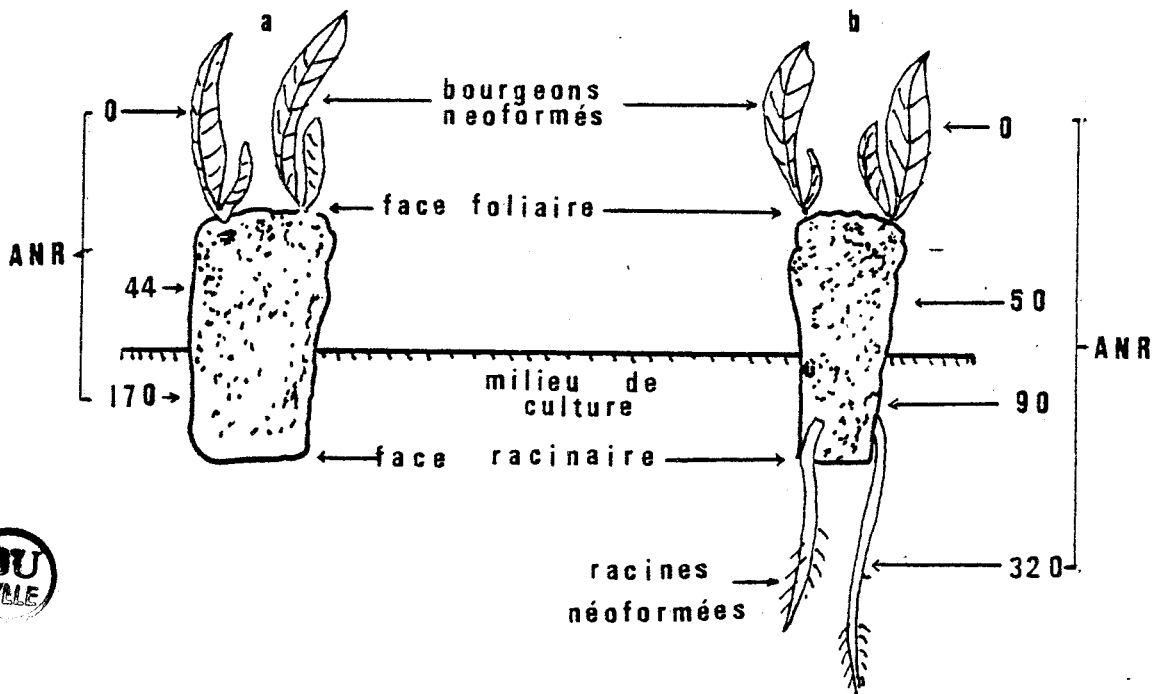
B : Plantules en germination

2) Explants de 20 mm de longueur

Les explants prélevés dans la région moyenne d'une racine tubérisée de Chicorée possèdent, si leur longueur est suffisante, une polarité naturelle de régénération : des bourgeons apparaissent sur la face qui, dans la racine, était orientée vers le collet de la plante et des racines se forment sur la face tournée vers l'apex racinaire.

Le contact du milieu aqueux (GAUTHERET, 1959) abolit cette polarité naturelle dans des explants de 2 mm qui produisent d'ailleurs plus de feuilles que de racines si le milieu contient du glucose (SENE, et al., 1983).

Nous avons donc suivi l'activité nitrate réductase dans les différentes parties de fragments racinaires de 20 mm de long qui sont enfoncés d'environ 10 mm dans le milieu. Les explants sont prélevés après 12 jours de culture : des bourgeons (de 3 à 5 mm) sont apparus sur la face émergée (face foliaire) et des racines se sont formées sur la face opposée (face racinaire). Ces organes sont alors tronçonnés afin de mesurer l'activité nitrate réductase qui est également déterminée dans les parties de l'explant qui étaient hors ou dans le milieu. Les résultats sont reportés dans la figure 46 a, b.



ANR : $\text{nmol NO}_3^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{M.F.}$

Figure 46 a, b : Activité nitrate réductase mesurée in vivo dans différentes parties d'explants racinaires cultivés pendant 12 jours.

- a) explants n'ayant pas produit de racines
- b) explants ayant produit des racines

Lorsque les explants n'ont pas formé de racines l'activité la plus importante se retrouve dans la partie de l'explant qui est plongée dans le milieu nutritif. Des résultats identiques ont été observés avec des explants de 10 mm de longueur.

II - ACTIVITE NITRATE REDUCTASE DANS DES CALS ET DANS LES RACINES NEOFORMEES A LA BASE DE BOURGEONS EXCISES ET TRANSPLANTES DANS UN MILIEU NEUF.

Après environ 30 jours de culture les feuilles des bourgeons néoformés sur un explant racinaire ont une activité nitrate réductase faible (environ $30 \text{ nmoles h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) ou nulle. Ces bourgeons peuvent être excisés et transplantés aseptiquement dans du milieu gélosé contenant les éléments minéraux de la solution de Murashige et Skoog et de l'AIA à la concentration de $0,1 \text{ mg l}^{-1}$; à leur base se forment un petit cal puis des racines. Lorsque celles-ci mesurent de 25 à 30 mm elles sont prélevées afin de mesurer leur activité nitrate réductase ; les cals sont eux aussi récoltés dans le même but.

L'activité nitrate réductase est toujours plus élevée dans les racines ($104 \pm 15 \text{ nmoles.h}^{-1} \text{ .g}^{-1} \text{ MF}$) que dans les cals ($60 \pm 10 \text{ nmoles.h}^{-1} \text{ .g}^{-1} \text{ MF}$) (1) alors qu'elle n'est pas décelable dans les feuilles.

De toutes ces expériences différentes, il ressort que l'activité nitrate réductase est essentiellement localisée dans les racines. Cette conclusion reste vérifiée quand le matériel analysé est constitué de disques prélevés dans les feuilles étiolées : ces explants produisent en effet un cal sur lequel se différencient des bourgeons et des racines (VASSEUR, 1979) ; c'est dans celles-ci que l'activité nitrate réductase est la plus importante (DORCHIES, 1984 ; DORCHIES et RAMBOUR, 1985).

(1) Ces activités sont représentées par la moyenne d'une expérience. L'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % ($n = 12$). L'expérience a été renouvelée 3 fois.

D I S C U S S I O N

*Les gens bien élevés contredisent
les autres. Les sages se contre-
disent eux-mêmes.*

O. WILDE
(*Phrases et Philosophie*)

1) Les mesures de l'activité nitrate réductase

La méthodologie utilisée dans l'étude de l'activité nitrate réductase est toujours un point qui nécessite une réflexion attentive. Dans le chapitre "Matériel et Méthodes", nous avons vu que l'activité peut être mesurée de trois façons différentes et qu'aucune n'est satisfaisante en soi.

La méthode *in vitro* permet une évaluation convenable des paramètres de la cinétique enzymatique mais elle ne reflète pas pour autant, l'activité réelle au sein de la cellule, où, substrat donneur d'électrons et enzyme peuvent se trouver dans des compartiments différents ; il n'est pas sûr non plus que le pH cellulaire soit de 7,5.

Par ailleurs l'extrême labilité de nombreuses nitrate réductases, qui semble être inhérente à la molécule (REMMLER et CAMPBELL, 1986), et la richesse de nombreux végétaux supérieurs en composés phénoliques qui, oxydés au cours de l'extraction, peuvent contracter des liaisons covalentes avec les protéines sont autant d'obstacles à une détermination correcte de l'activité nitrate réductase *in vitro*.

La teneur élevée en composés phénoliques des tissus racinaires ou foliaires de la Chicorée de Bruxelles nous a interdit l'utilisation de cette méthode et nous a obligé à recourir à d'autres types de mesure.

La détermination de l'activité nitrate réductase *in vivo* a l'avantage d'être simple et rapide, mais elle présente l'inconvénient de fournir aux tissus du nitrate exogène et du propanol. Celui-ci modifie en effet les perméabilités membranaires et facilite donc la diffusion du nitrite formé dans le milieu d'incubation mais il permet aussi une perméation accélérée du nitrate et peut provoquer des transferts artificiels de NO_3^- d'un compartiment à un autre. Les mesures de l'activité seront donc généralement surestimées.

La méthode *in situ*, mise au point par ROBIN et al., (1983) évite ces inconvénients ; bien qu'il soit, comme pour la méthode *in vivo*, nécessaire de se placer en anaérobiose pendant un temps assez long, elle est sans doute le procédé le plus fiable parce qu'il se déroule dans des conditions qui se rapprochent le plus de la réalité biologique.

Parce que la plus grande partie de notre expérimentation avait été entreprise en utilisant la méthode *in vivo*, nous avons continué à l'employer, d'autant plus que le but de notre travail n'était pas d'étudier la nutrition azotée des cellules ou des tissus ni d'évaluer les tailles des différents pools nitriques, mais de détecter la présence ou l'absence supposée de la protéine nitrate réductase par la mesure de son activité.

Que celle ci soit surestimée ne constitue pas à nos yeux un inconvénient majeur et ne remet pas en cause l'essentiel de nos résultats.

Le propanol ne modifie pas de façon significative l'activité nitrate réductase des tissus de Chicorée de Bruxelles, alors que l'apport de nitrate le fait (DORCHIES, 1984). Chez le Silène par contre, la présence du propanol augmente cette activité ; si les cellules sont mises en incubation dans un tampon dépourvu de nitrate mais contenant 1,25 % de propanol, l'activité est supérieure à celle mesurée dans des cellules qui sont incubées dans du tampon contenant du nitrate 0,1 M mais pas de propanol.

Le propanol modifie donc la compartimentation cellulaire du nitrate dans les cellules de Silène. Les tissus d'Endive étant pauvres en NO_3^- , l'introduction de propanol dans le milieu d'incubation³ ne modifie pas l'activité enzymatique. Ce genre d'observation corrobore par

ailleurs les travaux de SHANER et BOYER (1975) et de REED et HAGEMAN (1980) qui avaient montré que ce n'est pas la teneur mais le flux de nitrate qui régule l'activité nitrate réductase.

2) Activité nitrate réductase et croissance cellulaire

Dans les conditions habituelles de culture, c'est-à-dire en milieu non tamponné, les cellules de Silène utilisent préférentiellement l'azote nitrique et la croissance cesse avec l'épuisement en sucre du milieu (DUBOIS, 1980). Cependant la croissance de la suspension peut se dérouler normalement en présence d'autres nutriments azotés comme la glutamine ou l'ammonium, si le milieu est tamponné. Le raccourcissement du cycle de culture de cellules, cultivées avec de l'ammonium, ne résulte pas d'une intoxication par l'ion qui, nous l'avons montré, est métabolisé par la glutamine synthétase et la glutamate déshydrogénase. Le fléchissement puis l'arrêt de la croissance après le 6ème jour peuvent avoir deux causes. :

- a) le détournement de métabolites essentiels (sucres, acides organiques...) pour le maintien de l'équilibre acido-basique et du potentiel osmotique (SALSAC, 1982).
- b) le fonctionnement du pH stat biochimique.

La première éventualité nous paraît peu plausible ; lorsque l'ammonium est fourni comme source azotée l'anion NO_3^- est remplacée stoechiométriquement par Cl^- sous la forme de KCl et de CaCl_2 . L'ion Cl^- aisément diffusible peut donc participer efficacement au maintien et de la pression osmotique, et de l'équilibre des charges ; il ne semble pas être spécialement toxique, sinon la croissance serait ralentie ou inhibée dès les premiers jours.

Il semble donc bien que la raison première de l'arrêt de la croissance de la suspension cellulaire soit lié au fonctionnement du pH stat biochimique. Les cellules se trouvent dans une situation analogue à celle de racines soumises à une nutrition ammoniacale stricte. L'entrée d'ions NH_4^+ s'accompagne d'une extrusion de protons qui, dans le sol, peuvent être neutralisés, lessivés ou échangés contre des cations du complexe absorbant. Dans la fiole de culture, la situation est différente ; les H^+ sont d'abord neutralisés par le MES, mais lorsque le pouvoir tampon de celui-ci est aboli, ils s'accumulent dans le milieu d'où ils ne peuvent être évacués ; le facteur limitant est donc la capacité d'accueil du compartiment externe, soit 200 ml.

Le problème se pose différemment lorsque le nutriment azoté est la glutamine⁻ ; sa désamidation n'entraîne pas la libération d'un radical NH_4^+ mais entre dans une chaîne métabolique dont les enzymes sont contenues dans les cellules du Silène.

On peut donc se demander si les enzymes de la nutrition azotée en général et la nitrate réductase en particulier qui occupe une position clé dans la chaîne d'assimilation de l'azote, ne peuvent être utilisées comme marqueurs de la croissance cellulaire. Or dans les cellules du Silène, il est extrêmement difficile de dissocier les deux aspects de cette croissance, à savoir, division et grandissement cellulaire. Les valeurs de l'index mitotique sont en effet très faibles (3 % environ) ; la privation de 2,4 D pendant un cycle de culture ou l'application de chocs thermiques sont bien capables d'améliorer la synchronisation des divisions cellulaires (DUBOIS, 1980) mais la proportion de cellules qui se divisent simultanément reste trop faible pour permettre la recherche d'une corrélation entre un métabolisme et la position des cellules dans le cycle cellulaire.

Pourtant nos résultats montrent que le pic d'activité nitrate réductase se situe entre une phase de synthèse précoce d'ARN (6ème heure) dont une partie est vraisemblablement messagère et le moment où l'index mitotique est le plus élevé et où les cellules sont petites et riches en cytoplasme (5ème - 6ème jour). Le maximum d'activité nitrate réductase pourrait donc correspondre à une phase d'activation cellulaire qui précède les phénomènes de la division proprement dite.

La diminution puis l'arrêt de l'activité nitrate réductase ont lieu pendant la phase de croissance exponentielle, ce qui nous a toujours beaucoup frappé dans la mesure où il nous semblait logique que la réduction du nitrate accompagnât la synthèse des protéines nécessaires à cette croissance. Or, des observations fortuites, nous avaient montré que l'activité nitrate réductase augmentait et s'étalait davantage dans le temps, chaque fois que la croissance cellulaire était ralentie. L'introduction d'acide abscissique qui est un retardateur de la croissance, dans le milieu de culture, provoque effectivement un ralentissement de la croissance cellulaire et permet le maintien d'une activité nitrate réductase élevée. Une action identique de l'acide abscissique a également été montrée chez la Pomme de terre (PALMER, 1985). Il serait évidemment intéressant de savoir si l'hormone induit une synthèse accrue de l'enzyme ou si l'activité est augmentée parce que le système de réduction dispose d'un potentiel énergétique plus important à cause de l'inhibition de croissance. Nous avons en effet montré que la source du pouvoir réducteur de la nitrate réductase du Silène est essentiellement le NADH. Un ralentissement de la croissance pourrait entraîner une utilisation moindre du nucléotide dans les phénomènes respiratoires par exemple, et favoriser de ce fait la réduction du nitrate. Le NADPH quant à lui n'est éventuellement utilisé qu'en quantité réduite et dans des conditions de pH très strictes. Si l'activité NADPH nitrate réductase

existe vraiment, elle n'est détectable que du 2ème au 5ème jour.

Il apparaît donc que l'activité nitrate réductase peut être régulée à la fois au niveau génétique et métabolique.

3) Induction de la nitrate réductase.

La position très particulière du pic d'activité nitrate réductase dans le cycle de croissance cellulaire, nous a très rapidement amené à considérer que l'enzyme du Silène était induite par son substrat. L'apparition de l'activité après l'addition de NO_3^- exige en effet toujours une certaine phase de latence. Par ailleurs, et malgré les réserves que l'on est en droit d'émettre quant à la non spécificité de leur action, l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription ou de la traduction nous a d'abord conforté dans cette opinion qui nous semblait d'autant plus légitime qu'une foule de travaux employant les mêmes méthodes d'analyse avait été effectuée sur d'autres matériels et était arrivée à la même conclusion (pour revue voir HEWITT, 1975). Il faut par ailleurs reconnaître que la nature inductible des nitrate réductases du Tabac, de *Neurospora crassa* ou de l'Orge repose sur des expériences extrêmement concluantes de ZIELKE et FILNER (1971), de AMY et GARRETT (1980) ou de SOMERS et al., 1983 qui ont employé soit des méthodes de marquages isotopiques, soit des techniques immunologiques.

Or, c'est précisément l'utilisation d'anticorps dirigés contre la nitrate réductase du Silène qui nous a fait douter de notre conclusion. Nous avons en effet montré, l'existence d'antigènes reconnus par ces anticorps dans des cellules qui n'ont plus d'activité nitrate réductase, soit parce qu'elles sont en fin de croissance exponentielle ou même en phase stationnaire, soit parce qu'elles ont été cultivées en présence d'ammonium ou de glutamine. Or, HEIMER et RIKLIS (1979) avaient conclu à une régulation

post transcriptionnelle de la nitrate réductase de cellules de Tabac et FUNKHOUSER et al., (1980) avaient, par des méthodes immunologiques, montré qu'une synthèse de nitrate réductase inactive avait lieu dans des Chlorelles cultivées en présence d'ammonium. Le problème de l'inductibilité de la nitrate réductase a donc rebondi continuellement depuis une dizaine d'années et s'est encore beaucoup compliqué avec la découverte de l'existence d'enzymes qui utilisent le NADH et le NADPH comme donneurs d'électrons et qui sont inductibles ou constitutives. L'exemple du Soja est particulièrement éloquent ; il possède en effet deux nitrate-réductases constitutives présentant une activité optimale à pH 6,5 dont l'une utilise préférentiellement le NADH comme source d'électrons et l'autre le NADPH (KLEINHOFŠ et al., 1985). On a obtenu par ailleurs un mutant qui ne possède pas ces enzymes mais qui peut, lorsque du nitrate est fourni, synthétiser une NADH : nitrate réductase dont l'activité est optimale à pH 7,5 (NELSON et al., 1984).

A quoi correspondent donc, chez le Silène, les antigènes reconnus par des anticorps de la nitrate réductase, dans des cellules dépourvues de toute activité ?

Représentent-ils une nitrate réductase constitutive, ou un précurseur synthétisé continuellement ?

Il est en effet possible que subsiste dans ces cellules une enzyme constitutive dont la synthèse se poursuit au cours des différentes étapes qui ont abouti à l'obtention de la suspension mais dont les propriétés catalytiques sont devenues obsolètes ou ont été mutées. L'activité NADPH nitrate réductase pourrait correspondre à une telle forme.

Chez l'Orge les semences de type sauvage n'ont pas de nitrate réductase bispécifique mais elle apparaît dans des mutants nar1 qui ont perdu l'activité NADH spécifique (DAILEY et al., 1982).

Mais l'existence d'une enzyme constitutive à NADH n'est pas à exclure. Au cours d'expériences que nous n'avons pas voulu rapporter ici et qui consistaient à mesurer la durée de vie de la nitrate réductase de cellules de Silène cultivées en présence de puromycine ou de tungstate de sodium, nous avons souvent (mais pas toujours) obtenu des courbes biphasiques ; l'activité NADH nitrate réductase chutait d'abord brutalement puis diminuait ensuite beaucoup plus lentement. On pouvait alors supposer que l'activité globale résultait de l'action de deux populations moléculaires l'une à durée de vie courte (30 minutes environ), l'autre à durée de vie beaucoup plus longue (une dizaine d'heures). Cependant la mesure de l'activité méthyl viologène dans des gels d'électrophorèse effectuée dans des conditions non dénaturantes, pas plus que la recherche de l'enzyme par des anticorps monoclonaux après transfert des protéines sur des feuilles de nitrocellulose ne nous ont permis de déceler plusieurs formes.

Une autre éventualité est que les cellules de Silène possèdent une apoprotéine ou une sous unité enzymatique constitutive. En effet le précurseur synthétisé par les Chlorelles cultivées en présence d'ammonium serait en fait une "démolybdo cytochrome c réductase" (FUNKHOUSER et Col., 1983) et l'assemblage de l'enzyme nitrate réductase active exigerait l'intervention d'un activateur (VENNESLAND, 1980). Chez l'Orge l'enzyme posséderait une sous-unité constitutive (KAPLAN et Col., 1984).

L'existence d'un précurseur constitutif qui pourrait être l'apoenzyme ou une sous-unité n'est donc pas à exclure chez le Silène, d'autant plus que l'identité antigénique observée avec les anticorps polyclonaux est totale, que les extraits aient été effectués à partir de cellules cultivées en présence de nitrate ou d'ammonium, et qu'une légère activité cytochrome c réductase a été mise en évidence dans des cellules cultivées avec de l'ammonium.

La régulation du cofacteur molybdique est mal connue chez les végétaux supérieurs, mais dans les cellules de Tabac, le nitrate induirait sa synthèse qui précéderait l'induction enzymatique proprement dite de 24 heures (MENDEL et al., 1982). Enfin les variations de la capacité donatrice du facteur molybdique modifiaient l'activité nitrate réductase de plantules d'Orge (NARAYANAN et al., 1984). Des essais de restauration de l'activité nitrate réductase de cellules de Silène après 9 jours par la fourniture de molybdène et d'acide folique (précurseur de la ptérine) ont échoué. Par ailleurs les essais de réinduction de l'activité par l'apport de Mo seul n'ont guère été concluants (POULLE, 1979).

La perte de l'activité nitrate réductase du Silène ne semble donc pas être due à un déficit en cofacteur molybdique.

L'induction de la nitrate réductase pourrait donc exiger la synthèse d'un activateur ou d'un facteur d'assemblage de l'enzyme.

La régulation de cette enzyme est donc particulièrement complexe à comprendre, d'autant plus que dans certaines plantes, elle s'effectue selon des modes différents dans divers organes. Chez les plantules de Blé par exemple l'enzyme est synthétisée dans les racines mais activée par le flux de nitrate dans les feuilles (SOUALMI-BOUJOMAA et al., 1985).

4) Régulation par les produits de la réduction : ammonium et glutamine.

Des effets inducteurs ou represseurs de la nitrate réductase ont été attribués à l'ammonium. Mais un rôle important de régulation de la nitrate réductase et de la chaîne d'assimilation de l'azote dans son ensemble a aussi

été dévolu à la glutamine et à la glutamine synthétase (voir chapitre Historique).

Lorsque les cellules de Silène sont soumises à une alimentation ammoniacale stricte, l'activité nitrate réductase ne s'exprime pas mais nous avons vu qu'elles contiennent un composant antigénique reconnu par les IgG anti-nitrate réductase. Les résultats sont exactement similaires lorsque l'azote est fourni sous la forme de glutamine.

Lorsque les cellules sont cultivées avec du nitrate l'addition d'ammonium inhibe, mais de façon transitoire, l'activité nitrate réductase mesurée *in vivo* ; mais NH_4^+ pas plus que la glutamine ne modifie l'activité *in vitro*, il a au contraire tendance à stabiliser l'enzyme. Cette action protectrice de NH_4^+ vis à vis de l'activité nitrate réductase a souvent été observée et l'addition de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)$ a des extraits cellulaires gardés au froid prolonge notablement la durée de l'activité.

Autrement dit et contrairement à ce qui avait été montré chez *Cyanidium caldarium* (RIGANO et al., 1980), ni l'ammonium, ni la glutamine n'exercent d'inhibition allostérique de la nitrate réductase. Comme le mode d'action de l'ammonium sur l'activité enzymatique n'est pas modifié en présence de cycloheximide ou de 6 méthylpurine on peut exclure une intervention de NH_4^+ au niveau de la traduction et de la transcription. Il faut donc rechercher un autre type de régulation de la nitrate réductase par l'ammonium. Or de nombreux travaux concluent à une intervention sur les mécanismes de perméation du nitrate (OAKS et HIREL, 1985).

En nutrition nitrique, le nitrate disparaît régulièrement du milieu et s'accumule d'abord légèrement dans les cellules avant d'être métabolisé par la nitrate réductase. En fin de culture, en phase stationnaire, la cellule stocke une certaine quantité de NO_3^- qui participe très vraisemblablement à l'équilibre des charges et au maintien de la pression

osmotique . Or, en nutrition mixte (NO_3NH_4), l'ammonium est absorbé très rapidement sans doute parce qu'il est fortement diffusible alors que l'ion NO_3^- bien qu'étant lipophile est transporté activement. Le NH_4^+ intracellulaire est métabolisé rapidement par l'intermédiaire de la GDH en particulier, mais il retarde l'apparition de l'activité nitrate réductase. Nous avons donc été amenés à étudier l'action des enzymes assimilatrices de l'azote ammoniacal et en particulier la glutamate deshydrogénase et la glutamine synthétase qui régulent deux voies métaboliques différentes.

5) Régulation des activités GS et GDH selon le mode de nutrition azotée.

Lorsque les cellules sont cultivées en présence de nitrate seul, l'activité glutamate deshydrogénase reste sensiblement constante pendant toute la durée de la culture. L'activité de la GS par contre, augmente immédiatement et reste élevée pendant toute la phase de croissance exponentielle; elle ne chute que pendant la phase stationnaire. Apparemment GDH et GS assimilent sensiblement la même quantité d'ammonium. Dans les suspensions cellulaires de Tabac, de Rosier ou de l'Erable l'activité de la voie GS-GOGAT, prédomine (SKOKUT et al., 1978 ; MOHANTY et FLETCHER, 1980 ; FOWLER et BARKER, 1979). On peut donc se demander si le Silène est un cas particulier et si les deux voies sous le contrôle de la GDH et de la GS sont utilisées indifféremment. Or, la différence d'affinité des deux enzymes pour l'ammonium est importante ; le K_m de la GDH pouvant varier de 5 à 40 mM alors que celui de la GS est inférieur à 0,5 mM (LEA et MIFLIN, 1976). Les cellules dans les conditions habituelles de la culture ne contiennent pas suffisamment de NH_4^+ pour permettre la synthèse de glutamate. Il faut donc tenir compte de la manière dont est effectuée la mesure ; le milieu d'incubation contient en effet du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 150 mM. Il n'est donc pas surprenant qu'une forte activité GDH soit mesurable, elle est de toute évidence surévaluée ; d'autre part ces conditions de mesure orientent la réaction dans le sens de l'assimilation de l'ammonium c.a.d. vers la formation

d'acide glutamique, mais il est très possible que dans la cellule l'enzyme catalyse la réaction inverse : l'oxydation du glutamate (STEWART et al., 1980). Pour tenter d'éclaircir ce point nous avons mesuré les activités GS et GDH de cellules cultivées en présence d'ammonium et nous avons par ailleurs fait agir des inhibiteurs de la voie GS-GOGAT afin de voir si la GDH voyait son activité augmenter.

Lorsque le nutriment azoté des cellules de Silène est l'ammonium, celui-ci est absorbé très rapidement et l'activité GDH augmente immédiatement ; la GS est par contre sensiblement inhibée soit parce que le substrat sature les sites catalytiques, soit parce qu'elle est soumise à une rétroinhibition cumulative par les produits qu'elle engendre. Cet effet dépressif de l'ammonium sur l'activité GS s'observe également chez la suspension cellulaire du Rosier (MOHANTY et FLETCHER, 1980) mais aussi chez la lentille d'eau (RHODES et al., 1976), le Maïs (OAKS et al., 1980) ou le Lupin (RATAJCZAK et al., 1981). Cependant chez le Tournesol (WEISSMAN, 1972) ou le Concombre (KRETOVICH et al., 1981) l'ammonium augmente l'activité.

L'apport brutal d'ammonium s'accompagne très souvent chez la plupart des végétaux supérieurs d'un accroissement considérable de l'activité GDH qui, intervenant dans le sens de l'assimilation, pourrait jouer un rôle de détoxication de la cellule (GIVAN, 1979).

Cette opinion est aussi celle de FOWLER et BARKER (1979) puisque le transfert de cellules d'Erable dans un milieu tamponné se traduit par une augmentation de l'activité GDH et une absence de croissance ; celle-ci exigerait le fonctionnement simultané de la GDH et de la GS. Chez le Silène nous pouvons admettre ce rôle de détoxication de la glutamate deshydrogénase dont l'activité est également accrue en présence de NO_3NH_4 , mais elle ne s'accompagne pas, nous l'avons vu, d'un arrêt de la croissance.

La voie naturelle de l'assimilation de l'ammonium dans les cellules de Silène est donc selon toute vraisemblance, celle de la GS-GOGAT. En effet la fourniture à des concentrations très faibles, de MSX ou d'azaserine, à des cellules cultivées avec du nitrate provoque en quelques jours la mort des cellules. En présence d'azaserine ou de MSX, la nitrate réductase est fortement inhibée. La MSX ne modifie pas la perméation du nitrate qui s'accumule dans la cellule, elle inhibe l'activité de la GS mais n'a pas d'action sur l'activité GDH. Pourtant de l'ammonium s'accumule dans les cellules qui en rejettent une partie dans le milieu. Cette observation suscite au moins deux questions. Quelle est l'origine du NH_4^+ produit ? Quel rôle joue la GDH ?

Chez les plantes qui photosynthétisent coexistent un cycle de réduction et un cycle d'oxydation du carbone. Ces deux voies sont liées à la nature particulière de la ribulose disphosphate carboxylase (RUBISCO) qui possède une fonction de carboxylase et une fonction oxygénase. Le cycle oxydatif du carbone conduit à la formation de glycolate qui donne naissance à de la glycine, qui est un précurseur de la serine. Celle-ci se forme dans la mitochondrie à partir de deux molécules de glycine. Cette synthèse s'accompagne du dégagement de CO_2 (photorespiration) et de NH_3 . Ce dernier, sous l'action de la GS se retrouve finalement dans la glutamine. Lorsque la GS est inhibée, l'ammonium est libéré dans la cellule puis excrété dans le milieu externe. Or, ce métabolisme de la serine a récemment été mis en évidence dans les cellules non chlorophylliennes de Carotte (WHATLEY et al., 1986) et dans des protoplastes de Tabac qui ont perdu toute aptitude à la photosynthèse (NEEMAN et al., 1985). Le fonctionnement de cette chaîne métabolique dans les cellules de Silène, peut parfaitement bien expliquer l'apparition de NH_4^+ après un traitement par la MSX. En l'absence de l'inhibiteur l'ammonium est utilisé par la GS pour fabriquer

de la glutamine.

Quant au rôle de la GDH, nos résultats indiquent qu'elle catalyse plutôt l'oxydation du glutamate que l'assimilation de l'ammonium. Le glutamate peut provenir soit de la désamination de la glutamine par la GOGAT, soit de la protéolyse. La mesure de la teneur en protéines de cellules cultivées avec du nitrate ou avec du nitrate et de la MSX ne révèle aucune différence significative. Les protéines ne semblent donc pas constituer une source importante de glutamate, même si l'hypothèse d'un certain turnover protéique en présence de la MSX ne peut être totalement écartée.

La source essentielle du glutamate est selon toute vraisemblance la glutamine qui semble bien être un métabolite essentiel des cellules de Silène. Toutes nos observations concourent à conforter ce point de vue. Le transfert des cellules prélevées en phase stationnaire aboutit à l'apparition immédiate de l'activité GS. Lorsqu'une cellule végétale dispose d'une quantité importante d'hydrate de carbone et de beaucoup d'ATP, l'asparagine synthétase est inhibée et c'est la voie GS-GOGAT qui assimile l'ammonium. C'est cette voie qui est utilisée par les cellules de Silène. La culture des cellules en présence de glutamine ne modifie guère l'activité GS mais augmente l'activité de la GDH sans doute parce que la voie glycolate-sérine est stimulée. Même si elle provoque des effets secondaires que l'on ne peut négliger, l'introduction d'azaserine dans le milieu qui contient de la glutamine provoque la mort des cellules qui sont devenues incapables d'utiliser la glutamine. Des résultats obtenus pendant la rédaction de ce mémoire indiquent par contre que les cellules sont capables de croître en présence de glutamine et de la MSX : la biomasse formée est légèrement inférieure à celle obtenue en présence de glutamine seule.

L'acide glutamique exerce une inhibition sur la GS, et n'est pas capable d'assurer la survie cellulaire lorsque la voie GS-GOGAT est bloquée. Lorsque la GS seule est inhibée et



que de la glutamine est fournie, l'assimilation de l'azote peut se faire et la GOGAT joue sans doute son rôle de fournisseur de glutamate ; l'inhibition de la GS permettrait le fonctionnement de la chaîne aspartate-asparagine. Que la croissance de la suspension puisse se dérouler à peu près normalement lorsque le milieu contient de la glutamine et de la MSX laisse supposer une intervention de la voie de l'acide aspartique.

La glutamine et (ou) le système GS-GOGAT contrôle donc vraisemblablement la voie assimilatrice de l'azote dans les conditions habituelles de culture des cellules de Silène. L'inhibition de cette chaîne métabolique par la MSX permettrait la mise en route ou l'exaltation d'autres réactions et en particulier celle qui conduit à la formation d'asparagine.

Comment la glutamine peut elle réguler l'activité nitrate réductase ? Elle ne la modifie pas *in vitro* mais l'annule *in vivo*. Son contrôle ne s'exerce donc pas directement sur la protéine enzymatique, mais passe certainement par la voie génétique. La glutamine et plus vraisemblablement la glutamine synthétase sont en effet des régulateurs de la nitrate réductase de *Neurospora* (DUNN COLEMAN et Col., 1979 ; PREMAKUMAR et al., 1980). Dans des cellules de Tabac, une mutation dans la région de la GS provoque une diminution de l'activité GS mais un accroissement de l'activité nitrate réductase (A. NATO, communication personnelle rapportée par OAKS et HIREL, 1985).

6 - Glutamine synthétase, glutamate deshydrogénase : modifications enzymatiques au cours de la croissance et de la différenciation

Chez les végétaux supérieurs, la glutamine synthétase présente généralement plusieurs isoenzymes qui possèdent des caractéristiques cinétiques et des propriétés immunologiques

différentes ; elles sont séparables par leur charge mais non par leur masse moléculaire, et sont constituées de huit sous-unités. Dans les racines la glutamine synthétase est cytoplasmique (SUZUKI et al., 1981) ; dans les feuilles elle se trouve dans les chloroplastes et dans le cytosol (HIREL et GADAL, 1980). Chez le Riz, l'enzyme chloroplastique diffère de la forme cytosolique foliaire elle même différente de l'enzyme cytosolique racinaire (HIREL et al., 1984). Cette diversité du spectre isoenzymatique se retrouve chez le Haricot où 5 isoformes ont été individualisées : 2 dans les nodules, 2 dans les feuilles et une dans les racines. Ces enzymes sont apparemment contrôlées par une famille multigénique comprenant au moins quatre gènes possédant des séquences hétérologues. L'existence d'holoenzymes différentes dans les racines, les feuilles et les nodules pourrait s'expliquer par une expression spécifique des gènes dans un type déterminé d'organe (CULLIMORE et al., 1984).

Pour assimiler l'ammonium qui, selon les tissus, pourrait être généré par des voies métaboliques particulières, les végétaux supérieurs auraient adopté une stratégie qui consiste à exprimer un gène particulier dans une situation donnée.

Chez le Silène, comme dans d'autres matériels non photosynthétiques (SUZUKI et al., 1981, HIREL et al., 1984) la GS ne présente qu'une seule forme décelable soit par électrophorèse en gel de polyacrylamide effectuée en conditions non dénaturantes, soit par chromatographie sur DEAE-cellulose ; par sa position sur l'élutogramme elle serait cytoplasmique et s'apparenterait aux GS racinaires. Nous avons montré que l'activité de la glutamine synthétase s'exprime continuellement pendant la culture et les tentatives que nous avons effectuées pour étudier l'inductibilité de l'enzyme ont échoué sans doute parce qu'il est impossible d'empêcher totalement la production d'ammonium endogène. Il est donc difficile, sinon impossible d'utiliser la glutamine synthétase comme marqueur de la croissance des cellules de Silène.

Alors que l'ammonium induit la synthèse *de novo* de la glutamate deshydrogénase (MAZUROVA et al., 1980), du Lupin, il l'active chez le Maïs (GASPARIKOVA et al., 1976 ; OAKS et al., 1980).

Chez l'Euglène, où l'enzyme catalyse la réaction d'oxydation du glutamate, le contrôle est également post-transcriptionnel (PARKER et al., 1985). Si la GDH n'exerce pas de rôle important dans la chaîne assimilatrice d'azote, elle n'en demeure pas moins intéressante par les variations de son spectre isoenzymatique lorsque les conditions de culture changent.

Comme la GS, la GDH est active pendant toute la durée de la culture des cellules de Silène et quel que soit le nutriment azoté, mais le nombre d'isoformes varie avec l'âge des cultures et avec la forme sous laquelle l'azote est fourni. Cet hétéromorphisme est souvent observé chez les plantes supérieures et les modifications des isoenzymes accompagnent fréquemment la croissance cellulaire ou le développement d'un organisme, mais la présence d'une isoenzyme commune à différents organes a été observée chez le Pois (NAUEN et HARTMAN, 1980) ou le Carthame (ERREL et al., 1973).

Chez le Blé deux isoformes de la GDH ont été caractérisées : l'une prédomine dans les feuilles jeunes, l'autre dans les feuilles plus âgées de plantes mises à l'obscurité ; cette seconde forme pourrait être un marqueur de la senescence (LAURIERE et Col., 1981). L'un des exemples les plus frappants de la multiplicité des isoenzymes de la GDH a été décrit chez la Luzerne, où l'on a observé 7 formes dans les pièces florales et 28 dans le grain de pollen. Ce foisonnement extraordinaire résulterait de l'association au hasard de 2 ou 3 sous-unités qui s'organisent en une structure hexamérique (DE VIENNE, 1983). Le passage d'un profil isoenzymatique de type 7 à un type 28 serait lié à la synthèse d'une sous-unité particulière au cours de la gamétogénèse (DE VIENNE, 1985). Cette abondance d'isoformes dans

le pollen peut trouver une explication finaliste extrêmement séduisante et apaisante pour les esprits inquiets : l'acide glutamique est l'acide aminé le plus abondant dans le style de l'Oenothère ; sa teneur chute brutalement lorsque le pollen germe sur le stigmate et pénètre le style (LINDER et LINSKENS, 1972) : l'oxydation du glutamate catalysée par des GDH fournirait l'énergie nécessaire à la croissance du tube pollinique ... (DE VIENNE, 1985).

Chez le Silène, deux isoenzymes sont constamment présentes pendant toute la culture et quelle que soit la source d'azote ; la troisième est variable et n'est jamais présente en nutrition ammoniacale. Sa disparition pourrait correspondre à une répression catabolique. A moins qu'elle ne représente une enzyme ne fonctionnant que dans une voie métabolique particulière inhibée par l'ammonium.

La GDH pourrait donc constituer un signal intéressant dans l'étude d'une régulation de la nutrition azotée de cellules de Silène soumises à des régimes nutritionnels particuliers.

7) Nitrate réductase et différenciation organogène chez la Chicorée de Bruxelles

Le fil conducteur de notre travail était donc la recherche de protéines, de préférence enzymatiques, caractéristiques d'un organe donné et qui pourraient servir de marqueurs de la différenciation. Cette démarche ne paraissait pas utopique puisque les anticorps d'un immunosérum dirigé contre les protéines de cals de Tabac cultivés *in vitro*, reconnaissent un nombre extrêmement variable d'antigènes selon l'état de différenciation des cellules d'un explant (BOUTENKO et VOLODARSKI, 1968). Par ailleurs l'existence de protéines à arabino-galactanes spécifiques de tissus et d'organes de la Tomate sauvage a encore été démontrée récemment par des méthodes immunologiques (VAN HOLST et CLARKE, 1986). Enfin les cellules d'une suspension cellulaire de Carotte, cultivées en présence de 2,4 D donnent naissance à de petits amas qui possèdent une potentialité embryogénèse qui ne se manifeste vraiment qu'en absence du facteur hormonal (HALPERIN et JENSEN, 1967). Le transfert de telles cellules dans les conditions propices à l'embryogénèse somatique induit dès les premières heures un accroissement de la synthèse d'ARN poly A⁺ (SENGUPTA et RAGHAVAN, 1980) mais aussi l'apparition de deux "protéines embryonnaires" plusieurs jours avant que les embryons ne soient visibles. Ces protéines sont également synthétisées dans les embryons zygotiques mais jamais dans des lignées cellulaires incapables de donner des embryons (SUNG et OKIMOTO, 1981).

Les résultats obtenus chez l'Endive montrent que l'activité nitrate réductase est toujours intense dans les racines jeunes, qu'elles soient produites au cours de la culture *in vitro*, du forçage de racines tubérisées ou qu'elles résultent tout simplement de la germination de semences ; elle est par contre inexistante dans les jeunes feuilles vertes, ou dans les feuilles étiolées du chicon. De là à conclure que la nitrate réductase est un marqueur potentiel de la rhizogénèse, la tentation est grande. Elle l'est d'autant plus que

des résultats sensiblement similaires ont été obtenus chez des plantules de Haricot. L'ablation de leurs hypocotyles et de leurs racines permet d'obtenir des pousses feuillées qui après un traitement par de l'AIA reforment des racines ; on constate alors un accroissement de l'activité nitrate réductase avant l'émergence des racines à un moment où s'effectue une synthèse importante de protéines nécessaires à la rhizogenèse (BURZYNSKI, 1975 ; BURZYNSKI et al., 1982)

Dans les explants racinaires de la Chicorée de Bruxelles, l'initiation organogène est caractérisée par deux phases (VASSEUR et ROGER, 1983). La première qui dure environ 24 heures consiste en une activation cellulaire qui voit la transformation de cellules quiescentes (donc en G₀ ou G₁) en cellules qui se réengagent dans un cycle cellulaire et synthétisent de l'ARN, des protéines et de l'ADN. La seconde est une phase préparatoire à la différenciation organogène ; les synthèses d'ARN et de protéines sont importantes et l'aboutissement est l'apparition, après 3 jours de culture, de nodules méristématiques.

Comme la mise en culture des explants induit des synthèses protéiques décelables dès la 2^{ème} heure de culture et qui atteignent un maximum vers la 10^{ème} heure, la nitrate réductase est l'une des protéines synthétisées dès la reprise d'activité des cellules quiescentes. Quant à l'ARN, son activité spécifique présente deux pics situés après 8 h et 14 ou 15 heures de culture. Comme seule la synthèse globale a pu être mesurée (VASSEUR et ROGER, 1983), il n'est pas possible de déterminer la proportion des différents types d'ARN concernés. Or l'addition de cycloheximide, de 6 méthyl purine ou de cordycepine, dès la mise en culture des explants inhibe l'apparition de l'activité nitrate réductase. Autrement dit l'activation cellulaire s'accompagne donc d'une reprise de la transcription des gènes de la nitrate réductase.

La mise en culture de tissus racinaires induit donc la nitrate réductase. Si l'on admet que l'un des facteurs de l'induction est l'ion NO_3^- , le nitrate endogène doit participer au phénomène, puisque la mise en culture d'explants sur de l'eau stérile permet l'expression d'une activité nitrate réductase. L'excision des tissus pourrait donc déclencher une synthèse de novo de l'enzyme, ce qui n'est pas surprenant puisque nous avons vu précédemment que l'excision de racines de Fève, modifie qualitativement et quantitativement la population des ARN messagers et la protéosynthèse de ces tissus (ESNAULT, 1985).

L'activité de la nitrate réductase apparaît donc dès le début de la phase d'activation cellulaire et culmine vers la 48ème heure peu avant l'apparition des nodules méristématiques ; il est donc difficile de discerner si la synthèse de la nitrate réductase ne concerne que l'activation cellulaire ou si elle est également impliquée dans le programme organogène qui est une suite d'évènements métaboliques formant une séquence ordonnée.

L'activation cellulaire pourrait résulter bien plus de l'excision, que de la rupture des corrélations qui régissent la vie d'une cellule dans un organe.

La conception de MEYER (1985) selon laquelle "les cultures de tissus végétaux supérieurs sont une forme amplifiée et maîtrisée du cal de cicatrisation qui apparaît spontanément à la suite de blessures de la plante" nous paraît en effet très séduisante. Si les "hormones de blessure" sont de petits polysaccharides pariétaux (ALBERSHEIM et DARVILL, 1985). On peut concevoir que l'excision libère des oligosaccharines qui activent les cellules quiescentes.

La question est ensuite de savoir ce qui va déterminer l'émergence d'un type défini d'organe. Que la nature du milieu nutritif "sculpte" la structure en devenir paraît évident, mais est ce le seul facteur qui intervienne ? Pourquoi l'activité nitrate réductase s'exprime-t-elle dans les jeunes racines et non dans les jeunes feuilles ? Si les gènes de la nitrate

réductase sont dérèprimés au cours de l'activation, qu'est ce qui va annuler leur expression dans une structure organisée et non pas dans une autre ?

L'analyse fine de ces évènements est d'autant plus difficile que les explants racinaires constituent un système biologique extrêmement complexe. Les tissus mis en culture sont hétérogènes et les cellules qui vont se différencier ne représentent qu'une masse infime de l'explant.

La recherche d'un système plus homogène et capable de se différencier était donc souhaitable.

En l'absence d'une suspension cellulaire embryogène de Chicorée qui aurait l'avantage d'être homogène et de produire rapidement des quantités importantes de structures différenciées, nous avons encouragé l'étude de la différenciation organogène par des protoplastes d'Endive. La régénération de plantes à partir de protoplastes foliaires a été réussie (SAKSI, 1985). Il n'a malheureusement pas été possible de suivre l'évolution de l'activité nitrate réductase au cours d'un cycle complet de développement. Nous avons cependant pu déceler une activité NADH et NADPH nitrate réductase dans des protoplastes de 24 heures, alors qu'elle était nulle dans les cellules mésophylliennes.

La transformation d'une cellule foliaire bloquée au stade Go en protoplaste, permet donc l'expression d'une potentialité de réduction du NO_3^- . Le résultat est d'autant plus intéressant, qu'il semble bien que l'enzyme utilise aussi bien le NADH que le NADPH comme donneur d'électrons. Or, l'étude récemment entreprise au laboratoire de l'évolution de l'activité nitrate réductase d'une suspension cellulaire de Chicorée obtenue à partir de cals racinaires a montré que cette enzyme n'utilise que le NADH (CHRAIBI, communication personnelle). Il serait donc intéressant de comparer les enzymes foliaires et racinaires qui pourraient bien être deux formes différentes de la nitrate réductase.

L'évolution des microcals issus de la division des protoplastes est, elle aussi, conditionnée par la composition du milieu de culture et la capacité de régénération organogène dépend en particulier de la nature du nutriment azoté (La quantité d'azote fourni est toujours de 840 mg. l^{-1} de milieu). La glutamine seule ou associée à NO_3NH_4 inhibe la néoformation d'organes, l'activité nitrate réductase mais permet une prolifération cellulaire intense et rapide. Lorsque le nitrate constitue l'unique source azotée, 45 % des cals sont organogènes, une activité nitrate réductase mesurée in vivo est mesurable ($50 \mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ M F}$) mais les cals se nécrosent très rapidement. Lorsque le nitrate est associé à l'ammonium (NO_3NH_4) 20 % seulement des cals sont organogènes, la prolifération cellulaire se poursuit et l'activité nitrate réductase est plus élevée qu'en présence de nitrate seul ($61 \mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ M F}$). Si la teneur en nitrate d'ammonium est diminuée de moitié l'activité nitrate réductase est diminuée de 60 % ; la disponibilité en azote minéral conditionne donc l'intensité de la réponse enzymatique.

Le "système protoplaste" ressemble donc beaucoup au "système explant" ; comme celui-ci, il comprend une phase d'activation cellulaire qui résulte d'un traumatisme : la digestion enzymatique de la paroi pourrait libérer des oligosaccharines responsables du recyclage de cellules arrêtées en G_0 (MEYER, 1985). Le système protoplaste nous paraît inadéquat pour étudier la différenciation organogène : d'une part les délais d'apparition d'un organe sont plus longs que chez un explant tissulaire, d'autre part les pourcentages de régénération d'une plante entière restent faibles (quelques % dans les meilleurs cas). Il est par contre extrêmement précieux pour aborder l'étude de la réactivation cellulaire. L'obtention de protoplastes en nombre important est en effet facile ; d'autre part ils synthétisent très rapidement des protéines différentes de celles des cellules mésophylliennes (MEYER, 1985) et ces modifications résultent de la synthèse d'un nouveau lot d'ARN

messagers et non pas de changements post-transcriptionnels (FLECK et al., 1982). Ils constituent donc un bon matériel pour l'étude de la régulation génique de l'activation cellulaire.

A moins d'obtenir rapidement une suspension cellulaire embryogène de l'Endive, l'étude de la différenciation organogène pourrait, malgré les inconvénients que nous avons décrits, être poursuivie avec les explants racinaires. La purification de la nitrate réductase de la Chicorée a en effet récemment été entreprise à partir de suspensions cellulaires d'origine racinaire ; elle devrait aboutir prochainement. La fabrication d'un immunosérum spécifique de la nitrate réductase de *Cichorium intybus* serait alors facile. Nous disposerons alors de nombreux moyens pour aborder l'étude de la différenciation organogène.

S'ils ne chantent pas encore à tue-tête, les lendemains n'en sont pas pour autant complètement aphones !

C O N C L U S I O N S

*Si terrible que soit la
vie, l'existence de l'activité
créatrice sans autre but qu'elle
même suffit à la justifier.*

ELIE FAURE
(*L'esprit des formes*)

La nitrate réductase des cellules de Silène est une NADH : nitrate réductase. Le NADH nécessaire à la réduction du nitrate provient essentiellement de la glycolyse. Les constantes d'affinité pour le donneur d'électrons et le nitrate sont respectivement : $11. 10^{-6}M$ et $15. 10^{-4}M$. Ces valeurs sont voisines de celles observées chez d'autres végétaux (voir GUERRERO et al., 1981).

L'accroissement de l'activité nitrate réductase qui accompagne un ralentissement de la croissance en début de culture peut s'expliquer par une diminution de la consommation énergétique des cellules et une disponibilité accrue en NADH. Inversement la chute de l'activité en présence d'ammonium pourrait être la conséquence d'une consommation accrue de pouvoir réducteur.

L'emploi de méthodes immunologiques montre que la nitrate réductase du Silène présente une structure particulière : des anticorps fabriqués contre la nitrate réductase d'Epinard sont incapables de la précipiter mais inhibent très fortement son activité.

Par contre des anticorps monoclonaux fabriqués contre les deux enzymes présentent des réactions croisées.

La nitrate réductase d'Epinard et de Silène possèdent donc des épitopes communs mais en quantité insuffisante pour provoquer des réactions de précipitation par immunodiffusion.

Ceci va nous amener à étudier plus précisément la structure de la nitrate réductase du Silène, ce que nous avons négligé jusqu'alors.

Des différences structurales ont été signalées chez une autre enzyme de la voie assimilatrice de l'azote : la glutamine synthétase : l'isoenzyme chloroplastique est glycolysée alors que l'isoforme cytosolique racinaire ne l'est pas (OAKS et HIREL, 1985). Bien qu'il soit généralement admis que la nitrate réductase se trouve dans le cytoplasme, on ne

peut s'empêcher de remarquer que l'enzyme d'Epinard est extraite de feuilles et que celle du Silène l'est de cellules qui possèdent des caractéristiques physiologiques de parenchyme racinaire.

Les résultats obtenus avec divers inhibiteurs de la traduction ou de la transcription plaident en faveur du caractère inductible de la nitrate réductase de Silène. L'emploi des méthodes immunologiques nous a obligé à reconsidérer ce point, puisque des formes antigéniques ont été détectées dans des cellules dépourvues d'activité enzymatique. Ou bien il existe une nitrate reductase constitutive, mais on peut s'interroger sur son rôle, ou bien une sous-unité ou l'apoenzyme entière, sont constitutives et sont des précurseurs de l'holoenzyme. L'induction consisterait alors en la synthèse d'une protéine régulatrice permettant l'assemblage des sous-unités de la transformation du précurseur en enzyme active.

Bien que divers auteurs aient avancé l'idée que la nitrate réductase fût sous le contrôle de la glutamine ou de la glutamine synthétase, nous ne possédons actuellement aucune information sur les gènes régulateurs de la nitrate réductase des végétaux supérieurs.

La glutamine synthétase des cellules de Silène est constamment active indépendamment de la nature de la source azotée ; elle est cependant partiellement inhibée par l'ammonium. Elle est présente sous une forme unique, vraisemblablement cytoplasmique, et présente des caractéristiques des glutamine synthétases racinaires. Son inhibition par la méthionine sulfoximine n'empêche pas la croissance si de la glutamine est fournie simultanément. Si la voie GS-GOGAT est par contre totalement bloquée les cellules meurent. Le fonctionnement de la GOGAT est donc essentiel pour la croissance cellulaire. Chez les levures, trois types de gènes régulent l'activité de la glutamine synthétase ; ils répondent respectivement aux variations de la glutamine,

des acidesaminés et des purines (MITCHELL et MAGASANIK, 1984).

L'étude de la régulation de la chaîne assimilatrice de l'azote nous a conduit à étudier aussi l'activité de la glutamate deshydrogénase. Dans les conditions habituelles de la culture, elle intervient plutôt dans des réactions d'oxydation du glutamate et ne joue apparemment aucun rôle dans l'assimilation de l'ammonium. En nutrition ammoniacale en revanche, elle catalyse une réaction d'assimilation et joue un rôle de détoxification ; alors que l'activité est multipliée par 2, une isoenzyme disparaît, peut être par répression catabolique.

Plutôt qu'une régulation de la nitrate réductase par la glutamine ou la GS, on peut très bien concevoir que les enzymes de l'assimilation de l'azote ; nitrate réductase, nitrite réductase, glutamine synthétase et glutamate synthase soient contrôlées par des gènes communs.

En effet, chez certaines levures, les gènes qui commandent la formation de spores ou la différenciation en un type sexué donné, sont régulés par des protéines codées par des gènes MAT. Chaque gène MAT code pour une protéine qui exerce une régulation sur tous les gènes de la différenciation en se fixant sur des séquences spécifiques d'ADN, situées en amont des gènes commandés (c.a.d. vers l'extrémité 5').

Ce modèle nous paraît tout à fait adéquat pour expliquer le fonctionnement ordonné d'une chaîne métabolique complexe ou la réalisation d'un programme organogène et constitue une hypothèse de travail intéressante.

La nitrate réductase peut-elle être finalement un marqueur de la croissance cellulaire ou de la différenciation organogène ?

Le transfert de cellules quiescentes de Silène dans un milieu neuf, entraîne une reprise de la croissance cellulaire, caractérisée par des synthèses importantes de protéines et d'acides ribonucléiques. Une synthèse d'ARN, dont 8 % sont polyadénylés intervient dès la 6ème heure de culture et précède de peu la reprise de l'activité nitrate réductase. L'induction de la nitrate réductase, telle que nous l'avons définie plus haut, est, selon toute vraisemblablement, l'un des signaux de l'activation cellulaire. En l'absence d'un taux de synchronisation élevé des premières divisions cellulaires, il est cependant difficile d'établir une relation simple entre la reprise de l'activité métabolique et l'un des deux aspects de la croissance, à savoir division et grandissement cellulaire.

Avec les connaissances acquises et les outils que nous possédons maintenant, nous sommes en mesure d'identifier les gènes de la nitrate réductase à l'aide de sondes d'ADN complémentaire .

Chez la Chicorée de Bruxelles, l'apparition d'une activité nitrate réductase dans des explants racinaires, cultivés *in vitro*, est également étroitement associée à la réactivation de cellules quiescentes, soudain soustraites de leurs corrélations trophiques et fonctionnelles. Par ailleurs, toutes nos observations tendent à prouver que la nitrate réductase est très probablement un marqueur de la différenciation rhizogène. L'étude, actuellement entreprise, de la régulation de l'activité nitrate réductase d'une suspension cellulaire d'Endive qui a conservé ses potentialités organogènes et qui, dans certaines conditions, peut ne différencier que des racines, devrait nous apporter une réponse sous peu.

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

- Afridi, M. M. R. K. et Hewitt, E. J., 1964. The inducible formation and stability of nitrate reductase in higher plants. I : Effects of nitrate and molybdenum on enzyme activity in Cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *J. Exp. Bot.*, 15 (44), 251-271.
- Ahmed, J. et Spiller, H., 1976. Purification and some properties of the nitrate reductase from *Ankistrodemus braunii*. *Plant Cell. Physiol.*, 17, 1-10.
- Albersheim, P. et Darvill, A., 1985. Les oligosaccharines. *Pour la Science*, 97, 18-26.
- Amy, N. K. et Garrett, R. H., 1980. Repression of nitrate reductase activity and loss of antigenically detectable protein in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 144, 232-237.
- Amy, N. K., Garrett, R. H. et Anderson, B. M., 1977. Reactions of *Neurospora crassa* nitrate reductase with NAD(P)H analogs. *Biochim. Biophys. Acta*, 480, 83-95.
- Amy, N. K., et Garrett, R. H., 1979. Immunoelectrophoretic determination of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Anal. Biochem.*, 95, 97-107.
- Aparicio, P. J. et Maldonado, J. M., 1979. Regulation of nitrate assimilation in photosynthetic organisms. In : Nitrogen assimilation of plants (Hewitt, E. J. and Cutting C. V. ed.). Academic Press : London, 207-215.
- Arst, H. N. Jr, Tollervey, D. W. et Sealy-Lewis, H. M., 1982. A possible regulatory gene for the molybdenum-containing cofactor in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1083-1093.
- 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.
- Aslam, M. et Oaks, 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.
- Aspart, L., Cooke, R. et Delseny, M., 1979. Stability of polyadenylic and polyadenylated RNA in radish (*Raphanus sativus*) seedlings. *Biochim. Biophys. Acta*, 564, 43-54.
- Backoula, E., Fournet, B., Lefebvre, R., Sobaszekiewicz, J. et Vasseur, J., 1984. Application de la chromatographie liquide à haute performance à la détermination des glucides intracellulaires de la racine de *Cichorium intybus* L. au cours de la production de chicons en forçage hydroponique et de la formation des bourgeons en culture in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 299, 827-829.
- Bahns, M. et Garrett, R. H., 1980. Demonstration of de novo synthesis of *Neurospora crassa* nitrate reductase during induction. *J. Biol. Chem.*, 255, 690-693.
- Bar-Akiva, A. et Sagiv, A., 1967. Nitrate reductase in the active plant : properties, assay condition and distribution within the plant. *Physiol. Plant.*, 47, 828-831.
- Batt, R. G. et Wallace, W., 1983. A comparison of the effect of trypsin and a maize root proteinase on nitrate reductase and other enzymes from maize. *Biochim. Biophys. Acta*, 744, 205-211.
- Baulcombe, D. C. et Key, J. L., 1980. Polyadenylated RNA sequences which are reduced in concentration following auxin treatment of soybean hypocotyl. *J. Biol. Chem.*, 255, 8907-8913.
- Bailey, J. M., King, J. et Gamborg, O. L., 1972. The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *Planta*, 105, 15-24.
- Beevers, L., 1981. Nitrogen metabolism in plants. In : Biology of inorganic nitrogen and sulfur metabolism. Bothe and Trebst ed. Springer Verlag, 16-29.
- Behrend, J. et Mateles, R. I., 1975. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. I: Effect of amino acids on growth. *Plant Physiol.*, 56, 584-589.
- Benzioni, A., Vaadia, Y. et Lips, H., 1970. Correlations between nitrate reduction, protein synthesis and malate accumulation. *Physiol. Plant.*, 23, 1039-1047.
- Benzioni, A., Vaadia, Y. et Lips, H., 1971. Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reductase products of the shoot. *Physiol. Plant.*, 24, 288-290.
- Bergmann, L., Grosse, W. et Koth, P., 1976. Einfluss von Ammonium und Nitrat auf Stickstoff-Metabolismus, Malatanhäufung und Malatenzym-Aktivität in Suspensions-Kulturen von *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' Zeit. *Pflanzenphysiol.* 80, 60-70.
- Blahova, M. et Segeta, V., 1980. Nitrate reductase activity in the course of cucumber leaf ontogenesis. *Biol. Plant.*, 22, 176-182.
- Böhme, H. J., Kopperschlager, G., Schulz, J. et Hofmann, E., 1972. Affinity chromatography of phosphofruktokinase using Cibacron blue F 3 G-A. *J. Chromatogr.*, 69, 209-214.
- Bonner, J. A., 1965. Development. In : Bonner, J. A. and Varner, J. E. eds., *Plant Biochemistry*. Academic Press New York, 850-856.
- Bourne, W. F. et Mifflin, B. J., 1970. An ATP dependent reduction of nitrate to ammonia by a cell free particulate system from barley roots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 1305-1310.
- Boutenko, R. G. et Volodarsky, A. D., 1968. Analyse immunochimique de la différenciation cellulaire dans les cultures de tissus de tabac. *Physiol. Veg.*, 6, (4), 299-309.
- Braaksma, F. J. et Feenstra, W. J., 1982. Nitrate reduction in the wildtype and a nitrate reductase-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.*, 54, 351-360.

- Braaksmā, F. J. et Feenstra, W. J., 1982. Reverse mutants of the nitrate reductase deficient mutant B25 of *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.*, 61, 263-271.
- Brassart, C., Dubois, J. et Bouriquet, R., 1978. Nutrition azotée d'une suspension cellulaire de *Silene* (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause). *C.R. Acad. Sc.*, 287, série D, 1373-1376.
- Brassart, C., Rambour, S. et Bouriquet, R., 1984. Activités glutamate deshydrogenase et glutamine synthetase d'une suspension cellulaire de *Silene alba* cultivée en présence de différentes sources d'azote. *Physiol. Vég.*, 22, 801-809.
- Brawerman, G., 1973. *Methods in cell Biology* (Prescott D.M. ed.) vol. 7, 1-22. New York Academic.
- Brawerman, G., 1981. The role of the poly (A) sequence in mammalian messenger RNA. *Crit. Rev. Biochem.*, 10, 1-38.
- Brawerman, G., Mendecki, J et Lee, S. Y., 1972. A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. *Biochem.*, 11, 637-641.
- Bright, S. W. J., Norbury, P. B., Franklin, J., Kirk, D. W. et Wray, J. L., 1983. A conditional-lethal *cnx*-type nitrate reductase-deficient barley mutant. *Mol. Gen. Genet.*, 189, 240-244.
- Brodeur, B. R. et Larosey, D., 1984. Parameter affecting ascite tumor formation in mice and monoclonal antibody formation. *J. Immunol. Meth.* 71, 26-272.
- Buchanan, R. J. et Wray, J. L., 1982. Isolation of molybdenum cofactor defective cell lines of *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.*, 188, 228-234.
- Buckingham, M. E., Cohen, A. et Gros, F., 1976. Cytoplasmic distribution of pulse-labelled poly (A)- containing RNA, particularly 26S RNA, during myoblast growth and differentiation. *J. Mol. Biol.*, 103, 611-626.
- Buczek, J., 1979. The role of light in the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in cucumber seedlings. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 45, 77-92.
- Burström, H., 1945. Studies on the buffer system of cells. *Ark. Bot.*, 32, 1-18.
- Burzynski, M. 1975. Changes in some nitrogen fractions protease and RNA depolymerase activity during induction by auxin of adventitious roots in tomato leaves cuttings. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 44, 465-478.
- Burzynski, M., Kubil-Dobosz, G., Stolarczyk, A., Teryks, D. et Buczek, J., 1982. Changes in the activities of some nitrogen metabolism enzymes during rooting of *Phaseolus* cuttings. *Acta Physiol. Plant.*, 4, 21-29.
- Butz, R. G. et Jackson, W. A., 1977. A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochem.*, 16, 409-417.
- Campbell, W. H., 1976. 1976. Separation of soybean leaf nitrate reductases by affinity chromatography. *Plant Sci. Lett.*, 7, 239-247.
- Campbell, W. H., 1978. Isolation of NAD(P)H : nitrate reductase from the scutellum of maize. *Z. Pflanzenphysiol.*, 88, 357-361.
- Campbell, W. H., Redingbaugh, M. G., Manory, W., et Smarelli, J., 1981. New forms and characteristics of higher plant nitrate reductase. In : *Photosynthesis IV. Regulation of Carbon metabolism*. G. Akoyunoglou ed., Balaban Internat. Sciences Services, Philadelphia Pa. 707-714.
- 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 Woo, K. C., 1979. The regulation of nitrate reduction in spinach leaves. *Can. J. Bot.*, 57, 1155-1160.
- Cella, R., Sala, F. et Street, H. E., 1976. Studies on the growth in culture of plant cell XIX : changes in the levels of free and membrane-bound polysome during the growth of *Acer-Pseudoplatanus* cells in batch suspension culture. *J. Expl. Bot.*, 27, 263-276.
- Champigny, M. L., 1963. Sur l'activité et l'induction de la nitrate reductase dans les plantules de maïs. *Physiol. Vég.*, 1, 139-169.
- Changeux, J.P. et Danchin, A., 1976. Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal network. *Nature*, 264, 23-30.
- Chatterjee, S. R., Pokhriyal, T. C. et Abrul, Y.P., 1980. In vivo nitrate reductase activity in barley (*Hordeum vulgare* L.) during ear development. *J. Exp. Bot.*, 31, 281-287.
- Cherel, I., Grosclaude, J. et Rouze, P., 1985. Monoclonal antibodies identify multiple epitopes on maize leaf nitrate reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 129, 686-693.
- Cianfriglia, M., Armellini, D., Massone, A. et Mariani, M., 1983. Simple immunization protocol for high frequency production of soluble antigen specific by hybridomas. *Hybridoma*, 2, 451-457.
- Coïc, Y., Lesaint, C. et Leroux, 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.
- Conejero, G., Robin, P. et Salsac, L., 1984. Les nitrate reductases de la feuille de Soja. *Physiol. Veg.*, (22), 133-281.
- Cove, D. J., 1979. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol. Rev.* 54, 291-327.

Cove, D. J. et Pateman, J. A., 1969. Autoregulation of the synthesis of nitrate reductase in *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol., 97, 1374-1378.

Craven, G. H., Moot, R.L. et Steward, F. C., 1972. Solute accumulation in plant cells. IV. Effects of ammonium ions on growth and solute content, 36, 897-914

Cullimore, J. V., Gebhardt, C., Saarelainen, P., Miflin, B. J., Idler, K. B. et Barker, R. F., 1984. Glutamine synthetase in *Phaseolus vulgaris* L. : organ specific expression of a multigene family. J. Mol. Appl. Genet.

Dailey, F. A., Warner, R. L., Somers, D. A. et Kleinhofs, A., 1982. Characteristics of nitrate reductase in a barley mutant deficient in NADH nitrate reductase. Plant. Physiol., 69, 1200-1204.

Dantzig, A. H., Wiegman, F. L. Jr. et Nason, A., 1979. Regulation of glutamate deshydrogenases in nit-2 and mutants of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol., 137, 1333-1339.

Dantzig, A. H., Zurowski, W. K., Ball, T. N. et Nason, A., 1978. Induction and repression of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol., 133, 671-679.

Darnell, J. E., Philipson, R., Wall, R. et Adesnik, M., 1971. - Polyadenylic acid sequences: role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA. Science, 174, 507-510.

Darnell, J. G., Wall, R. et Tushinski, R. J., 1971. An adenylic acid rich sequence in messenger RNA of HeLa cells and its possible relationship to reiterated sites in DNA. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 68, 1321-1325.

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 (4), 305-313.

Davies, D. D., 1973. Control of and by pH. Soc. Expl. Biol. Symposium, 27, 513-529.

De la Rosa, M. A., Diez, J., Vega, J. M. et Losada, M., 1980. Purification and properties of assimilatory NAD(P)H-nitrate reductase from *Ankistrodesmus braunii*. Eur. J. Biochem., 106, 249-256.

Delseny, M., Aspart, L., Balat, H. et Guitton, Y., 1974. Sélection de séquences polyriboadenyliques dans les ARN de *Radis*. C. R. Acad. Sci., 278, 1225-1228.

Delseny, M., Aspart, L. et Cooke, R., 1980. Studies on ribonucleic acids during radish seed germination : a search for potential regulatory mechanism. Israel, J. Bot., 29, 246-258.

Delseny, M., Aspart, L. et Guitton, Y., 1977. Effect of the protein synthesis inhibitor cycloheximide on RNA synthesis in radish seedlings. Biochim., 59, 51-57.

Delseny, M., Aspart, L. et Guitton, Y., 1977. Disappearance of stored polyadenylic acid and mRNA during early germination of radish embryo axes. Planta, 135, 125-178.

Delseny, M., Got, A. et Guitton, Y., 1976. Phosphorylation de la thymidine au cours de la germination par un nucléoside AMP phosphotransferase synthétisé de novo : mise en évidence d'un décalage dans le temps entre la transcription du gène et son expression. Physiol. Veg., 14, 159-178.

Delseny, M., Peralta, M.T. et Guitton, Y., 1975. Effects of cordycepin on RNA metabolism in germinating seedlings. Biochem. Biophys. Res. Commun., 64; 1278-1285.

De Vienne, D., 1983. La glutamate déshydrogenase de la Luzerne : aspects cytologiques, structuraux et évolutifs. Can. J. Genet. Cytol., 25, 146-160.

De Vienne, 1985. Les formes multiples de la glutamate déshydrogenase dans divers organes de *Medicago sativa* L. Bull. Soc. Bot. Fr. 132. Actual. Bot., 2, 103-109.

Diez, J., Chaparro, A., Vega, J. M. et Relimpio, A. M., 1977. Studies on the regulation of assimilation nitrate reductase in *Ankistrodesmus braunii*. Planta, 137, 231-234.

Dijkshoorn, W., 1958. Nitrate accumulation, nitrogen balance and cation-anion ratio during regrowth of perennial rye grass. Ned. J. Agric. Sci., 6, 211-221.

Dijkshoorn, W., 1962. Metabolic regulation of the alkaline effect of nitrate utilisation of plants. Nature, 194, 165-167.

Dilworth, F. M., et Kende, H., 1974. Comparative studies on nitrate reductase in *Agrostemma githago* induced by nitrate and benzyladenine. Plant. Physiol., 54, 821-825.

Doddema, H., Hofstra, 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.

Dorchies, V., 1984. Activité de la nitrate réductase de *Cichorium intybus* L. : Etude à différents stades de développement de la plante et dans les tissus cultivés in vitro. Thèse 3ème cycle. Université de Lille I.

Dorchies, V. et Rambour, S., 1983. Activité de la nitrate réductase mesurée in vivo chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) au cours du forçage. Physiol. Vég., 21, 705-713.

Dorchies, V. et Rambour, S., 1985. Activité nitrate réductase chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) à différents stades de développement et dans les tissus cultivés in vitro. Physiol. vég., 23, 25-35.

Dubois, J., 1975. Analyse quantitative de la croissance d'une culture de cellules du *Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause. Bull. Soc. Fr., 122, 269-280.

Dubois, J., 1980. Composés sulfhydriles et croissance de tissus isolés de Carotte (*Daucus carota* L.) et de suspensions cellulaires de *Silene* (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause). Thèse d'Etat Université de Lille I.

- Dubois, J., Rambour, S. et Vasseur, J., 1976. Croissance d'une suspension cellulaire de *Silene* (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause) et évolution des acides nucléiques. Actes du 101e Congr. nat. Soc. Sav. Lille, Sciences I, 441-454.
- Dulbecco, R. et Freeman, G., 1959. Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8, 396-397.
- Dunn-Coleman, N. S., Tomset, A. B. et Garrett, R., H., 1979. Nitrogen metabolite repression of the nitrate reductase in *Neurospora crassa*. Effect of the *gln-la* locus. *J. Bacteriol.*, 139, 697-700.
- Dwivedi, V. N., Khan, B. M., Rawal, S. K. et Mascarenhaj, A. F., 1984. Biochemical aspects of shoot differentiation in sugarcane callus. I : Nitrogen assimilating enzymes. *J. Plant Physiol.*, 117, 7-15.
- Esnault, R., 1985. Analyse de l'expression du génome racinaire : utilisation du système racinaire. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 132 ; *Actual. Bot.*, 1, 63-74.
- Esnault, R., Trapy, G. et Vanhuystee, R. B., 1975. Polyadenylated RNA from *Vicia faba* meristematic roots cells. Localization and size estimation of the poly (A) segment. *Eur. J. Biochem.*, 60, 83-89.
- Evans, H.J. et Nason, A., 1953. Pyridine nucleotide nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.*, 28, 233-254.
- Facklam, J. J. et Marzluf, G. A., 1978. Nitrogen regulation in amino acid catabolism in *Neurospora crassa*. *Biochem. Genet.*, 16, 343-355.
- Fankhauser, H., Bucher, F. et King, P. J., 1984. Isolation of biochemical mutants using haploid mesophyll protoplasts of *Hyoscyamus muticus*. IV: Biochemical characterization of nitrate non utilizing clones. *Planta*, 160, 415-421.
- Feenstra, W. J. et Jacobsen, E., 1980. Isolation of a nitrate reductase deficient mutant of *Pisum sativum* by means of selection for chlorate resistance. *Theor. Appl. Genet.*, 58, 39-42.
- Ferguson, A.R., 1969. The nitrogen metabolism of *Spirodela oligorrhiza*. II : Control of the enzymes of nitrate assimilation. *Planta*, 88, 353-363.
- Ferguson, A. R. et Bollard, E. G., 1969. Nitrogen metabolism of *Spirodela oligorrhiza*. I: Utilization of ammonium, nitrate and nitrite. *Planta*, 88, 344-352.
- Fernandez, E. et Cardenas, J., 1982. Regulation of the nitrate reducing system enzymes in wildtype and mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.*, 186 (2), 164-169.
- Ferrari, T. E. et Varner, J. E., 1971. Intact tissue assay for nitrate reductase in barley aleurone layers. *Plant Physiol.*, 44, (1), 85-88.
- 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, 421-424.
- Ferrario, S., Hirel, B. et Gadal, P., 1982. Immunochemical characterization of nitrate reductase from spinach leaves and roots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113, 733-737.
- Filner, P., 1966. Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 299-310.
- Fleck, J., Durr, A., Fritsch, C. Lett. M. et Hirth, L., 1982. Osmotic-shock "stress proteins". *Plant. Sci. Lett.*, 26, 159-165.
- Flores, E., Ramos, J. L., Herrero, A. et Guerrero, M.G., 1983. Nitrate assimilation by Cyanobacteria. In : *Photosynthetic prokaryotes : cell differentiation and function*. G. C. Papageorgion and Packer, L. Ed., Elsevier, 363-387.
- Fowler, M. W. et Barker, R. D. J., 1979. Assimilation of ammonium in non-chlorophyllous tissue. In : *Nitrogen assimilation of plants*. E. J. Hewitt et C.V. Cutting, ed, Academic Press, London, 489-499.
- Franco, A. R., Cardenas, J. et Fernandez, E., 1984. Heteromultimeric structure of the nitrate reductase complex of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo. J.*, 6, (3), 1403-1407.
- Fukuei, K., Sakamaki, T., Takahashi, N., Takaiwa, F. et Tanifuji, S., 1977. RNA synthesis required for DNA replication in *Vicia* seed embryos, 18, 173-180.
- Fukunaga, Y. et King, J., 1982. The effect of L. amino acids on the growth and nitrate reductase activity in cultured cell of *Datura innoxia*. *Plant. Sci. Lett.*, 24, (1), 45-54.
- Fosket, D. E., 1981. Protein synthesis during the transition from the resting to the growing state in suspension culture of Paul's Scarlet Rose cells. *Physiol. Plant.*, 53, 146-152.
- Fosket, D. E. et Tepfer, D. A., 1978. Hormonal regulation of growth in cultured plant cells. *In vitro*, 14, 63-75.
- Funkhouser, E. A., Gewitz, H. S. et Vennesland, B., 1983. Accumulation of demolybdo nitrate reductase during induction and its separation from nitrate reductase in *Chlorella*. *Plant Cell. Physiol.*, 24, (8), 1565-1568.
- Funkhouser, E. A. et Ramadoss, C. S., 1980. Synthesis of nitrate reductase in *Chlorella*. II: Evidence for synthesis in ammonia-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.
- Galau, G. A., Legocki, A. B., Greenway, S. C. et Dure, L. S. 1981. Cotton messenger RNA sequences exist in both polyadenylated and non polyadenylated form. *J. Biol. Chem.*, 256, 2551-2560.
- Galfre, G. et Milstein, C., 1981. Preparation of monoclonal antibody : strategies and procedures. *Methods in Enzymology*, 72, 3-46.

- Gamborg, O. L., 1970. The effect of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiol.*, 45, 372-375.
- Garrett, R. H., 1972. The induction of nitrite reductase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 264, 481-489.
- Garrett, R. H., et Amy, N. K., 1978. Nitrate assimilation in fungi. *Adv. Microb. Physiol.*, 18, 1-65.
- Garrett, R. H. et Cove, D. J., 1976. Formation of NAD(P)H-nitrate reductase activity in vitro from *Aspergillus nidulans* nia D and cnx mutants. *Mol. Gen. Genet.*, 149, 179-186.
- Garret, R. H. et Nason, A., 1967. Involvement of a b-type cytochrome in the assimilatory nitrate reductase of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58, 1603-1610.
- Gasparikova, O., Psenokava, 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 NO₃-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.
- Giri, L., et Ramadoss, C. S., 1979. Physical studies on assimilatory nitrate reductase from *Chlorella vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, 254, 1703-1712.
- Givan, C. V., 1979. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochem.*, 18, 375-382.
- Goldberg, R. B., Hoscheck, G. et Kamaley, J. C., 1981. Abundance, diversity and regulation of mRNA sequence sets in soybean embryogenesis. *Develop. Biol.*, 83, 218-231.
- Goodwin, T. W. et Mercer, E. I., 1983. Introduction to plant biochemistry. Pergamon press. 2nd edition.
- Grabar, P. et Williams, C. A., 1953. Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 193-194.
- Grafe, R. et Müller, A. J., 1983. Complementation analysis of nitrate reductase-deficient mutants of *Nicotiana tabacum* by somatic hybridization. *Theor. Appl. Genet.*, 66, 127-130.
- Granstedt R. C. et Huffacker, R. C., 1982. Identification of the leaf as a major nitrate storage pool. *Plant Physiol.*, 70, 410-413.
- Guerrero, M. G. et Gutierrez, M., 1977. Purification and properties of the NAD(P)H : nitrate reductase of the yeast *Rhodotorula glutinis*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 482, 272-285.
- 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.
- Guilfoyle, T. J., 1980. Auxin-induced deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase activities in mature soybean hypocotyl. *Biochem.*, 19, 6112-6118.
- Hageman, R. H., Reed, A. J., Femmer, F. A., Sherrard, J. H. et Dalling, M. J., 1980. Some new aspects of the in vivo assay for nitrate reductase in wheat leaves. I : Reevaluation of nitrate pool sizes. *Plant Physiol.*, 65, 27-32.
- Halperin, W. et Jensen, W. A., 1967. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *J. Ultrastr. Res.*, 18, 428-433.
- Halperin, W. et Wetherell, D. F., 1965. Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. *Nature*, 205, 519-520.
- Heath-Pagliuso, S., Huffaker, R. C. et Allard, R. W., 1984. Inheritance of nitrite reductase and regulation of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamine synthetase isoenzymes. *Plant Physiol.*, 76, 353-358.
- Heimer, Y. M. et Filner, P., 1970. Régulation 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.
- Heimer, Y. M. et Riklis, E., 1979. On the mechanism of development of nitrate reductase activity in tobacco cells. *Plant Sci. Lett.*, 16, 135-138.
- Heimer, Y. M. et Riklis, E., 1979. Post-transcriptional control of nitrate reductase of cultured tobacco cells by amino acids. *Plant Physiol.*, 64, 663-664.
- Heller, R., 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Thèse Doctorat Université Paris.
- Herrera, J., Paneque, A., Maldonado, J. M., Barea, J. L. et Losada, M., 1972. Régulation by ammonia of nitrate reductase synthesis and activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 996-1003.
- Hewitt, E. J., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. C. A.B. Farnham Royal, Buckinghamshire.
- Hewitt, E. J., 1975. Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, 73-100.
- Hewitt, E. J. et Nicholas, D. J. D., 1964. Enzymes of inorganic nitrogen metabolism. In : *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. Band. 7 67-172. Springer-Verlag Berlin Göttingen, Heidelberg.

- Hewitt, E. J. et Notton, B. A., 1967. Inhibition by L-azetidine-2 carboxylic acid of induction of nitrate reductase in plants and its reversal by L-proline. *Phytochem.*, 6, 1329-1335.
- Hewitt, E. J. et Notton, B. A., 1980. Nitrate reductase systems in eukaryotic and prokaryotic organisms. In : Molybdenum and molybdenum containing enzymes, ed. Coughlan, M., 273-325. Oxford : Pergamon, 577.
- Hewitt, E. J., Notton, B. A. et Rucklidge, G. J., 1977. Formation of nitrate reductase by recombination of apoprotein fraction from molybdenum deficient plant with a molybdenum containing complex. *J. Less-Common Met.*, 54, 537-545.
- Higgins, T. J. V., Goodwin, P. B. et Carr, D. J., 1974. The induction of nitrate reductase in mung bean seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1, 1-8.
- Higgins, T. J. V., Zwar, J. A. et Jacobsen, J. V., 1976. Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for amylase in barley aleuron layers. *Nature*, 260, 166-168.
- Hirai, M., 1978. NAD-Malic enzyme from citrus fruit. *Phytochem.* 17, 1507-1510.
- Hirel, B. et Gadal, P. 1980. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiol.*, 66, 619-623.
- Hirel, B., Mc Nally, S. F., Gadal, P., Sumar, N. et Stewart, G. R., 1984. Cytosolic glutamine synthetase in higher plants. *Eur. J. Biochem.*, 138, 63-66.
- Howard, W. D. et Solomonson, L.P., 1984. Quaternary structure of assimilatory NADH : nitrate reductase from *Chlorella*. *J. Biol. Chem.*, 257 (17), 10243-10250.
- Hoxmark, R. C. et Nordby, O., 1977. A warning against using chloramphenicol in the light. *Plant Sci. Lett.*, 8, 113-118.
- 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.
- Jacob, G. S. et Orme-Johnson, W. H., 1980. Molecular properties and mechanism of action of nitrate reductase from *Neurospora crassa*. In: Molybdenum and Molybdenum containing enzymes ed. Coughlan, M., 327-344. Oxford Pergamon.
- Jacobsen, J. V. et Zwar, J. A., 1974. Gibberellic acid causes increased synthesis of RNA which contain poly (A) in barley tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3290-3293.
- Jakob, K. M. et Bovey, F., 1969. Early nucleic acid and protein synthesis and mitosis in the primary root tips of germinating *Vicia faba*. *Exptl. Cell. Res.*, 54, 118-126.
- Jarvis, B. C., Yasmin, S. et Coleman, M. T., 1985. RNA and protein metabolism during adventitious root formation in stem cuttings of *Phaseolus aureus*. *Physiol. Plant.*, 64, 53-59.
- Jaworski, E. G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43. 1274-1279.
- Jessup, W. et Fowler, M. W., 1977. Inter-relationship between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. III. Effect of the nitrogen source on the pattern of carbohydrate oxidation in cells of *Acer pseudoplatanus* L. grown in culture. *Planta*, 137, 71-76..
- Johnson, J. L., 1980. The molybdenum cofactor common to nitrate reductase, xanthine dehydrogenase and sulfite oxidase. In : Molybdenum and molybdenum containing enzymes ed. Coughlan, M., 345-383. Oxford : Pergamon.
- Johnson, J. L., Hailine, B. E., Rajagopalan, K., V. et Arison, B. H., 1984. The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J. Biol. Chem.*, 259, 5414-5422.
- Johnson, J. L. et Rajagopalan, K. V., 1982. Structural and metabolic relation - ship between the molybdenum cofactor and urothine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6856-6868.
- Jolly, S. O., Campbell, W. et Tolbert, N. E., 1976. NADPH- and NADH-nitrate reductases from soybean leaves. *Arch. Biochem. 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., Abbott, A. J., Hewitt, E. J., James, D. M. et Best, G. R., 1976. Nitrate reductase activity and growth in Paul's Scarlet Rose suspension cultures in relation to nitrogen source and molybdenum. *Planta*, 133, 27-34.
- Jones, R. W., Sheard, R. W., 1977. Conditions affecting in vivo nitrate reductase activity in chlorophyllous tissues. *Can. J. Bot.*, 55, 896-901.
- Jordan, D. B. et Fletcher, J. S., 1980. Nitrate assimilation in suspension cultures of Paul's Scarlet rose. *Can. J. Bot.*, 58, 1088-1094.
- Kadam, S. S., Gandhi, A.P., Sawhney, S. K., 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.
- Takefuda, G., Duke, S. H. et Duke, S. O., 1983. Differential light induction of nitrate reductases in greening and photobleached soybean seedlings. *Plant Physiol.*, 73, 53-60.
- Kamada, H. et Harada, H., 1979. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. II : Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol.*, 24, 453-463.
- Kamada, H. et Harada, H., 1984. Changes in nitrate reductase activity during somatic embryogenesis in carrot. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 170, 403-410.

- Kamalay, J. C. et Goldberg, R. B., 1980. Regulation of structural gene expression in Tobacco. *Cell.*, 19, 935-946.
- Kang, S. M. et Titus, J. S., 1980. Activity profiles of enzymes involved in glutamine and glutamate metabolism in the apple during autumnal senescence. *Physiol. Plant.*, 50, 291-297.
- Kannangara, C. E. 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.
- Kaplan, D., Mayer, A. M. et Lips, S. H., 1978. Nitrite activation of nitrate reductase in higher plants. *Planta*, 138, 205-209.
- Kaplan, D., Mayer, A.M. et Lips, S. H., 1984. A constitutive component of nitrate reductase in barley leaves. *Isr. J. Bot.*, 33, 13-23.
- Kaplan, D., Roth-Bejerano, N. et Lips, S. H., 1974. Nitrate reductase as a product inducible enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 49, 393-398.
- Katharaj, G. R., Mahadevan, S. et Padmanadan, G., 1979. Early biochemical events during adventitious root initiation in the hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*. *Biochem.*, 18, 383-387.
- Kende, H. H., Hann, H. et Kays, S. E., 1971. Enhancement of nitrate reductase activity by benzyladenine in *Agrostemma githago*. *Plant Physiol.*, 48, 702-706.
- Kende, H. et Shen, J. C., 1972. Nitrate reductase in *Agrostemma githago*. Comparison of the inductive effects of nitrate and cytokinin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 286, 118-125.
- King, J., 1976. Growth characteristics of *Acer pseudoplatanus* cells grown in chemostat culture in the presence of urea alone as a source of nitrogen. *Plant. Sci. Lett.*, 6, 409-418.
- King, J. et Kanna, V., 1980. A nitrate reductase-less variant isolated from suspension cultures of *Datura innoxia*. *Plant Physiol.*, 66, 632-636.
- Kirby, K. S., 1965. Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid. *Biochem. J.*, 96, 266-269.
- Kleinhofs, A., Kuo, T. et Warner, R. L., 1980. Characterization of nitrate reductase-deficient barley mutants. *Mol. Gen. Génét.*, 177, 421-425.
- Kleinhofs, A., Warner, R. L. et Narayan, K. R., 1985. Current progress towards an understanding of the genetics and molecular biology of nitrate reductase in higher plants. *Oxford Surveys Plant Molecular and Cell Biology*, 2, 91-121.
- Kleppe, 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., 1979. Hormonal control of nitrate assimilation : Do phytohormones and phytochrome control the activity of nitrate reductase ? In : Nitrogen assimilation in plants. Hewitt, E. J., Cutting, C. V., ed., London Academic. 541-556.
- Kohler, G. et Milstein, C., 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
- Krekule, J., 1979. Stimulation and inhibition of flowering. Morphological and physiological studies. In ; *Physiologie de la floraison*. Ed du CNRS Paris, 285, 24-57.
- Kretovich, W. L., Evstigneeva, Z. G., Pushkin, A. V. et Dzhokharidze, T. Z., 1981. Two forms of glutamine synthetase in leaves of *Curcubita pepo*. *Phytochem.*, 20, 625-629.
- Kuo, T., Kleinhofs, A., Somers, D. et Warner, R., H., 1981. Antigenicity of nitrate reductase deficient mutants in *Hordeum vulgare* L. *Mol. Gen. Genet.*, 181, (1), 20 pages.
- Kuo, T., Warner, R. L. et Kleinhofs, A., 1982. In vitro stability of nitrate reductase from barley leaves. *Phytochem.*, 21, 531-533.
- Lance, C. et Rustin, P., 1984. The control role of malate in plant metabolism. *Physiol. Vég.*, 22, 625-641.
- Laurière, C., Weisman, N. et Daussant, J., 1981. Glutamate dehydrogenase in the first leaf of wheat. I. Antigenic polymorphism. *Physiol. Plant.*, 52, 146-150.
- Lea, P. J. et Mifflin, B. J., 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochem.*, 15, 873-885.
- Lee, R. B., 1980. Sources of reductant for nitrate assimilation in non photosynthetic tissue (a review). *Plant. Cell Environ*, 3, 65-90.
- Lee, Y., Mendecki, J. et Brawerman, G., 1971. A polynucleotide segment rich in adenylic acid in the rapidly labeled polyribosomal RNA component of mouse sarcoma 180 ascites cells. *Proc. Nat. Acad. USA*, 68, 1331-1335.
- Lefebvre, R., 1977. Influence de l'anaérobiose sur le bourgeonnement des tissus de racines d'Endive (*Cichorium intybus* L.) *Rev. Cytol. Biol. Vég.*, 40, 185-291.
- Leguay, J. J. et Guern, J., 1977. Quantitative effects of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-culture *Acer pseudoplatanus* cells. II. Influence of 2,4 D metabolism and intracellular pH on the control of cell division by intracellular 2,4 D concentration. *Plant. Physiol.*, 60, 265-270.
- Leong, C. C. et Shen, T. C., 1979. Reversible inactivation of the nitrate reductase of rice plants. *Experientia*, 35, 584-585.
- Lescure, A. M., 1969. Mutagenèse et sélection de cellules d'*Acer pseudoplatanus* L. cultivées in vitro. *Physiol. vég.*, 7, 237-250.
- Lewin, B., 1980. Gene expression Eucaryotic chromosomes. J. Wiley et Sons New York. 2nd edition.
- Linder, R. et Linskens, H. F., 1972. Evolution des acides aminés dans le style d'*Oenothera missouriensis* vierge, autopollinisé et xenopollinisé. *Theor. Appl. Genet.*, 42, 125-129.

- Losada, M., 1976. Metalloenzymes of the nitrate-reducing system. *J. Mol. Catal.*, 1, 245-264.
- Losada, M. et Guerrero, M. G., 1979. The photosynthetic reduction of nitrate and its regulation. In : *Photosynthesis in relation to Model systems*, ed. J. Barber, 365-408. Amsterdam: Elsevier. 434 pages.
- Losada, et M. Guerrero, M. G., Vega, J., M., 1981. The assimilatory reduction of nitrate. In: *Biochemistry and Physiology of Nitrogen and Sulfur Metabolism*, ed. H. Bothe, A. Trebst. Berlin : Springer.
- Losada, M., Paneque, A., Aparicio, P. J., Vega, J. M., Cardenas, J. et Herrera, J., 1970. Inactivation and repression by ammonium of the nitrate reducing system in *Chlorella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 1009-1015.
- Lovborg, U., 1983. Monoclonal antibodies (a short review). *Int. Clin. Prod.*
- Lowry, O. H. et Rosebrough M.J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mac Donald, D. W., Cove, D. J. et Coddington, A., 1970. Cytochrome c reductases from wild-type and mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *Molec. Gen. Genet.*, 128, 187-199.
- Mac Kown, C. T., Jackson, W. A. et Volk, R. J., 1982. Restricted nitrate influx and reduction in corn seedlings exposed to ammonium. *Plant. Physiol.*, 69, 353-359.
- Mac Kown, C. T., Jackson, W. A. et Volk, R. J., 1983. Partitioning of previously-accumulated nitrate to translocation, reduction and efflux in corn roots. *Planta*, 157, 8-14.
- Mac Kown, C. T., Volk R. J. et Jackson, W. A., 1981. Nitrate accumulation and transport by decapitated corn roots : effects of prior nitrate. *Plant. Physiol.*, 68, 133-138.
- Mac Mahon, D., 1975. Cycloheximide is not a specific inhibitor of protein synthesis in vivo. *Plant Physiol.*, 55, 815-821.
- Manahan, C. O., App, A.A., et Still, C.C. 1973. The presence of polyadenylate sequence in the ribonucleic acid of higher plant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53, 588-595.
- Mann, A. F., Hucklesby, D. P. et Hewitt, E. J., 1978. Sources of reducing power for nitrate reduction in spinach leaves. *Planta*, 140, 261-263.
- Marcus, A., Spiegel, S. et Brooker, J. D., 1975. In : *Control mechanisms in development*. Meints, R.H. et Davies, E. Eds Plenum Publ. Corp., 1-19.
- Marion Poll, A., Huet, J. C. et Caboche, M., 1984. Regulation of Nitrate reductase in protoplast derived cells. Influence of exogenously supplied NO_3^- , NH_4^+ and amino acids. *Plant. Sci.* 34, 61-72.
- Martinoia, E., Heck, V. et Wiemken, A., 1981. Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature*, 289, 292-294.
- Marton, L. Dung, T. M., Mendel, R. R. et Maliga, P. 1982. Nitrate reductase deficient cell lines from haploid protoplast cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Mol. Gen. Genet.*, 186, 301-304.
- Marzluf, G. A., 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.*, 45, 437-461.
- Mazurova, H., Ratajczak, W. et Ratajczak, L., 1980. Glutamate dehydrogenase characteristics in the organs and root nodules of *Lupinus luteus* L. *Acta Physiol. Plant.* 2, 167-177.
- Mendecki, J., Lee, S.Y. et Brawerman, G. 1972. Characteristics of the polyadenylic segment associated with messenger ribonucleic acid in mouse sarcoma 180 cells. *Biochem.*, 11, 792-780.
- Mendel, R. R., Alikulow, Z. A., Lvov, N. P. et Müller, A. J., 1981. Presence of molybdenum cofactor in nitrate reductase-deficient mutant cell lines of *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.*, 181, 395-399.
- Mendel, R. R., Alikulow, Z. A. et Müller, A. J., 1982. Molybdenum cofactor in nitrate reductase-deficient tobacco mutants. III. Induction of cofactor synthesis by nitrate. *Plant. Sci. Lett.*, 27, 95-101.
- Mendel, R. R. et Müller, A. J., 1978. Reconstitution of NADH-nitrate reductase in vitro from nitrate reductase deficient *Nicotiana tabacum* mutants. *Mol. Gen. Genet.* 161, 77-80.
- Mendel, R. R. et Müller, A. J., 1979. Nitrate reductase-deficient cell lines of *Nicotiana tabacum* : Further biochemical characterization. *Mol. Gen. Genet.*, 177, 145-153.
- Mendel, R. R. et Müller, A. J., 1980. Comparative characterization of nitrate reductase from wild-type and molybdenum cofactor-defective cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Plant. Sci. Lett.* 18, 277-288.
- Meyer, Y., 1985. L'induction du développement mitotique chez-les protoplastes de mésophylle de Tabac cultivés in vitro : controle hormonal. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 132. Actual. Bot., 1, 97-107.
- Miassod, R., 1974. Biosynthèse des ARN ribosomiques dans les cellules d'Erable en culture stérile. Thèse Doctorat d'Etat Aix-Marseille.
- Mifflin, B. J., 1970. Studies on the sub-cellular location of particulate nitrate and nitrite reductase, glutamic dehydrogenase and other enzymes in barley roots. *Planta*, 93, 160-170.
- Mitchell, A.P. et Magasanik, B., 1984. Three regulatory systems control production of glutamine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 148, 4, 2767-2778.
- Mohanty, B. et Fletcher, J.S., 1976. Ammonium influence on the growth and nitrate reductase activity of Paul's Scarlet Rose suspension cultures. *Plant Physiol.*, 58, 152-155.

- Mohanty, B. et Fletcher, J. S., 1978. Influence of ammonium on the growth and development of suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Physiol. Plant.*, 42, 221-225.
- Mohanty, B. et Fletcher, J. S., 1980. Ammonium influence on nitrogen assimilating enzymes and protein accumulation in suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Physiol. Plant.*, 48, 453-459.
- Morgan, M. A., Volk, R. J. et Jackson, W. A., 1973. Simultaneous influx and efflux of nitrate during uptake by perennial ray-grass. *Plant. Physiol.*, 51, 267-272.
- Morton, A. G., 1956., A study of nitrate reduction in mould fungi. *J. Exp. Bot.* 7, 97-112.
- Müller, A. J., 1983. Genetic analysis of nitrate reductase deficient tobacco plants regenerated from mutant cells. Evidence for duplicate structural genes. *Mol. Gen. Genet.*, 192, 275-281.
- Müller, A. J. et Grafe, R., 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.*, 161, 67-76.
- Murashige, T. et Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Murphy, T. M. et Imbrie, C. W., 1981. Induction and characterization of chlorate-resistant strains of *Rosa domascena* cultured cells. *Plant. Physiol.*, 67, 910-916.
- Nakagawa, H., Pouille, M. et Oaks, A., 1984. Characterization of nitrate reductase from corn leaves (*Zea mays* cv W64A x W182E) Two molecular forms of the enzyme. *Plant Physiol.*, 75, 285-289.
- Nakagawa, H., Yonemura, Y., Yamamoto, H., Sato, T., Ogura, N. et Sato, R., 1985. Spinach nitrate reductase. *Plant Physiol.*, (77), 124-128.
- Narayanan, K.R., Muller, A.J., Kleinhofs, A. et Warner, R.L., 1984. In vitro reconstitution of NADH : nitrate reductase in nitrate reductase-deficient mutants of barley. *Mol. Gen. Genet.*, 197, 358-362.
- Nason, A., Antoine, A. D., Ketchum, P. A., Frazier, W. A. et Lee, D. K., 1970. Formation of assimilatory nitrate reductase by in vitro inter-cistronic complementation in *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)*, 65, 133-144.
- Nason, A. et Evans, H. J., 1953. Triphosphopyridine nucleotide-nitrate reductase in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, 202, 655-673.
- Nauen, W. et Hartmann, T., 1980. Glutamate dehydrogenase from *Pisum sativum* L. Localization of the multiple forms and of glutamate formation in isolated mitochondria. *Planta*, 148, 7-16.
- Neeman, M., Aviv, D., Degani, H. et Galun, E., 1985. Glucose and glycine metabolism in regenerating tobacco protoplasts followed non-destructively by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.*, 77, 374-378.
- Nelson, R. S., Ryan, S. A. et Harper, J. E., 1983. Soybean mutants lacking constitutive nitrate reductase activity. I. Selection and initial plant characterization. *Plant Physiol.*, 72, 504-509.
- Nelson, R. S., Streit, L. et Harper, J. E., 1984. Biochemical characterization of nitrate and nitrite reduction in the wild-type and a nitrate reductase mutant of soybean. *Physiol. Plant.*, 61, 384-390.
- Neyra, C. A. et Hageman, R.H., 1978. Pathway for nitrate assimilation in corn (*Zea mays* L.) leaves. Cellular distribution of enzymes and energy sources for nitrate reduction. *Plant Physiol.*, 62, 618-621.
- Ngambi, J. M., Amblard, P., Bismuth, E. et Champigny, M. L., 1981. Etude des activités enzymatiques nitrate réductase et glutamine synthetase liées à l'assimilation des nitrates chez un mil *Pennisetum americanum* 23 DB. *Can. J. Bot.*, 59, 1050-1056.
- Nicholas, D. J. D. et Nason, A., 1954. Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase. *J. Biol. Chem.*, 207, 353-360.
- Nicholas, D. J. D. et Nason, A., 1954. Mechanism of action of nitrate reductase from *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, 211, 183-197.
- Nicholas, D. J. D., Nason, A. et Elroy, W. D. Mc., 1954. Molybdenum and nitrate reductase. I. Effect of molybdenum deficiency on the *Neurospora* enzyme. *J. Biol. Chem.*, 207, 341-351.
- Notton, B. A., Fido, R. J. et Galfre, G., 1985. Monoclonal antibodies to a higher-plant nitrate reductase: Differential inhibition of enzyme activities. *Planta*, 165, 114-119.
- 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.*, 18, 85-90.
- 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. et Hewitt, E. J., 1979. Structure and properties of higher plant nitrate reductase, especially *Spinacea oleracea*, in : Nitrogen assimilation of Plants. Hewitt, E. J., Cutting, C. V., eds, London : Academic, 708.
- Notton, B. A., Hewitt, E. J. et Fielding, A. H., 1972. Isoelectric focusing spinach nitrate reductase and its tungsten analogue. *Phytochem.*, 11, 2447-2449.
- Oaks, A., 1974. The regulation of nitrate reductase in suspension culture of soybean cell. *Biochim. Biophys. Acta*, 372, 122-126.

- Oaks, A., 1979. Nitrate reductase in roots and its regulation. in : Nitrogen assimilation of Plants. Hewitt, E. J., Cuttings, C. V., eds, London : Academic, 217-226.
- Oaks, A., Aslam, M. et Boesel, I. 1977. Ammonium and amino acids as regulators of nitrate reductase in corn roots. *Plant. Physiol.*, 59, 391-394.
- Oaks, A. et Hirel, B., 1985. Nitrogen metabolism in roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36, 345-365.
- Oaks, A., Stulen, I., and Boesel, I.L., 1979. Influence of amino acids and ammonium on nitrate reduction in corn seedlings. *Can. J. Bot.*, 57, 1824-1829.
- Oaks, A., Stulen, I., Jones, K., Winspear, M. J. et Boesel, I. L., 1980. Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. *Planta*, 148, 477-484.
- Oostindier-Braaksma, F. J. et Feenstra, W. J., 1973. Isolation and characterization of chlorate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mutat Res.*, 19, 175-185.
- Orebamjo, T. O. et Stewart, G. R., 1975. Ammonium repression of nitrate reductase formation in *Lemna minor* L. *Planta*, 122, 27-36.
- Orebamjo, T. O. et Stewart, G. R., 1975. Ammonium inactivation of nitrate reductase in *Lemna minor* L. *Planta*, 122, 37-44.
- Osmond, C. B., 1967. Acid metabolism in *Atriplex*. I. Regulation of oxalate synthesis by the apparent excess cation absorption in leaf tissue. *Austr. Biol. Sci.*, 20, 575
- Ouchterlony, O., 1949. Antigen-antibody reaction in gels. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 26, 507-517.
- Palacian, E., De la Rosa, F., Castillo, F. et Gomez-Moreno, C., 1974. Nitrate reductase from *Spinacea oleracea*. Reversible inactivation by NAD(P)H and by thiols. *Arch. Biochem. Biophys.*, 161, 441-447.
- Palmer, C.E., 1985. The effect of abscisic acid on amino nitrogen and protein content of potato plants in relation to the inhibition of nitrate reductase activity. *Plant Cell Physiol.*, 26, 1083-1091.
- Pan, S. S. et Nason, A., 1978. Purification and characterization of homogeneous assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase from *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 29313.
- Parker, J. E., Javed, Q. et Merrett, M. J., 1985. Glutamate dehydrogenase (NADP-dependent) mRNA in relation to enzymes synthesis in *Euglena gracilis*. *Eur. J. Biochem.*, 153, 573-578.
- Pateman, J. A., Cove, D. J., Rever, B. M. et Roberts, D. B., 1964. A common co-factor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature*, 201, 58-60.
- Pateman, J.A., Rever, B.M. and Cove, D.J., 1967. Genetic and biochemical studies of nitrate reduction in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.*, 104, 103-111.
- Paulet, P. et Nitsch, J. P., 1964. La néoformation de fleurs sur cultures in vitro de racines de *Cichorium intybus* L. Etude physiologique. *Ann. Physiol. Vég.*, 6, 333-345.
- Pearson, C. J., Volk, R. J. et Jackson, W. A., 1981. Daily changes in nitrate influx, efflux and metabolism maize and pearl millet. *Planta*, 152, 319-324.
- Pistorius, E. K., Funkhouser, E. A. et Voss, H., 1978. Effect of ammonium and ferricyanide on nitrate utilization by *Chlorella vulgaris*. *Planta*, 141, 279-282.
- Pistorius, E. K., Gewitz, H. S., Voss, H. et Vennesland, B., 1976. Reversible inactivation of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris* in vivo. *Planta*, 128, 73-80.
- Polacco, J.G., 1976. Nitrogen metabolism in soybean, tissue culture. I. Assimilation of urea. *Plant Physiol.*, 58, 350-357.
- Pouille, M. 1979. Etude de la NADH : nitrate reductase d'une suspension cellulaire de *Silene alba* : caractérisation, induction et purification. Thèse de 3ème cycle.
- Pouille, M. et Rambour, S., 1979. Mise en évidence de l'induction de la nitrate reductase dans une suspension cellulaire de *Silene alba*. *C. R. Acad. Sci.*, 289, série D, 1105-1108.
- Pouille, M. et Rambour, S., 1985. Regulation of nitrate reductase in suspension culture of *Silene alba*. *Immunochemical approach. Plant. Sci.*, 40, 111-115
- Premakumar, R., Sorger, G. J. et Gooden, D., 1978. Stability of messenger RNA for nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 519, 275-278.
- Premakumar, R., Sorger, G. J. et Gooden, D., 1980. Repression of nitrate reductase in *Neurospora* studied by using L-methionine DL-sulfoximine and glutamine auxotroph gln-1b. *J. Bacteriol.*, 143, 411-415.
- Radin, J. W., 1974. Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. *Plant. Physiol.*, 55, 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., Parker, L. L. et Sell, C. R., 1978. Partitioning of sugar between growth and nitrate reduction in cotton roots. *Plant. Physiol.*, 62, 550-553.

- Rambour, S., Poulle, M., Daniau, J. L. et Brassart, C., 1983. Regulation de l'activité de la nitrate réductase dans une suspension cellulaire de *Silene alba*. *Can. J. Bot.*, 61, 3523-3529.
- Rao, L. V. M., Datta, N., Mahadevan, M., Guha-Mukerjee S. et Sopory, S. K., 1984. Influence of cytokinins and phytochrome on Nitrate reductase activity in etiolated leaves of maize. *Phytochem.*, 23 (9), 1875-1879.
- Ratajczak, L., Ratajczak, W. et Mazurova, H., 1981. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. *Physiol. Plant.* 51, 277-280.
- Rathnam, C. K. M. et Das, V. S. R., 1974. Nitrate metabolism in relation to the aspartate-type C-4 pathway of photosynthesis in *Eleusine coracana*. *Can. J. Bot.*, 52, 2599-2605.
- Raven, J. A. et Smith, F.A., 1976. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.*, 76, 415-431.
- Redinbaugh, M. G., 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. et Campbell, W. H., 1985. Quaternary structure and composition of squash NADH : nitrate reductase. *J. Biol. Chem.*, 260, 3380-3385.
- Reed, A. J. et Hageman, R. H., 1980. Relationship between nitrate uptake flux and reduction and the accumulation of reduced nitrogen in maize (*Zea mays* L.) I. Genetic variation. *Plant. Physiol.*, 66, 1179-1183.
- Reed, A. J. et Hageman, R. H., 1980. 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.
- Reinert, J., Tazawa, M. et Semenoff, S., 1967. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro. *Nature*, 216, 1215-1216.
- Remmler, J. L. et Campbell, W. H., 1986. Regulation of corn leaf nitrate reductase. II. Synthesis and turnover of the enzymes activity and protein. *Plant. Physiol.*, 80, 442-447.
- Rhodes, D., Rendon, G. A. et Stewart, G. R., 1976. The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor* L. *Planta*, 129, 203-210.
- Rigano, C., Rigano, V. M. D., Vona, V. et Fuggi, A., 1969. Glutamine synthetase activity, ammonia assimilation and control of nitrate reduction in the unicellular red alga *Cyanidium caldarium*. *Arch. Microbiol.*, 121, 117-120.
- Rigano, V.M., Vona, V., Fuggi, A. et Rigano, C., 1982. Effect of L. methionine-DL-sulphoximine synthetase, on ammonium and nitrate metabolism in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. *Physiol. Plant.*, 54, 47-51.
- Rigano, C., Vona, V., Rigano, V. D. M. et Fuggi, A., 1980. Active and inactive nitrate reductase. Effects of mild treatments with denaturing agents of protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 613, 26-33.
- Robin, P., 1979. Etude de quelques conditions d'extraction de la nitrate reductase des racines et des feuilles de plantules de maïs. *Physiol. veg.*, 17 (1) 45-54.
- Robin, P., Blayac, D. et Salsac, L., 1978. 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, 55-56.
- Robin, P., Conejero, G., Passama, L. et Salsac, L. 1983. Evaluation de la fraction métabolisable du nitrate par la mesure in situ de sa réduction. *Physiol. Vég.*, 21, 115-122.
- Robin, P., Streit, L., Campbell, W. H. et Harper, J., 1985. Immunochemical characterization of nitrate reductase form from wild type (C. V. Williams) and nrl mutant soybean. *Plant. Physiol.*, 77, 232-236.
- Roth-Bejeramo, N. et Lips, S. H., 1970. Hormonal regulation of nitrate reductase activity in leaves. *New Phytol.*, 69, 165-169.
- Rucklidge, G. J., Notton, B. A. et Hewitt, E. J., 1976. Reconstitution in vitro of nitrate reductase from apoprotein of molybdenum-deficient spinach. *Biochem. Soc. Trans.*, 4, 77-80.
- Sacher, J.A., 1967. Control of synthesis of RNA and protein in subcellular fraction of *Rhoo discolor* leaf sections by auxin and kinetin during senescence. *Exp. Geront.*, 2, 261-278.
- Sahulka, J. et Lisa, L., 1978. The influence of sugars on nitrate reductase induction by exogenous nitrate or nitrite in excised *Pisum sativum* roots. *Biol. Plant. (Praha)*, 20, 359-367.
- Sahulka, J. et Lisa, L., 1978. The influence of exogenously supplied sucrose on glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase levels in excised *Pisum sativum* roots. *Biol. Plant.*, 20, 446-452.
- Saksi N., 1985. Culture et potentialités de régénération de protoplastes de feuilles de *Cichorium intybus* L. var *Witloof*. Thèse 3ème cycle. Univ. Lille I.
- Salsac, L. 1982. Absorption et accumulation des ions minéraux par les racines. In : Mieux comprendre les interactions sol-racine. Incidence sur la nutrition minérale. I.N.R.A., 121-128.
- Sarkissian, G. S. et Fowler, M. W., 1974. Inter-relationship between nitrate assimilation and carbohydrate metabolism in plant roots. *Planta*, 119, 335-349.
- 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.
- Sawhnev, S. K., Naik, M. S. et Nicholas, D. J. D., 1978. Regulation of nitrate reduction by light in wheat leaves. *Proc. Aust. Biochem. Soc.* 11, 39.

- Scheid, H.W., Ehmke, A. et Hartman, T., 1980. Plant NAD-dependent glutamate dehydrogenase. Purification, molecular properties and metal ion activation of the enzymes from *Lemna minor* and *Pisum sativum*. *Z. Naturforsch.*, 35c, 213-221.
- Scherrer, K. et Darnell, D.A., 1962. Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from Hela cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7, 486-490.
- Schlomer, R. H. et Garrett, R. H., 1973. Partial purification of the NADH-nitrate reductase complex from *Chlorella-pyrenoidosa*. *Plant. Physiol.*, 58, 591-593.
- 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.
- Scopes, R.P., 1973. Measurement of proteins by spectrophotometry at 205 nm. *Anal. Biochem.* 59, 277-282.
- Scott, D. B. et Neyra, C. A., 1979. Glutamine synthetase and nitrate assimilation in *Sorghum* (*Saccharum vulgare*) leaves. *Can. J. Bot.*, 57, 754-758.
- Sene, A., Lefebvre, R. et Vasseur, J. 1983. Sur l'aptitude de petits explants racinaires de *Cichorium intybus* L. (var. Witloof) à produire des racines adventives en culture in vitro. *C. R. Acad. Sci.*, 297, 80-86.
- Sengupta, C. et Raghavan, V., 1980. Somatic embryogenesis in carrot cell suspension. II. Synthesis of ribosomal RNA and poly A+ RNA. *J. Exp. Bot.*, 31, 259-268.
- Shaner, D. L. et Boyer, J. S., 1976. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I : Regulation by nitrate flux. *Plant. Physiol.*, 58, 499-504.
- Shaner, D.L. et Boyer, J.S., 1976. 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. Induction of nitrate reductase and 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- and NAD(P)H nitrate reductases in rice seedlings. *Plant Physiol.*, 58, 292-294.
- Sherrard, J.H. et Dalling, M. J., 1978. Effect of chloramphenicol and cycloheximide in the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in Bean leaves. *Planta (Berl.)*, 113, 229-240.
- Shokut, T.A., Wolk, C.P., Thomas, J., Meeks, J.C., Shaffer, P.W. et Chien, W.S., 1978. Initial organic products of assimilation of ^{13}N ammonium and ^{13}N nitrate by tobacco cells cultured on different sources of nitrogen. *Plant Physiol.*, 62, 299-304.
- 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, (3), 1017-1024.
- Silflow, C.D., Hammett, J.R. et Key, J.L., 1979. Sequence complexity of polyadenylated ribonucleic acid from soybean suspension culture cells. *Biochem.*, 13, 2725-2731.
- Smarelli, J. Jr. et Campbell, W. H., 1981. Immunological approach to structural comparison of assimilatory nitrate reductase. *Plant. Physiol.*, 68, 1226-1230.
- Smith, F.W., Thompson, J.F., 1971. Regulation of nitrate reductase in excised barley roots. *Plant Physiol.*, 48, 219-223.
- Snapp, S., Somers, P. A., R.L., Warner, 1984. Immunological comparisons of higher plant nitrate reductases. *Plant. Sci. Lett.*, 13-18.
- Solomonson, L. P., 1980. Structure of *Chlorella* nitrate reductase. In : *Biology of inorganic nitrogen and sulfur metabolism*. Bothe and Trebst ed., Springer, Berlin, 199-205.
- Solomonson, L.P., Lorimer, G. H., Hall, R. L., Borchers, R. et Bailey, J.L., 1975. Reduced nicotiamide adenine dinucleotide-nitrate reductase of *Chlorella vulgaris*. Purification, prosthetic groups, and molecular properties. *J. Biol. Chem.*, 250 (11), 4120-4127.
- Solomonson, L. P. and Spehar, A. M., 1977. Model for the regulation of nitrate assimilation. *Nature*, 265, 373-375.
- Somers, D.A., Kuo, T., Kleinhofs, A. et Warner, R. L., 1982. Barley nitrate reductase contains a functional cytochrome b 557. *Plant. Sci. Lett.*, 24 (3) 261-265.
- Somers, D. A., Kuo, T. M., Kleinhofs, A., Warner, R. L., 1983. Nitrate reductase-deficient mutants in barley : immunoelectrophoretic characterization. *Plant Physiol.*, 71, 145-149.
- Sorger, G.J., Premakumar, R., Gooden, D., 1978. Demonstration in vitro of two intracellular inactivators of nitrate reductase from *Neurospora*. *Biochim. Biophys. Acta*, 540, 33-47.
- Soualmi-Boujemaa, K., Moyses, A. et Champigny, M.L., 1985. Modulation of nitrate reductase in wheat shoot and roots by nitrate. *Physiol. Vég.*, 23, 869-875.
- Stepan-Sarkissian, G. et Fowler, M.W. 1978. Changes in the levels of metabolites of the pathway of carbohydrate metabolism during the induction of nitrate assimilation in pea roots. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 172, 1-13.
- Stewart, G.R., Mann, A.F., Fentem, P.A., 1980. Enzymes of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. In : *The biochemistry of plants*, B.J. Mifflin ed., 5, 271-327. New York, Academic.
- Streit, L. and Feller, U., 1982. Changing activities of nitrogen assimilating enzymes during growth and senescence of dwarf beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Z. Pflanzenphysiol.*, 108, 273-281.
- Subramanian, K. N. et Sorger, G. J., 1972. Regulation of nitrate reductase in *Neurospora crassa* : stability in vivo. *J. Bacteriol.* 110, (2), 538-546.

- Subramanian, K. N. et Sorger, G. J., 1972. Regulation of nitrate reductase in *Neurospora crassa* : regulation of transcription and translation. *J. Bacteriol.*, 110, (2), 547-553.
- Sung, Z. R. et Okimoto, R., Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3683-3687.
- Suzuki, A., Gadal, P. et Oaks, A., 1981. Intracellular distribution of enzyme associated with nitrogen assimilation in roots. *Planta*, 151, 457-461.
- Syrett, P. J. et Morrison, I., 1963. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 566-575.
- Teissere, M., 1974. Contrôle hormonal de la transcription chez les végétaux. Thèse d'Etat Marseille n° A.O., 10557.
- Tencate, C. H. and Breteler, H., 1982. Effect of growth regulators on nitrate utilization by roots of nitrogen depleted dwarf bean. *J. Exp. Bot.*, 133, 37-46.
- Thacker, A., Syrett, P. J., 1972. Disappearance of nitrate reductase activity from *Chlamydomonas reinhardi*. *New Phytol.*, 71, 435-441.
- Theologis, A. et Ray, P.M., 1982. Changes in messengers RNAs under the influence of auxins. In : *Plant Growth Substances* Wareing, P.F., ed. Academic Press.
- Ting, I. P. et Dugger, W. M., 1965. Transhydrogenation in root tissue : mediation by carbon dioxide. *Science*, 150, 1727-1728.
- Tischner, R., Lorenzen, H., 1979. Nitrate-uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. *Planta*, 146, 287-292.
- Tomaszewski, M. et Buchowicz, J., 1981. Rapid appearance of newly-synthesized poly (A)-containing RNA in the cytoplasm of germinating wheat embryos. *Plant. Sci. Lett.*, 23, 89-93.
- Travis, R. L., Jordan, W. R. and Huffacker, 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.
- Trinity, P. M., Filner, P., 1979. Activation and inhibition of nitrate reductase extracted from cultured tobacco cells. *Plant. Physiol.*, 63, 133.
- Vaillant, V., Buffard, D. et Esnault, R., 1983. Changes in the polyadenylated messenger RNA population during differentiation of *Vicia faba* root cells. *Cell Diff.*, 13, 201-208.
- Van de Walle, C., 1973. Polyadenylic sequences in plant RNA. *Febs Lett.* 34, 31-34.
- Van Holst, G. J. et Clarke, A.E., 1986. Organ-specific arabinogalactan-proteins of *Lycopersicon peruvianum* (Mill) demonstrated by crossed electrophoresis. *Plant Physiol.*, 80, 786-789.
- vasseur, J., 1965. Sur les conditions de culture in vitro des tissus de feuilles d'Endive. *Bull. Soc. Bot.*, 88, 35-46.
- Vasseur, J., 1979. Etude du bourgeonnement des fragments de feuilles étiolées d'Endive. Formation des bourgeons en fonction des caractéristiques physiologiques. *Rev. Gen. Bot.*, 86, 113-190.
- Vasseur, J. et Roger, V., 1983. Synthèses d'acides nucléiques et de protéines au cours de l'initiation de bourgeons adventifs sur des explantats de *Cichorium intybus* cultivés in vitro. *Physiol. Plant*, 57, 435-491.
- Vasseur, J. et Sene, A., 1984. Influence de quelques régulateurs de croissance sur la prolifération de petits explantats racinaires de *Cichorium intybus* L. (var. Witloof) cultivés in vitro. *C.R. Acad. Sci.*, 298, 371-374.
- Vaughn, K. C., Duke, S. O. et Funkhouser, E. A., 1984. Immunochemical characterization and localization of nitrate reductase in norflurazon-treated soybean cotyledons. *Physiol. Plant.*, 62 (3), 481-484.
- Vega, J.M., Herrera, J., Aparicio, R.J., Panegue, A., Losada, M., 1971. Role of molybdenum in nitrate reduction by *Chlorella*. *Plant Physiol.*, 48, 294-299.
- Vennesland, B., 1981. HCN and the control of nitrate reduction. The regulation of the amount of active nitrate reductase present in *Chlorella* cells. In : *Biochemistry and Physiology of nitrogen and Sulfur Metabolism*. Ed. H. Bothe, A. Trebst. Berlin : Springer.
- Vennesland, B., Guerrero, M. G., 1979. Reduction of nitrate and nitrite. In : *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Ser., ed. M. Gibbs, E. Latzko, 6. Berlin : Springer, 425-444.
- Verma, D.P.S. et Marcus, A., 1974. Activation of protein synthesis upon dilution of an *Arachis* cell culture from the stationary phase. *Plant Physiol.*, 54, 83-87.
- Vickery, H. B., Pucher, G. W., Wakeman, A. J. et Leavenworth, C. S., 1946. Chemical investigations of the metabolism of plants. I : The nitrogen nutrition of *Narcissus poeticus*. *Conn. Agr. Exp. Sta. New Haven, Bull.*, 496
- Vidal, J., Rio, M. C. et Gadal, P., 1977. Etude de l'évolution de la malate déshydrogénase à NADP durant le verdissement des feuilles de *Phaseolus vulgaris* L. *Plant. Sci. Lett.*, 8, 243-249.
- Vijayaraghavan, S. J., Sopory, S. K. et Guha-Mukherjee, S. G., 1979. Ammonium stimulation of nitrate reductase induction in excised leaves of wheat (T.a.). *Zeit. Pflanzenphysiol.*, 93, (5), 395-402.
- Walbot, V., Harris, B. et Dure, L.S., 1975. In developmental biology of reproduction Markett, C. ed. *Acad. Press.* 165-187.
- Walker, D. A., 1962. Pyruvate carboxylation and plant metabolism. *Biol. Rev.*, 37, 215-256.
- Walker, J.C. et Key, J.L., 1982. Cloning and characterization of auxin regulated RNA from soybean hypocotyl. *Plant. Physiol.* 69, n°4, suppl.

- Walker, K. A. and Sato, S. J., 1981. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant. Cell. Tissue Organ Culture*, 1, 100-121.
- Wallace, W., 1973. A nitrate reductase inactivating enzyme from maize root. *Plant. Physiol.*, 52, 197-201.
- Wallace, W., 1974. Purification and properties of a nitrate reductase-inactivating enzyme. *Biochem. Biophys. Acta*, 341, 265-276.
- Wallace, W., 1978. Comparison of a nitrate reductase-inactivating enzyme from the maize root with a protease from yeast which inactivates tryptophan synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, 524, 418-427.
- Warner, R. L. et Kleinhofs, A., 1981. Nitrate utilization by nitrate reductase deficient barley mutants. *Plant. Physiol.*, 67 (4), 740-743.
- Webster, G., 1964. Enzymes of petide and protein metabolism. In: *Modern methods of plant analysis*. Springer Verlag, 7, 392-400.
- Weissman, G. S., 1972 a. Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. *Plant. Physiol.*, 49, 138-141.
- Weissman, G. S., 1972 b. Influence of ammonium and nitrate nutrition on the pyridine and adenine nucleotides of soybean and sunflower. *Plant Physiol.*, 49, 142-145.
- Weissman, G. S., 1976. Glutamine synthetase regulation by energy charge in sunflower roots. *Plant Physiol.*, 57, 339-343.
- Whatley, F. R., Greenaway, W. et Dunstan, R. H., Glycine metabolism in carrot suspension culture cells investigated by gas chromatography/mass spectrometry. *Physiol. Vég.*, 24, 3-13.
- Woo, K. C., Jokinen, M. et Canvin, D. T., 1980. Reduction of nitrate via a dicarboxylate shuttle in a reconstituted system of supernatant and mitochondria from spinach leaves. *Plant. Physiol.*, 65, (3), 433-436.
- Wray, J. L. et Filner, P., 1970. Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. *Biochem. J.*, 119, 715-725.
- Wray, J.L. et Kirk, D. W., 1981. Inhibition of NADH: nitrate reductase degradation in barley leaf extracts by leupeptin. *Plant Sci. Lett.*, 23, 207-213.
- Yamaya, T., Oaks, A., Boesel, I. L., 1980. Characteristics of nitrate reductase-inactivating proteins obtained from corn roots and rice cell cultures. *Plant. Physiol.*, 65, 141-145.
- Yamaya, T., Ohira, K., 1976. Nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture. *Plant. Cell. Physiol.*, 17, 633-641.
- Yamaya, T. and Ohira, K., 1977. Purification and properties of a nitrate reductase inactivating factor from rice in suspension culture. *Plant. Cell. Physiol.*, 18, 915-925.
- Yamaya, T. and Ohira, K., 1978. Nitrate reductase inactivating factor from rice seedlings. *Plant. Cell. Physiol.*, 19, 211-220.
- Young, M., 1973. Studies on the growth in culture of plant cells. XVI. Nitrogen assimilation during nitrogen limited growth of *Acer pseudoplatanus* L. cells in chemostat culture. *J. Exp. Bot.*, 24, 1172-1185.
- Zielke, H. R., Filner, P., 1971. Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultured tobacco cells. *J. Biol. Chem.*, 246, 1772-1779.
- Zink, M. W., 1982. Regulation of nitrate reductase by various nitrogen sources in cultured *Ipomea* sp. *Canad. J. Bot.*, 60, (4), 386-396.
- Zurfluh, L. et Guilfoyle, T.J., 1982. Auxin-induced changes in the patterns of protein synthesis in soybean hypocotyl. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 77, 357-361.
- Zurfluh, L. et Guilfoye, T.J., 1982. Auxin-induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongation sections of soybean hypocotyl. *Plant Physiol.*, 69, 333-337.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	8
I - LA REDUCTION DU NITRATE :ASPECTS ENERGETIQUES, SOURCE DU POTENTIEL REDUCTEUR. NOTION DU pH STAT BIOCHIMIQUE.	10
II - LA NITRATE REDUCTASE :FONCTIONS, STRUCTURE, MODES DE REGULATION.	27
1) Fonctions	27
2) Structure de la nitrate réductase	31
3) Mode de régulation des nitrate réductases.	37
MATERIEL ET METHODES	63
I - LE MATERIEL BIOLOGIQUE	64
A - La suspension cellulaire du Silène	64
B - L'Endive	66
II - EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA NITRATE REDUCTASE	68
III - MESURES DES ACTIVITES DE LA NITRATE REDUCTASE	70
IV - MESURE DES ACTIVITES GLUTAMATE DESHYDROGENASE (GDH) ET GLUTAMINE SYNTHETASE	73
V - ANALYSES ELECTROPHORETIQUES EN GELS DE POLYACRYLA- MIDE	75
VI - ANALYSES IMMUNOLOGIQUES	78
VII - DOSAGE DU NITRATE DANS LE MILIEU DE CULTURE ET DANS LE MATERIEL VEGETAL	82
VIII - DOSAGE DES PROTEINES	83
IX - ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES	84
RESULTATS	89
<i>Evolution des ARN au cours de la croissance des cellules de Silène</i>	90
I - ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DES CELLULES DE SILENE	91
II - DISCUSSION	104

	Page
<i>Régulation de l'activité nitrate réductase des cellules de Silène.</i>	117
I - REGULATION METABOLIQUE	118
1) Croissance des cellules de Silène et activité nitrate réductase.	118
2) Teneurs en nitrate extra- et intracellulaire et activité nitrate réductase.	120
3) Action de l'ammonium sur l'activité nitrate réductase.	122
4) Activité nitrate réductase de cellules cultivées en présence de nitrate d'ammonium.	124
5) Activité nitrate réductase de cellules de Silène cultivées en présence d'ammonium comme source unique d'azote.	126
6) Activité de la glutamine synthétase et de la glutamate deshydrogénase de cellules de Silène cultivées en présence de diverses sources azotées.	130
7) Action de l'azaserine et de la méthionine sulfoxyimine sur les activités nitrate réductase, glutamate, deshydrogénase et glutamine synthétase.	134
II - REGULATION GENETIQUE	142
1) Induction de la nitrate réductase des cellules de Silène.	142
2) Induction de la nitrate réductase du Silène et existence d'une inactivase.	149
III - REGULATION DE LA NITRATE REDUCTASE. APPROCHE IMMUNOLOGIQUE.	152
<i>Caractéristiques de la nitrate réductase du Silène. - Comportement antigénique. - Origine du pouvoir réducteur. - Influence de l'acide abscissique sur l'activité nitrate réductase.</i>	157
I - ETUDE DE LA SPECIFICITE ANTIGENIQUE DES NITRATE REDUCTASES DU SILENE ET DE L'EPINARD.	158
II - ORIGINE DU POUVOIR REDUCTEUR DE LA NITRATE REDUCTASE DU SILENE	168
1) Affinité de la nitrate réductase du Silène pour les nucléotides pyridiniques et le nitrate.	168

	Page
2) Action d'inhibiteurs du métabolisme énergétique sur l'activité nitrate réductase de cellules de Silène de 3 jours.	170
III - ACTION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE SUR L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE DE CELLULES DE SILENE.	174
<i>Activité nitrate réductase d'explants racinaires de Chicorée de Bruxelles cultivés "in vitro".</i>	177
I - ACTIVITE NITRATE REDUCTASE D'EXPLANTATS RACINAIRES CULTIVES IN VITRO	179
II - ACTIVITE NITRATE REDUCTASE DANS DES CALS ET DANS LES RACINES NEOFORMEES A LA BASE DE BOURGEONS EXCISES ET TRANSPLANTES DANS UN MILIEU NEUF	184
DISCUSSION	185
1) Les mesures de l'activité nitrate réductase	186
2) Activité nitrate réductase et croissance cellulaire.	188
3) Induction de la nitrate réductase.	191
4) Régulation par les produits de la réduction : ammonium et glutamine.	194
5) Régulation des activités GS et GDH selon le mode de nutrition azotée.	196
6) Glutamine synthétase, glutamate deshydrogénase : modifications enzymatiques au cours de la croissance et de la différenciation.	200
7) Nitrate réductase et différenciation organogène chez la Chicorée de Bruxelles.	204
CONCLUSIONS	210
BIBLIOGRAPHIE	215

RESUME

La suspension cellulaire de *Silene alba* est habituellement cultivée dans un milieu qui contient du nitrate comme seule source azotée. La durée du cycle de croissance est de 14 jours. Le transfert de cellules prélevées en phase stationnaire dans un milieu neuf entraîne une activation cellulaire, qui se traduit par une reprise de la protéogenèse et par une synthèse précoce (6ème h.) d'ARN dont 8 % sont polyadénylés.

La nitrate réductase des cellules de *Silène* est une NADH:nitrate réductase dont les constantes d'affinité pour le NADH et le NO_3^- sont respectivement $11 \cdot 10^{-6} \text{M}$ et $15 \cdot 10^{-4} \text{M}$. Son activité s'étend du début de la culture jusqu'au 6ème jour. Elle est l'une des protéines induites au cours de l'activation cellulaire. Dans des cellules qui ne présentent pas d'activité nitrate réductase, l'existence d'un matériel antigénique reconnu par des anticorps spécifiques de la nitrate réductase a été démontrée. L'induction de l'enzyme pourrait consister en la synthèse d'une protéine activatrice de l'apoenzyme qui serait constitutive. La nitrate réductase est également soumise à une régulation par la glutamine et l'ammonium. Celui-ci est métabolisé par la voie : glutamine synthétase glutamate synthase. La compréhension de la régulation de la nitrate réductase passe par l'étude de l'ensemble de la chaîne d'assimilation de l'azote.

En l'absence d'un taux de synchronisation élevé de la division cellulaire, il est difficile de relier l'induction de la nitrate réductase à la croissance.

La mise en culture d'explants prélevés sur des racines tubérisées de la Chicorée de Bruxelles provoque également l'apparition d'une activité nitrate réductase, absente dans les tissus quiescents. La nitrate réductase pourrait être un marqueur de la différenciation rhizogène.

Chez le *Silène*, comme chez l'Endive la nitrate réductase est un signal de l'activation cellulaire.

MOTS CLES : Réduction de l'azote
Métabolisme azoté
Suspension cellulaire
Cichorium intybus (var. Witloof)
Silene alba
Nitrate réductase
Glutamate deshydrogenase
Glutamine synthétase
Rhizogénèse

ABSTRACT

Cell suspension cultures of *Silene alba* are usually grown on a medium which contains nitrate as the sole source of nitrogen. Subcultures are made every 14 days. Transfer of quiescent cells in new medium induces significant modifications in the nucleic acid metabolism as well as in protein synthesis. RNAs, 8 % of which are polyadenylated are synthesized during the early lag phase, just before nitrate reductase activity is induced. *Silene* nitrate reductase is shown to be almost exclusively NADH-dependant with K_m (NADH) of $11 \cdot 10^{-6} M$ and K_m (NO_3^-) of $15 \cdot 10^{-4} M$. Nitrate reductase is one of the proteins induced during cellular activation. Therefore an immunochemical approach reveals that cells which lack nitrate reductase activity contain cross reacting material with antibodies raised against purified nitrate reductase. It is thus possible that the induction corresponds in fact to the synthesis of an activator necessary for building up the holoenzyme. Nitrate reductase is also regulated by glutamine and ammonium which is metabolized through the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. The whole pathway of nitrate assimilation has to be accounted for, to understand how nitrate reductase is regulated.

As synchronization of the cell divisions can not be obtained, it is difficult to relate nitrate reductase activity to the growth process.

In *Cichorium* tissues cultured in vitro nitrate reductase may be a marker of the root differentiation.

In *Silene* cells as well as in *Cichorium* explants nitrate reductase is a signal of the cellular activation.

KEY WORDS : Nitrogen assimilation
Nitrate reduction
Nitrate reductase
Cell suspension culture
Cichorium intybus (var. Witloof)
Silene alba
Glutamate dehydrogenase
Glutamine synthetase
Root differentiation

