

50376
1986
193

50376
1986
193

N° d'ordre : 1359

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE 3ème CYCLE

par

RAMBAUD Caroline



EVOLUTION ET CARACTERISATION DE LA NITRATE REDUCTASE AU COURS DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE CHEZ *DAUCUS CAROTA* L.

Soutenue le 13 Novembre 1986 devant la Commission d'Examen

M. R. BOURIQUET
M. S. RAMBOUR
M. J. DUBOIS
M. A. VERBERT

Université de Lille 1
Université de Lille 1
Université de Lille 1
Université de Lille 1

Président
Rapporteur
Examineur
Examineur

AVANT PROPOS

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

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Monsieur RAMBOUR pour les conseils précieux et l'aide continuelle qu'il m'a prodigués tout au long de ces trois années. Je suis sensible à l'honneur qu'il me fait en examinant cette thèse en qualité de Rapporteur.

Je suis très reconnaissante envers Messieurs DUBOIS et VERBERT qui ont bien voulu faire partie de mon jury et ont accepté de juger ce mémoire.

Je remercie tout particulièrement Mademoiselle BRASSART pour son aide et sa gentillesse, Madame JOVENIN pour le soin apporté à la dactylographie, et je suis également reconnaissante à Madame DUBOIS pour la réalisation des photographies qui illustrent ce travail.

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

Je ne saurais oublier mes parents qui m'ont permis de réaliser cette thèse, et m'ont soutenue tout au long de mes études. Qu'ils en soient vivement remerciés par la présentation de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
A. Embryogenèse somatique : grandes lignes	4
1 - Le choix de l'explantat	4
2 - Le rôle de l'auxine et des autres substances de croissance	5
a) Chez <i>Daucus carota</i>	6
b) Chez d'autres Dicotylédones	6
c) Chez les Monocotylédones	7
3 - Le rôle du nutriment azoté	8
a) Chez la Carotte sauvage	8
b) Chez les autres plantes	10
4 - Origine des embryons somatiques	10
B. Nitrate réductase et différenciation	12
C. Etude moléculaire de la nitrate réductase	14
1 - Les différentes formes enzymatiques	15
2 - Origine de l'activité NADPH : nitrate réductase	16
3 - Origine des pyridines nucléotides	19
D. Extraction et purification de la nitrate réductase	22
1 - Extraction de l'enzyme	22
2 - Purification de la nitrate réductase	24
a) Les techniques anciennes de purification	24
b) La chromatographie d'affinité	26
MATÉRIEL ET MÉTHODES	29
A. Origine de la suspension cellulaire de <i>Daucus carota</i>	30
1 - Préparation du matériel végétal	30
2 - Composition du milieu de culture	30
3 - Conditions de culture	32

	Page
B. Mesure des différentes activités enzymatiques	32
1 - Activité NAD(P)H : nitrate réductase mesurée "in vivo".	32
2 - Activité NAD(P)H : nitrate réductase mesurée "in vitro"	33
a) Méthode d'extraction	33
b) Mesure des activités NADH : et NADPH : NR	34
3 - Mesure des activités GDH (L-glutamate : NAD oxydo réductase, EC.1.4.1.2.) et GS (L-glutamate : ammonia ligase (ADP) EC 6.3.1.2.)	34
C. Purification des enzymes	35
1 - DEAE-cellulose	35
2 - Hydroxylapatite (ultrogel)	35
3 - Bleu Séphadex	36
4 - 5'AMP Séphadex	36
5 - Dosage des protéines	36
D. Analyses en électrophorèse sur gel de polyacrylamide	36
RÉSULTATS	38
A. Méthodologie	39
1 - Mesure de l'activité nitrate réductase "in vivo"	39
a) Action du propanol et du KNO_3 sur l'activité	39
b) Recherche du pH optimal de l'activité enzymatique mesurée "in vivo"	41
2 - Mesure de l'activité nitrate réductase "in vitro"	41
a) Conditions d'extraction de la nitrate réductase	41
b) Mesure des activités enzymatiques	45
c) pH et stabilité mesurés "in vitro"	47
B. Caractéristiques cinétiques de la nitrate réductase des cellules	49
1 - Détermination des $\text{K}_m \text{NO}_3$, $\text{K}_m \text{NADH}$ et $\text{K}_m \text{NADPH}$ de la nitrate réductase ³ de <i>Daucus carota</i>	49
a) Calcul des K_m pour le nitrate	49
b) Calcul du K_m pour le NADH	50
c) Calcul du K_m pour le NADPH	50
2 - Origine du NADH	56

	Page
C. Purification de l'enzyme	58
1 - Le Bleu Séphadex	60
2 - La chromatographie sur hydroxylapatite (Ultrogel)	62
3 - La chromatographie sur DEAE-cellulose	62
4 - La 5'AMP Sépharose	63
5 - Electrophorèse	65
6 - Immunoprécipitation	67
D. Evolution de l'activité nitrate réductase et de la croissance des cellules et des embryons	69
1 - En fonction de la quantité de cellules ou embryons ensemencée	69
2 - Au cours de l'évolution des embryons	70
3 - Activité nitrate réductase en fonction de la taille des cellules et des embryons	74
4 - Activité enzymatique des plantules	80
5 - Evolution de l'activité nitrate réductase en fonction de la lumière	82
6 - Action de l'acide abscissique sur la croissance et l'activité nitrate réductase	82
E. Action d'inhibiteurs de la synthèse protéique	86
1 - Action des inhibiteurs sur l'activité nitrate réductase	86
2 - Action des inhibiteurs sur la croissance	88
F. Etude de la glutamine synthétase et de la glutamate déshydrogénase	94
1 - Etude enzymatique de l'activité GS chez les cellules et les embryons de Carotte	94
2 - Etude enzymatique de la GDH des cellules et des embryons somatiques de Carotte	96
DISCUSSION	100
A. Aspects méthodologiques - mesure de l'activité nitrate réductase	101
B. Origine du NADH	105
C. Modifications de l'activité de la nitrate réductase. Problème de l'induction	106
1 - Modifications de l'activité de la nitrate réductase	106
2 - Problèmes de l'induction	109

	Page
D. Etude des enzymes assimilatrices de l'ammonium	110
CONCLUSION	113
BIBLIOGRAPHIE	115

ABREVIATIONS

ABA	: acide abscissique
Act. NR	: activité nitrate réductase
ADH	: alcool déshydrogénase
ADP	: adénosine diphosphate
AG ₃	: acide gibbérellique
AIA	: acide indole-3-acétique
AMP	: adénosine monophosphate
ANA	: acide naphtalène acétique
AOA	: acide oxaloacétique
ARN	: acide ribonucléique
ATP	: adénosine triphosphate
BA	: benzyladenine
Cyt	: cytochrome
2,4-D	: acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
DEAE-	: diéthylaminoéthyl-
DO	: densité optique
EDTA	: acide éthylène diamino tétra-acétique
FAD-FADH ₂	: formes oxydées et réduite du flavine adénine dinucléotide
GDH	: glutamate déshydrogénase = L - glutamate NAD ⁺ oxydo- réductase
GHA	: γ glutamyl hydroxamate
GS	: glutamine synthétase = L glutamate : ammonialigase (ADP)
HPLC	: high performance liquid chromatography
2iP	: N ⁶ (2 isopentényl adénine)
KIN	: kinétine
K _m	: constante de Michaélis
MF	: matière fraîche
NAD ⁺ -NADH ⁺	: formes oxydée et réduite du nicotinamide dinucléotide
NADP ⁺ -NADPH ⁺	: formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine dinu- cléotide phosphate
NR	: nitrate réductase

Obj. : objectif
PVP : polyvinyl pyrrolidone insoluble
rpm : révolutions par minute
TCA : acide trichloracétique
TEMED : tétra méthylène diamine

INTRODUCTION

La source principale d'azote pour la plupart des plantes supérieures et de nombreux microorganismes est le nitrate. Celui-ci induit la nitrate réductase, qui est la première enzyme de la chaîne de réduction de l'azote. C'est d'ailleurs l'étape de transformation du nitrate en nitrite qui constitue le lieu de régulation le plus important .

De nombreuses études ont porté sur la dépendance de l'embryogenèse somatique vis à vis de la nutrition azotée. Dans ces conditions, il est intéressant d'étudier les variations de l'activité nitrate réductase et de l'assimilation de l'azote au cours de ce phénomène de différenciation. D'autant plus que l'embryogenèse permet une étude plus facile du fait du grand nombre d'embryons somatiques que l'on peut obtenir en cultivant des cellules de Carotte sauvage dans un milieu liquide ne renfermant pas de substances de croissance.

La nitrate réductase peut constituer un marqueur intéressant dans l'étude de l'organogenèse et peut contribuer à notre compréhension des modifications biochimiques qui accompagnent la différenciation, c'est dans cette perspective que ce travail a été réalisé.

Nous avons donc étudié, après une approche de la détermination des caractéristiques enzymatiques de la nitrate réductase de Carotte sauvage, l'évolution de l'activité enzymatique au cours de l'embryogenèse somatique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Un embryon de plante, qu'il soit zygotique ou non, peut être défini comme un nouvel individu dérivant d'une seule cellule et n'ayant pas de connections vasculaires avec les tissus maternels. La formation de l'embryon zygotique implique la fusion de gamètes pour former une cellule unique, l'oeuf, qui se développe en une nouvelle plante. Dans ce cas, la plante qui en résulte est un nouvel individu dont le génotype est différent. Par la multiplication asexuée, la formation d'un embryon somatique se fait à partir d'une cellule somatique banale. La plante qui se développe à partir de cet embryon possède un génotype identique à l'individu dont elle provient.

A. - Embryogenèse somatique : grandes lignes

L'embryogenèse somatique a été observée pour la première fois, dans les suspensions cellulaires de *Daucus carota* par STEWARD et Col. (1958) et par REINERT (1958-1959) dans des cultures de cals cultivés sur un milieu semi-solide.

Depuis, elle a été observée chez plus de 200 espèces, (TISSERAT et Col., 1979). mais elle semble être plus répandue chez certaines familles de Dicotylédones, comme les Ombellifères (*Daucus carota*), mais aussi les Renonculacées (DORION et Col., 1984), les Rutacées et les Solanacées.

Les facteurs qui permettent aux cellules d'acquérir la compétence à devenir embryons somatiques, commencent à être connus. L'auxine et la source azotée des milieux de culture en sont les deux facteurs essentiels. De plus, l'âge de l'explantat, le stade de développement et la nature de la plante dont il est issu jouent un rôle dans l'induction de l'embryogenèse somatique.

1 - Le choix de l'explantat

Chez les Graminées, ce facteur semble être prédominant (BOTTEI et Col., 1984). Ce sont bien souvent des cellules de fragments d'organes jeunes qui possèdent la compétence à se différencier en em-

bryons somatiques. Par exemple, des inflorescences et des embryons immatures ou des jeunes feuilles.

La probabilité d'obtenir des embryons somatiques dépend largement du stade de développement de l'organe utilisé, (VASIL, 1985). Chez *Pennisetum americanum* (VASIL et Col., 1982) l'embryon immature prélevé 10 à 15 jours après la pollinisation, offre l'aptitude la plus grande à former des embryons somatiques. Chez *Panicum miliare*, ce sont les jeunes inflorescences dans lesquelles les primordiums floraux ont juste commencé à se former (RANGAN et Col., 1983). Pour *Saccharum officinarum* L., les 4èmes et 5èmes feuilles sont les plus aptes à l'embryogenèse, et seulement les parties basales de ces feuilles (HO et Col., 1983).

Chez les Dicotylédones, ces facteurs sont moins primordiaux, chez *Daucus carota*, n'importe qu'elle partie de la plante prélevée à n'importe quel stade de développement est apte à donner des embryons somatiques : les hypocotyles pour FUJIMURA et Col. (1979) et CATTOIR et Col., (1983), mais aussi les pétioles (FUJIMURA et Col., 1975 ; DREW, 1979), les racines (ROSE et Col., 1974, SUZICH et Col., 1984) les embryons (STEWART et Col., 1964, RUBOS, 1985). Chez la Carotte sauvage, les explants les plus utilisés sont les pétioles et les racines.

2 - Le rôle de l'auxine et des autres substances de croissance

L'embryogenèse somatique est induite dans des amas cellulaires ; elle n'est pas possible à partir d'une cellule isolée (HALPERIN et JENSEN, 1967). C'est la position d'une cellule au sein de l'amas, qui détermine la potentialité de cette cellule à se développer en embryon. La présence d'une auxine ou plus particulièrement de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) inhibe complètement le développement de la cellule proembryonnaire. .

Des cellules, soumises à une forte teneur en auxine continuent à croître sous une forme inorganisée et indifférenciée, mais si on les repique dans un milieu sans auxine, elles peuvent

alors se développer en embryons somatiques. Les concentrations en auxine et la nature de la molécule auxinique varient suivant les espèces et les variétés.

a) Chez *Daucus carota*

Les premiers travaux ont été réalisés chez la Carotte. En fait, elle est la plante qui illustre le mieux cette théorie. Pour KATO et TAKEUCHI (1966), 0,1 à 10 mg/l de 2,4-D sont nécessaires à l'embryogenèse alors que HALPERIN et Col. (1965) n'en emploient que 0,01 mg/ml pour obtenir l'embryogenèse, sinon les proembryons continuent à se développer en une structure indifférenciée. La baisse de la concentration en 2,4-D permet une différenciation histologique et une croissance polarisée.

Les recherches de FUJIMURA et Col. (1975) vont dans le même sens que celles de HALPERIN (1966). Il supprime complètement le 2,4-D ou n'en conserve qu'une concentration inférieure à 0,025 mg/l.

Quand les cellules se différencient en embryons, la zéatine (10^{-7} M) exerce un effet activateur alors que la kinétine et la benzyladenine (BA) sont inhibitrices (HALPERIN et Col., 1965 ; FUJIMURA et Col. 1980). C'est peut être dû au fait que la zéatine est une hormone naturelle, alors que les deux autres sont des substances de synthèse. L'acide abscissique (ABA) et l'acide gibbérellique (AG_3) ont aussi été testés. Dans les premiers stades de croissance des embryons, aucune différence n'est observée, mais après le stade "coeur", ces hormones exercent une action inhibitrice du développement des embryons (FUJIMURA et Col., 1975).

b) Chez d'autres Dicotylédones

Chez la Renoncule scélérate, les embryons se développent spontanément à partir de protoplastes. La morphologie et le développement des embryons somatiques cultivés dans des conditions d'isolement sont fortement influencés par l'équilibre hormonal. La présence d'auxine (acide naphthalène acétique (ANA) 3 à 4 mg/l) empêche le développement des embryons somatiques et entraîne la formation de masses méristématiques globulaires, ou d'embryons anormaux.

La BA (1 mg/l) utilisée seule, provoque la formation d'embryons anormaux ; l'organogenèse s'effectuant surtout au profit des cotylédons et des feuilles. Par contre, dans les milieux sans régulateur de croissance ou dont l'équilibre hormonal est réalisé par le N⁶(2 isopentenyl) adenine (2ip) (1 mg/l) et l'ANA (1 mg/l), le développement des embryons se déroule normalement (DORION et Col., 1984).

Chez une autre Renonculacée , *Nigella sativa*, la morphogenèse est induite par un milieu renfermant du lait de coco (15 %), de l'acide indole-3- acétique (AIA) (0,5 mg/l) mais on n'obtient des embryons somatiques que si l'on remplace le lait de coco par de l'hydrolysate de caséine (100 ou 500 mg/l)(BANERJEE et Col., 1976).

Chez *Medicago sativa*, le milieu d'induction renferme 100 µM de 2,4-D et 5 µM de kinétine (KIN), 10 jours après le transfert sur un autre milieu les embryons se développent.

La balance hormonale de ce milieu de développement joue un rôle essentiel : 10 µM de KIN et 1 µM d'ANA sont nécessaires au développement d'un grand nombre d'embryons, alors que sans substance de croissance ou avec seulement de la KIN, peu de plantes sont obtenues (NOVAK et Col., 1982). La dernière phase, appelée phase de germination, demande un milieu sans hormone. KAO et Col., (1981) qui travaillent sur la même plante que NOVAK et Col., (1982), observent le même besoin d'une balance hormonale entre les auxines et les cytokinines, mais ce besoin s'exprime au moment de la phase d'induction. Les concentrations qu'ils emploient, varient selon les différentes variétés et sont critiques pour l'embryogenèse. Après l'induction, les cellules sont transférées sur un milieu sans hormone.

c) Chez les Monocotylédones

Pour les Graminées et les Herbacées , l'auxine joue un rôle très important dans l'induction des cals embryogènes. Le 2,4-D est le régulateur de croissance le plus efficace pour l'induction et la formation des embryons somatiques (HO et Col., 1983) des Herbacées. Lorsque la concentration en 2,4-D est basse (0,5 mg/l), les embryons apparaissent spontanément dans les cals sans changer la concentration en 2,4-D. Chez *Hordeum vulgare*, il faut 2,5 mg/l de 2,4-D pour induire l'embryogenèse, la régénération est meilleure sur un milieu sans hormone ou contenant uniquement de l'ABA (THOMAS et Col., 1985). Chez

Zea mays, 0,5 mg/l suffisent pour induire l'embryogenèse (LOWE et Col., 1985).

3 - Le rôle du nutriment azoté

a) Chez la Carotte sauvage

Ce sont HALPERIN et Col., en 1965 et REINERT et Col., en 1967, qui ont soulevé le problème de la nature de la source azotée nécessaire à l'initiation de l'embryogenèse et à son déroulement. Mais leurs résultats furent contradictoires.

HALPERIN et Col. (1965) lorsqu'ils transfèrent des cals de Carotte sauvage d'un milieu renfermant du 2,4-D sur un milieu sans hormone, donc permettant l'embryogenèse observent qu'il n'y a pas de phénomène d'organogenèse si la source azotée est du nitrate ; les cals continuent à se multiplier indéfiniment. La simple addition de 5mM d'ammonium, qui inhibe légèrement la croissance, permet l'embryogenèse.

Au microscope, dans un milieu renfermant de l'ammonium, ils observent des structures pluricellulaires filamenteuses qui ne sont pas visibles dans un milieu contenant essentiellement du nitrate comme seule source d'azote. Ces structures filamenteuses sont des proembryons.

Alors que l'ammonium est indispensable pour l'initiation de l'embryogenèse, HALPERIN et Col. (1965) observent que le nitrate est suffisant pour le développement des proembryons, mais il est possible que les jeunes embryons trouvent l'azote réduit dont ils avaient besoin en absorbant l'azote rejeté, sous des formes moléculaires variées, par des cellules vivantes ou mortes.

Les proembryons non différenciés de *Cattleya* sp. ont par contre besoin d'ammonium pour se différencier (RAGHAVAN et TORREY, 1964).

REINERT et Col., (1967) parallèlement font des observations qui vont à l'encontre des résultats de HALPERIN et Col. (1965) ; le nitrate et le nitrate d'ammonium peuvent tous deux initier la formation d'embryons somatiques.

Pour eux, le fait que n'importe quelle forme d'azote ait un effet positif sur l'embryogenèse n'est pas dû à la forme sous laquelle l'azote est fourni, mais à la quantité globale d'azote que l'on introduit dans le milieu. Dans un milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962), si la quantité d'azote est réduite de 60 à 1,5 mM, la capacité embryogène de la souche disparaît.

L'action positive des deux formes d'azote, nitrate et nitrate d'ammonium, peut être due aux ions accompagnateurs K^+ et NH_4^+ . REINERT et Col. (1967), montrent que l'action positive du K^+ est évidente pour les faibles concentrations de KNO_3 , mais que le K^+ n'a plus d'action quand on augmente les quantités en nitrate de potassium. L'effet stimulateur de ces cations pourrait être dû à la perméabilité des cellules de Carotte aux deux cations ou aux activités des enzymes impliquées dans la conversion de l'azote "in vivo", ou les deux en même temps.

WETHERELL et DOUGALL, en 1976, ont voulu essayer de trancher les divergences observées par REINERT et Col. (1967) et HALPERIN et Col. (1965). Ils pensent que le problème vient de l'inoculum et de l'évaluation de l'embryogenèse. L'utilisation d'un inoculum bien séché, bien lavé et de faible volume, réduit le surplus de substances solubles apporté. Car l'addition de seulement 0,1 mM de chlorure d'ammonium à un milieu renfermant du KNO_3 comme source d'azote, est suffisante pour induire l'embryogenèse. De plus, REINERT et Col. (1967) considèrent qu'une souche est embryogène lorsqu'elle ne produit que quelques embryons ; les autres auteurs considèrent une souche embryogène lorsqu'elle en produit des centaines.

Le chlorure d'ammonium, peut être remplacé par de la glutamine, de l'acide glutamique, de l'urée ou de l' α -alanine (WETHERELL et Col., 1976) mais l'ammonium reste la source d'azote réduit la plus efficace (HALPERIN et Col., 1965). Pour KATO et TAKEUCHI (1966) les résultats sont identiques avec de l'ammonium ou avec de l'asparagine, de la glutamine ou de l'arginine.

En 1979, KAMADA et HARADA, étudient à leur tour les besoins en azote de l'embryogenèse et concluent que la présence d'azote réduit dans le milieu n'est pas un besoin strict pour l'induction

de l'embryogenèse somatique mais que le milieu en a besoin pour le développement des embryons. L'étude de l'action des acides aminés sur l'embryogenèse fait ressortir que certains acides aminés comme l' α -alanine, l'asparagine, l'acide glutamique, l'arginine et la proline stimulent l'embryogenèse alors que d'autres tels que la lysine, la valine, l'histidine, la leucine ou la méthionine n'ont aucun effet.

b) Chez les autres plantes

Les autres espèces n'ont pas été autant étudiées quant à la source d'azote, mais dans tous les cas, les auteurs emploient des milieux riches en azote comme le milieu de Murashige et Skoog, pour *Saccharum officinarum* (HO et Col., 1983), *Penisetum americanum* (BOTTI et Col., 1984) ou pour *Cocos nucifera* (GUPTA et Col., 1984).

Quand le milieu choisi renferme peu d'azote, les auteurs sont souvent obligés de le modifier ; DORION, (1984), chez la Renoncule scélérate, emploie les macroéléments minéraux de WHITE (1943), mais y ajoute 400 mg/l de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et 100 mg/l de glutamine. TULECKE et Col. (1985), chez *Juglans regia*, ajoutent 250 mg/l de glutamine au milieu de base préconisé et remarquent que le fait que la glutamine soit dégradable à haute température n'empêche pas l'embryogenèse. Les produits de dégradation de la glutamine sont donc aussi des facteurs embryogènes.

Pour l'embryogenèse de *Cyanopsis tetragonoloba*, le milieu B5 de GAMBORG et Col. (1968) est utilisé, il est modifié en remplaçant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par NH_4NO_3 à 400 mg/l et en baissant la concentration en KNO_3 de 20 %. Ce milieu est additionné de 292 mg/l de glutamine (Mac HUGHEN et Col., 1984).

4 - Origine des embryons somatiques

En 1964, STEWARD et Col., avançaient l'hypothèse que les embryoïdes sont issus, dans les suspensions cellulaires de Carotte, de cellules uniques isolées. En 1967, HALPERIN et JENSEN, considèrent que les embryoïdes s'initient le plus souvent, ou même toujours à la surface des agrégats cellulaires que l'on peut observer aussi

dans les suspensions cellulaires de *Daucus carota*.

Plus tard, en 1970, BACKS-HUSEMAN et REINERT, démontrent la validité des hypothèses de STEWARD et Col., (1964), et obtiennent un embryoïde à partir d'une cellule unique. Mais cette cellule, avant de donner un embryon, s'est divisée pour donner un cal et c'est à partir de ce cal qu'un ou plusieurs embryons ont été initiés.

Mac WILLIAM et Col., (1974) retrouvent les mêmes résultats. L'origine des embryons est donc unicellulaire mais à l'intérieur des cals embryogènes.

Des travaux sur d'autres plantes, *Ranunculus sceleratus* et *Atropa belladonna* (KONAR et Col., 1972a ; KONAR et Col., 1972b), montrent l'origine unicellulaire de l'embryon somatique au sein du tissu mis en culture.

Plus récemment, HO et Col. (1983), chez *Saccharum officinarum* L. mettent en évidence le même phénomène. Les embryoïdes sont initiés à partir de cellules situées à la périphérie de cals embryogènes.

Les cellules cibles de l'initiation d'embryons somatiques sont de petites cellules méristématiques avec un gros noyau central, de petites vacuoles, et elles sont riches en cytoplasme (JONES, 1974 ; Mac WILLIAM et Col., 1974 ; HO et Col., 1983).

L'embryon issu de ces cellules somatiques s'individualise du tissu environnant, à des stades ultérieurs du développement. L'embryogenèse somatique étant sous le contrôle de la nutrition azotée, il est intéressant d'étudier les variations de l'activité nitrate réductase et les modifications éventuelles des différents isoenzymes de l'assimilation de l'azote au cours des phénomènes de différenciation.

L'utilisation de l'embryogenèse somatique permet une étude plus facile du fait de l'identité génétique de tous les embryons

et de la souche mère mais aussi parce qu'il est possible d'obtenir des structures différenciées en quantité.

B. - Nitrate réductase et différenciation

La différenciation de structures organisées à partir d'explants est de toute évidence sous contrôle génétique et s'accompagne de modifications enzymatiques (BONNER, 1965).

Les changements qui s'opèrent lors des phénomènes de différenciation, affectent souvent les enzymes de la réduction et de l'assimilation de l'azote. Les modifications ont souvent été mises en parallèle avec la croissance ou la sénescence.

SIMMONS et MOSS (1978) observent une chute de l'activité nitrate réductase durant les deux semaines qui suivent l'anthèse chez le Blé. Il y a donc une baisse de l'activité en accord avec un phénomène de sénescence.

Les variations de l'activité nitrate réductase ont été étudiées au cours de l'ontogenèse des feuilles de Concombre (BLAHOVA et Col. 1980) l'activité nitrate réductase augmente lorsque les feuilles grandissent et elle décroît à la sénescence des feuilles. L'activité dépend de l'âge de la plante et des organes. Chez le Radis ou les cotylédons de Concombre, le maximum d'activité nitrate réductase est corrélé avec le maximum de poids de l'organe. Chez *Sorghum bicolor* (VAISHNAV et Col., 1978), l'activité nitrate réductase montre une corrélation inverse avec la hauteur des plantes, les cultivars nains possèdent une plus forte activité enzymatique.

Le maximum d'activité se situe au moment où la feuille cesse de grandir. Chez l'Orge on observe un maximum d'activité, juste avant la fin de l'élongation des premières feuilles, et ensuite une chute de l'activité et une accumulation de nitrate (DUDEL et Col., 1974).

Les changements saisonniers de l'activité enzymatique chez *Laminaria digitata* suivent la croissance. On observe un maximum en mai et un minimum en octobre-novembre. Les cellules ont la

possibilité de stocker de l'azote pendant l'hiver, (DAVISON et Col., 1984).

Les variations de l'activité nitrate réductase ont aussi été étudiées au cours de la germination de graines et du développement de plantules. Selon EVANS et NASON (1953), l'activité est toujours la plus élevée dans les tissus "jeunes et métaboliquement actifs".

Dans les plantules de Coton (RADIN, 1975) et de Maïs (WALLACE, 1973), l'activité est toujours plus élevée dans les apex racinaires. Chez les feuilles de Concombre, c'est la même chose, la nitrate réductase est plus intense dans les jeunes feuilles et leurs portions méristématiques (BLAHOVA et Col., 1980).

Les relations activité nitrate réductase et différenciation organogène n'ont pas souvent été étudiées. La formation des racines, chez *Phaseolus vulgaris*, est associée avec le changement des activités enzymatiques du métabolisme de l'azote (BURZINSKI et Col. 1982). Les activités nitrate réductase, nitrite réductase et glutamate déshydrogénase (GDH) sont augmentées à la formation des racines, alors que l'activité glutamine synthétase (GS) baisse après l'induction de la formation de racines par l'AIA. L'augmentation d'activité apparaît avant l'émergence des racines, c'est-à-dire à une période où elle est essentielle pour la synthèse de protéines nécessaires à la rhizogenèse.

Lors de la caulogenèse, chez la Canne à sucre, les cals qui produisent des tiges ont une activité nitrate réductase plus élevée que les cals non caulogènes, (DWIDEDI et Col., 1984). Contrairement à la rhizogenèse, chez *Phaseolus vulgaris*, la GS présente une forte activité dans les cals caulogènes et la GDH est faible. KAMADA et HARADA (1984) ont étudié les variations de l'activité nitrate réductase pendant l'embryogenèse somatique de la Carotte sauvage. Ils démontrent qu'une grande quantité d' α -alanine incorporée simultanément au milieu de culture avec du nitrate stimule la prolifération cellulaire et initie l'embryogenèse somatique.

Quand certains composés azotés, qui favorisent l'embryogenèse somatique, comme l' α -alanine sont ajoutés en plus du nitrate dans le milieu de culture, les activités des enzymes du métabolisme de l'azote, en particulier la nitrate réductase, sont augmentées pendant les premiers stades de l'embryogenèse somatique et aux stades ultérieurs.

L'addition de certains acides aminés, comme l' α -alanine, la glutamine, l'asparagine et l'acide aspartique, en plus du nitrate, stimule la prolifération cellulaire et la nitrate réductase est activée aux 7ème et 13ème jours de culture.

L'addition de proline, et d'arginine stimule modérément la prolifération cellulaire, la nitrate réductase n'est activée que le 13ème jour. La lysine, la valine et la leucine inhibent la prolifération cellulaire et inactivent la nitrate réductase. D'autre part ces mêmes acides aminés exercent parallèlement des effets stimulateurs et inhibiteurs sur l'embryogenèse.

L'augmentation des activités des enzymes de l'assimilation de l'azote, permet peut-être la synthèse de protéines propres à l'embryogenèse. SUNG et OKIMOTO (1981) ont d'ailleurs démontré l'existence de deux protéines qui n'existent que dans des proembryons et qui apparaissent lorsque l'on induit des cultures cellulaires à donner des embryons somatiques.

C. - Etude moléculaire de la nitrate réductase

La source principale d'azote pour la plupart des plantes supérieures et de nombreux microorganismes, est le nitrate. Celui-ci induit la nitrate réductase, qui est la première enzyme de la chaîne de réduction du nitrate.

La caractérisation de la nitrate réductase est essentielle pour comprendre le métabolisme de l'azote.

La nitrate réductase est une enzyme, protéine complexe, induite par son substrat et elle possède un cofacteur molybdénique,

du FAD et le cytochrome b557.

NADH, NADPH, FADH₂, méthyl viologène et benzyl viologène réduits, peuvent être utilisés par les nitrate réductases des Eucaryotes pour réduire le nitrate.

La plupart des plantes supérieures ont des nitrate réductases spécifiques-NADH, avec quelques exceptions où deux enzymes sont décrites : l'une spécifique de NADH et l'autre bispécifique avec une affinité plus grande pour NADPH que NADH (SNAPP et Col., 1984).

1 - Les différentes formes enzymatiques

Il semble exister trois formes de nitrate réductases, la NADH : NR (EC 1.6.6.1.) qui est réduite par le NADH, la NAD(P)H : NR (EC 1.6.6.2.) qui utilise aussi bien NADH que NADPH comme donneur d'électrons et la NADPH : NR (EC 1.6.6.3.) qui n'utilise que NADPH, on la rencontre surtout chez les Champignons, par exemple *Penicillium chrysogenum* (RENOSTO et Col., 1981).

La NAD(P)H : NR a initialement été partiellement purifiée et caractérisée chez *Neurospora crassa* (NASON et EVANS, 1953). Une enzyme semblable est ensuite découverte dans le Soja par EVANS et NASON (1953). L'enzyme extraite des feuilles de Soja, peut utiliser aussi bien le NADPH que le NADH et avec la même efficacité. Les études qui suivirent montrèrent que sur 16 plantes étudiées (BEEVERS et Col., 1964), quinze plantes présentent un besoin spécifique pour le NADH comme co-facteur.

Dans la majorité des plantes testées, le NADPH est incapable de servir de donneur d'électrons et dans les quelques cas où il peut être impliqué dans la réduction du nitrate, le taux de réduction est dix fois plus faible qu'avec NADH, sauf dans les extraits de Soja ; l'enzyme présent dans les extraits de Soja peut utiliser aussi bien NADH que NADPH.

D'ailleurs chez le Soja, le pH optimal d'activité est différent, il est de 6,25 au lieu de 7,5 chez les autres plantes.

L'efficacité relative de NADPH ou NADH à fonctionner comme co-facteur pour la nitrate réductase de Soja dépend de la méthode d'extraction. Le NADH est deux fois plus efficace que le NADPH si de la cystéine est ajoutée au tampon d'extraction. EVANS et NASON (1953) n'en mettaient pas et obtenaient le même pouvoir reducteur avec NADH et NADPH. Le même phénomène est observé chez le Riz (SHEN et Col., 1976) : une nitrate réductase qui peut utiliser aussi bien le NADH que le NADPH. Si les germinations de Riz sont induites avec du nitrate, la nitrate réductase préfère le NADH, mais si le chloramphénicol ou un autre composé azoté est inducteur, l'enzyme présente une préférence pour NADPH. La différence de réactivité vis à vis des deux nucléotides n'est pas due à des réactions secondaires dans les extraits, mais il y a en fait deux enzymes formées en réponse des différents inducteurs.

CAMPBELL, trouve en 1978, une nitrate réductase bispécifique dans le scutellum de Maïs, alors que les feuilles ne semblent avoir qu'une NADH: NR typique.

En fait, il semblerait que la NADPH : NR soit plus souvent représentée qu'on ne le pensait, car plus récemment, on en a trouvé dans les racines de Maïs, de l'Orge, du Blé et de l'Avoine (REDINBAUGH et CAMPBELL, 1982 ; DAILEY et Col., 1982 ; HEAT-PAGLIUSO et Col., 1984).

2 - Origine de l'activité NADPH ; nitrate reductase

Nous avons vu que chez certaines plantes, la nitrate réductase présente deux types d'activités.

Depuis que la NAD(P)H : NR (EC 1.6.6.2.) a été découverte puis étudiée, les auteurs se sont interrogés sur l'origine de cette activité NADPH:NR, il y a en fait trois possibilités : soit il existe deux formes distinctes de nitrate réductases,

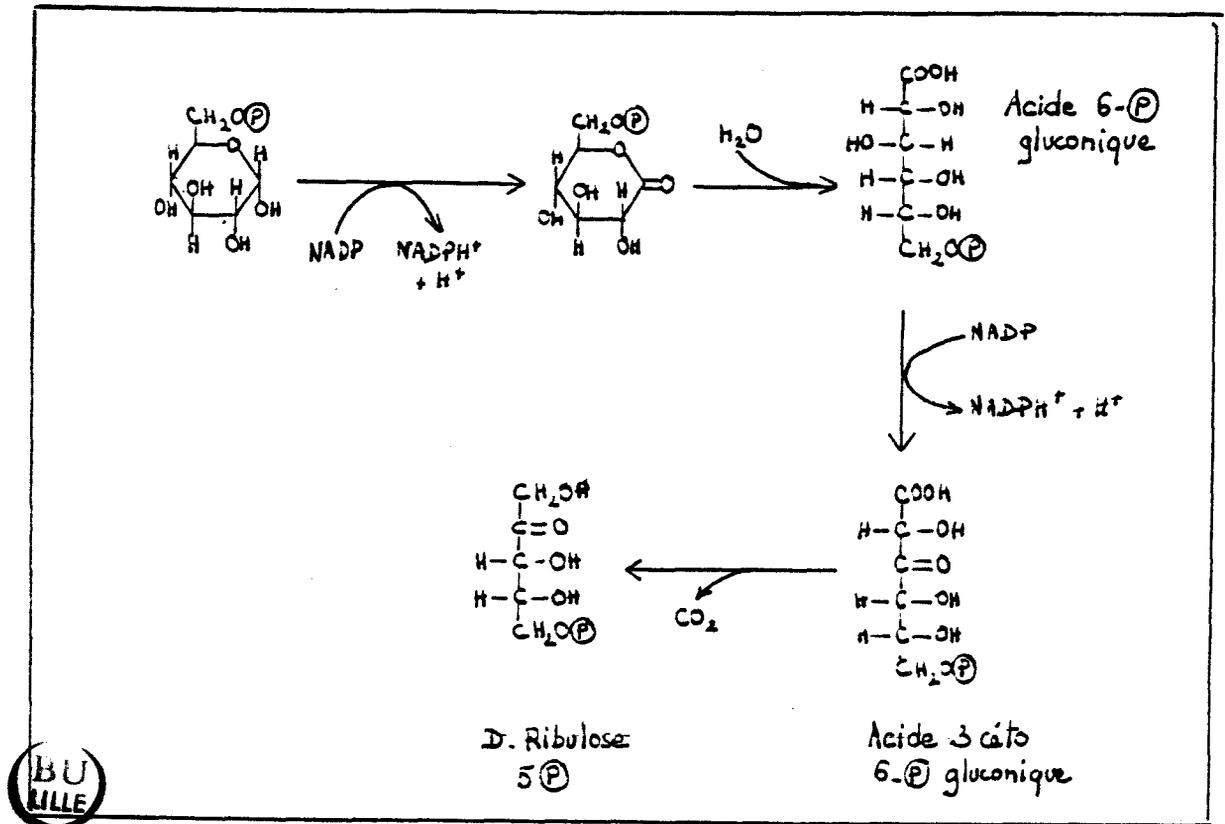
une qui fonctionne exclusivement avec NADH et l'autre avec NADPH ; soit alternativement, la nitrate réductase serait spécifique d'un seul pyridine nucléotide (HAGEMAN et HUCKLESBY, 1971), la troisième possibilité est la rapide conversion du NADPH en NADH par une transhydrogénase ou une phosphatase (WELLS et HAGEMAN, 1974).

BEEVERS et Col. (1964) n'ont pas pu montrer la présence de deux enzymes, mais il penche plutôt pour une seule nitrate réductase car la réduction du nitrate n'est pas augmentée quand un mélange de pyridine nucléotides remplace le NADH ou le NADPH comme co-facteur.

La présence d'une NADPH : NR dans les extraits de Soja et les feuilles de Maïs est expliquée par la conversion du NADPH en NADH par une phosphatase spécifique (WELLS et HAGEMAN, 1974). Il est impossible de séparer deux nitrate réductases, par chromatographie sur DEAE cellulose ou par focalisation isoélectrique. L'activité NADPH : NR est un artéfact dû à une phosphatase. De plus l'activité NADPH : NR est inhibée par des inhibiteurs de phosphatases.

Chez *Chlorella variegata*, où il existe deux types d'activités, HIPKIN et Col. (1979) montrent qu'après des étapes de purification partielle, l'activité NADPH : NR devient plus élevée que l'activité NADH : NR. Ce qui exclut la possibilité de l'intervention de phosphatases. De plus, par chromatographie, il obtient une fraction qui présente les deux activités avec des Km semblables pour le nitrate et les pyridines nucléotides et les mêmes profils de pH. Pour HIPKIN et Col. (1979) c'est la même enzyme mais elle peut utiliser soit NADH, soit NADPH. En 1982, DAILEY et Col., qui travaillent sur l'Orge, pensent qu'en fait l'activité NADPH : NR est une combinaison de l'action de phosphatases et d'une capacité de la NADH : NR à utiliser le NADPH. En effet, il existe dans l'Orge, deux activités enzymatiques, mais au cours de la purification enzymatique par chromatographie d'affinité, l'activité NADPH : NR est fortement inhibée de 80 à 55 %. Ces résultats suggèrent qu'une partie importante de l'activité NADPH : NR des extraits bruts de l'Orge est due à l'action de phosphatases. L'activité NADPH : NR restante semble étendue

Schéma 1 : Oxydation du glucose-6-P en ribulose-5-P



Pour chaque atome de carbone qui part sous forme de CO_2 , on a donc 2 oxydations accompagnées d'une formation de NADPH qui peut servir de co-facteur à la nitrate réductase.

à une propriété inhérente à l'enzyme d'Orge, le NADPH n'est pas converti en NADH par les phosphatases. L'enzyme d'Orge est donc une enzyme spécifique de NADH et elle possède une légère capacité à utiliser NADPH, particulièrement à des pH bas (pH6).

L'existence de deux molécules distinctes, une NADH : NR et une NADPH : NR a été montrée par JOLLY et Col. (1976). Ils séparent l'activité nitrate réductase des extraits de feuilles de Soja en activités NADH et NADPH : NR, par une chromatographie sur DEAE cellulose. Ils éluent par cette méthode deux enzymes : l'une avec un rapport d'activité NADPH et NADH : NR de 1,5 et l'autre avec un rapport de 0,56.

Les deux nitrate réductases peuvent être compétitives par rapport à la concentration en nitrate : la NADH : NR serait active pour des faibles concentrations de nitrate et la NADPH : NR pour de fortes concentrations. Les deux enzymes agissent peut-être séquentiellement suivant le développement des feuilles de Soja (CAMPBELL, 1976).

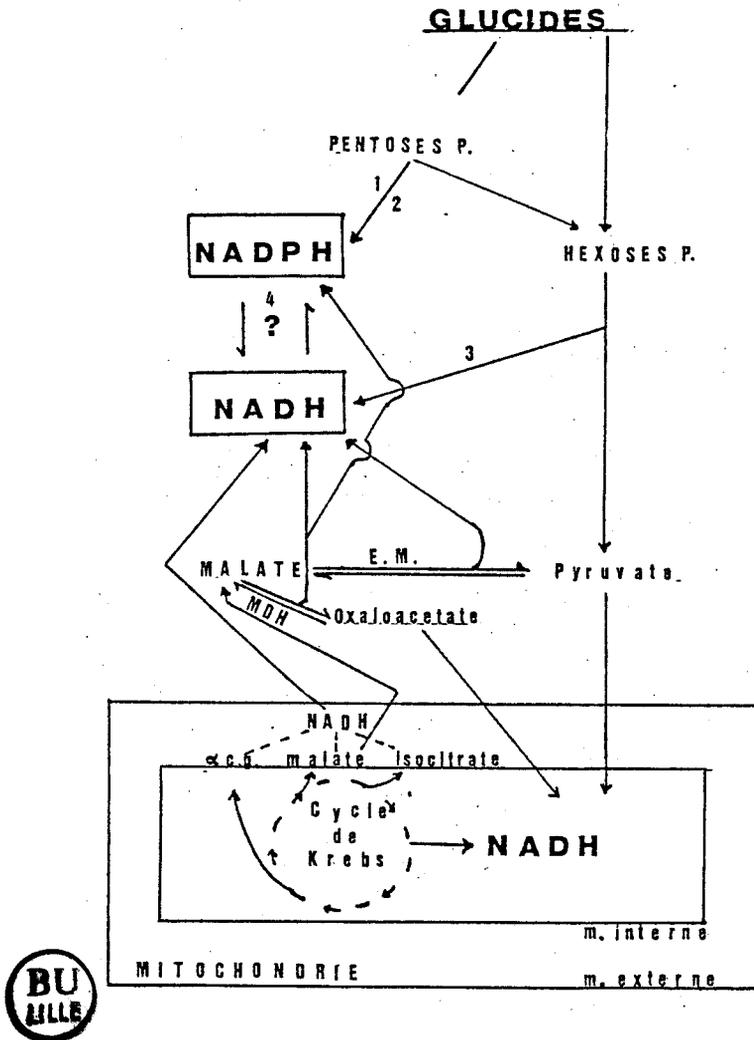
3 - Origine des pyridines nucléotides

Nous avons vu précédemment que le NADH et le NADPH étaient tous deux donneurs d'électrons dans la réduction du nitrate. Le problème de leur origine a souvent été soulevé.

Pour le NADPH, il semble qu'il provienne du cycle des pentoses phosphates, d'autant plus que son activité est accrue lors de l'assimilation des nitrates (JESSUP et FOWLER, 1977). (cf schéma n° 1).

Cependant, le NADH peut être produit de différentes façons ; des réactions de glycolyse, du cycle de Krebs ou de la chaîne respiratoire de transport d'électrons.

Schéma 2 : Origines du potentiel réducteur nécessaire à la réduction du nitrate dans les tissus non chlorophylliens (LEE, 1980).

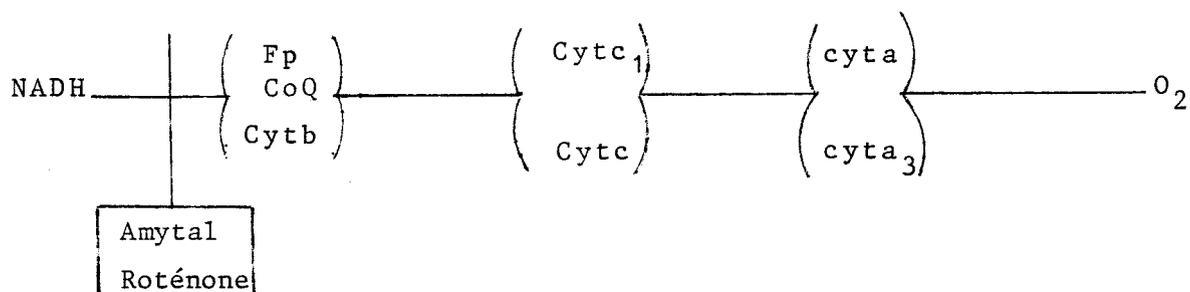


- 1 : glucose 6-phosphate déshydrogénase
- 2 : 6-phosphogluconate déshydrogénase
- 3 : NAD-glycéraldéhyde -3- phosphate déshydrogénase
- 4 : pyridine nucléotide transhydrogénase
- E.M. : enzyme malique à NAD⁺
- MDH : malate déshydrogénase à NAD⁺ ou NADP⁺.

L'assimilation du nitrate dans les feuilles est fermement liée à la photosynthèse, car l'ammonium, produit final de l'assimilation du nitrate est incorporé dans les acides aminés par le moyen de squelettes carbonés issus de l'assimilation du CO_2 .

La réduction du nitrate est souvent dépendante de la lumière et s'arrête à l'obscurité (CANVIN et ATKINS, 1974).

Cette régulation de la réduction du nitrate est en rapport avec la respiration mitochondriale qui s'effectue à l'obscurité mais qui est inhibée à la lumière par l'augmentation de la charge énergétique (SAWHNEY et Col., 1978). L'application d'amytal ou de roténone qui sont des inhibiteurs du transport d'électrons dans la chaîne respiratoire produisent une activation à l'obscurité de l'activité nitrate réductase.



Il y aurait une compétition entre la réduction du nitrate et la respiration mitochondriale pour le NADH. Le nitrate est donc réduit seulement lorsque l'oxydation du NADH est inhibée par l'augmentation de la charge énergétique à la lumière (REED et CANVIN, 1982) ou par des inhibiteurs spécifiques. Dans ce cas, le NADH accumulé est alors oxydé par une malate déshydrogénase mitochondriale (WOO et Col., 1980). Le malate passe ensuite dans le cytoplasme où il est converti en oxalo-acétate par une malate déshydrogénase cytoplasmique qui produit aussi du NADH (la nitrate réductase étant certainement cytoplasmique) (LOSADA et Col., 1981). L'entrée de l'acide oxalo-acétique (AOA) dans la mitochondrie permet le fonctionnement à la lumière du cycle de Krebs modifié (SAWHNEY et Col., 1979), (cf schéma n°2).

Mais l'une des voies essentielles capable de subvenir aux besoins en réducteurs serait la glycolyse. KLEPPER et Col. (1971) ont été les premiers à émettre cette hypothèse.

Par l'utilisation de divers métabolites de la glycolyse, du cycle des pentoses et du cycle de Krebs, ils concluent que les sucres qui migrent du chloroplaste vers le cytoplasme sont les sources principales d'énergie pour la formation de NADH. Dans les suspensions cellulaires non chlorophylliennes, le système est remplacé par l'apport de saccharose ou de glucose.

L'oxydation de la glycéraldéhyde 3-phosphate est la source principale de NADH pour la réduction du nitrate "in vivo". Cette conclusion est supportée par des expériences qui montrent l'inhibition par l'iodoacétate de la nitrate réductase.

Pour conclure, il semble que ce ne soit pas un seul système qui est mis en cause dans la réduction du nitrate, mais l'association ou l'alternance de plusieurs systèmes : deux sources principales peuvent-être retenues, celle de la NAD malate déshydrogénase et celle de la NAD glycéraldéhyde-3-phosphodéshydrogénase qui sont deux enzymes largement présentes dans le cytoplasme.

D. - Extraction et purification de la nitrate réductase

1 - Extraction de l'enzyme

L'extraction de la nitrate réductase des tissus ou cellules végétales présente de nombreuses difficultés. L'enzyme est obtenue par un broyage qui libère des composés phénoliques qui inhibent l'activité enzymatique.

LOOMIS et BATAILLE (1966) utilisaient une technique d'extraction de la nitrate réductase dans laquelle le polyvinylpyrrolidone insoluble (PVP) était utilisé pour absorber les composés phénoliques.

Il a aussi été démontré que l'addition de protéines comme la sérum albumine ou la caséine dans le milieu d'extraction, protège l'activité nitrate réductase de la dégradation par les enzymes protéolytiques. La caséine a été utilisée chez le Blé, l'Orge (SHERRARD et Col., 1979), le Riz (YAMAYA et OHIRA, 1976) et *Spirodela polyrrhiza* (BUCZEK, 1984).

Chez *Helianthus annuus* (KAISER et Col., 1984) l'addition de PVP et de caséine au tampon d'extraction augmente la stabilité de la nitrate réductase. L'accroissement est pourtant moindre pour l'enzyme extraite des racines que pour celle extraite des feuilles. Lorsque le tampon d'extraction ne contient pas de protecteurs, l'activité nitrate réductase est sensiblement égale dans les racines et dans les feuilles.

Le broyage du matériel végétal a pour autre conséquence de provoquer des oxydations cellulaires qui sont limitées par l'apport d'anti-oxydants au tampon d'extraction. Les anti-oxydants peuvent être ; la cystéine (CAMPBELL et SMARELLI, 1978 ; REDINBAUGH et Col., 1981), le dithiotreitol (PAN et Col., 1978 ; KUO et Col., 1980) ou le β -mercaptoéthanol (ROUSTAN et Col., 1974).

D'une manière générale, on inclut de la cystéine dans le tampon d'extraction, pour empêcher l'oxydation des groupements thiols de la nitrate réductase. Elle n'agit pas sur l'extractibilité de l'enzyme mais sur l'activité enzymatique elle-même. (OJI, 1982). Le taux requis pour protéger l'enzyme varie d'une espèce à une autre et même d'un tissu à un autre. Chez le Pois, on observe une activité enzymatique dans tous les tissus sans apport de cystéine ; elle est améliorée par une concentration de 10^{-5} M, mais inhibée par 10^{-2} et 10^{-3} M. De telles concentrations pourraient par contre améliorer la stabilité de l'enzyme chez d'autres espèces. Dans les racines d'Orge, l'addition de cystéine au tampon d'extraction (10mM) inhibe de 20 à 27 % l'activité nitrate réductase.

La leupeptine, un inhibiteur spécifique des thiols protéinases, stabilise la nitrate réductase des extraits de feuilles d'Orge (WRAY et KIRK, 1981). La leupeptine annule l'activité de la thiol protéinase de l'Orge (HAMANO et Col., 1984) qui catalyse la protéolyse de la nitrate réductase (OJI et Col., 1985). KUO et Col., (1982) et CAMPBELL et Col. (1983) utilisent aussi la leupeptine et obtiennent des résultats satisfaisants.

D'autres produits peuvent être ajoutés au tampon d'extraction et surtout des stabilisateurs de l'enzyme, tels le FAD, le molybdène et l'EDTA. L'EDTA est ajouté dans quasiment tous les tampons d'extraction. Son effet serait dû à l'inhibition du système NADH oxydant contaminant. C'est aussi un inhibiteur des métaloprotéases.

La nature du tampon d'extraction varie selon les auteurs, mais il s'agit soit du tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, dont le pH peut varier (CAMPBELL et Col., 1983 ; NELSON et Col., 1984 ; KAISER, 1984 ; FIDO et Col., 1984 et BUCZEK, 1984) soit du tampon Tris-HCl (KUO et Col., 1980 ; SOMERS et Col., 1982, CHIKWEN et Col., 1982 ; IDA et Col., 1983). Pour OJI et Col., (1985), l'extraction est faite avec du tampon Tris-HCl, mais après précipitation par le sulfate d'ammonium, le culot de centrifugation est repris par du tampon phosphate.

2 - Purification de la nitrate réductase

L'étude de la nitrate réductase a longtemps été retardée par des méthodes anciennes et lentes qui ne permettaient pas d'obtenir de bons rendements de purification. Depuis dix ans environ, l'utilisation de chromatographies d'affinité a accéléré l'isolement de l'enzyme.

a) - Les techniques anciennes de purification

Les premières purifications de la nitrate réductase ont été faites par EVANS et NASON (1953), qui utilisaient une chromatographie d'adsorption sur gel de phosphate de calcium, suivie de précipitations par le sulfate d'ammonium. Cette méthode ancienne

de purification ne permet d'obtenir que des préparations enzymatiques faiblement purifiées et des rendements peu élevés. Elle a été reprise par BEEVERS et Col., en 1964, qui y ont ajouté une chromatographie sur DEAE-cellulose, par ce procédé ils retrouvent leur activité enzymatique en une seule fraction, mais l'activité spécifique n'est pas augmentée.

L'apparition de nouvelles méthodes telles, la gel filtration, les chromatographies sur gel d'hydroxylapatite ou DEAE-cellulose a permis une purification partielle de l'enzyme, mais avec de faibles rendements dus à la nature labile de l'enzyme (JOLLY et Col., 1976).

Cependant, GARRETT et NASON (1969) en combinant ces différentes techniques ; des précipitations par l'acide citrique et le sulfate d'ammonium, puis une DEAE-cellulose, hydroxylapatite et une gel-filtration sur Sephadex G200, réussissent à purifier 500 fois l'enzyme de *Neurospora crassa*. DOWNEY (1971) et SCHLOEMER et Col. (1973) utilisent à peu près les mêmes procédés de purification pour obtenir des enzymes purifiées 200 ou 300 fois environ.

AMY et GARRETT (1974) commencent la purification par une précipitation des acides nucléiques par le polyéthylène glycol.

Chez les plantes supérieures les rendements sont encore plus faibles : ROUSTAN et Col. (1974), chez le Maïs, ne purifient que 75 fois l'enzyme par un long procédé de purification mais le rendement est quand même de 60 %.

Ce n'est seulement que chez *Clostridium perfringens* (SEKI-CHIBA et Col., 1977) et *Plectonema boryanum* (IDA et Col., 1983) que l'on est arrivé à des résultats satisfaisants avec des enzymes purifiées 1 200 fois pour *C. perfringens* et 7 727 fois pour *P. boryanum*.

L'étude des caractéristiques de la nitrate réductase a donc été retardée par les difficultés d'obtenir l'enzyme homogène. La nitrate réductase a été purifiée pour la première fois il y a

30 ans mais aucun schéma de purification donnant de bons rendements et des taux de purification élevés n'a été publié. L'absence d'une méthode rapide de purification résulte en une perte d'activité.

La chromatographie d'affinité semble être un moyen efficace et rapide et qui peut aussi servir à concentrer l'extrait (CAMPBELL, 1978).

b) La chromatographie d'affinité

SOLOMONSON (1975) utilise comme milieu d'affinité pour la purification de la nitrate réductase de *Chlorelle*, le bleu dextran sépharose qui avait été utilisé auparavant pour purifier la phosphofructokinase, la lactate déshydrogénase et la malate déshydrogénase. En une seule étape, il purifie 930 fois l'enzyme de *Chlorelle* avec un rendement d'activité de 60 %. La nitrate réductase de *Chlorelle vulgaris* est retenue par le bleu dextran agarose même après lavage de la colonne par du tampon phosphate 0,4 M, mais elle est éluée par des concentrations micromolaires de NADH. Cette méthode a l'avantage d'être simple, rapide, efficace et économique. La nitrate réductase a une très grande affinité pour le bleu dextran et l'éluion spécifique de l'enzyme par le NADH, se fait à des concentrations très faibles ; 5 μ M de NADH pour l'enzyme de Blé (SHERRARD et DALLING, 1979).

Les nitrate réductases d'autres organismes ont aussi été purifiées par cette méthode (CAMPBELL, 1978 ; NOTTON et Col., 1977 ; DE LA ROSA et Col., 1980 ; SOMERS et Col., 1982 ; REDINBAUGH et Col., 1983 ; FIDO et Col. 1984 ; OJI et Col., 1985). Cependant, selon son origine l'enzyme se comporte différemment durant la chromatographie.

Pour CAMPBELL (1978), la purification par chromatographie d'affinité ne semble pas suffisante et elle est souvent utilisée en combinaison avec d'autres techniques plus conventionnelles.

Chez l'Epinard, la nitrate réductase ne se lie que partiellement au bleu et 20 % de l'enzyme est élué avec du tampon phosphate 0,4 M, alors qu'aucune activité n'est retrouvée lorsqu'on élue avec un gradient de NADH ; l'activité nitrate réductase se retrouve lorsqu'on élue avec un gradient en KCl de 0 à 3 M (FIDO et Col., 1984).

Chez *Ankistrodesmus sp* (DE LA ROSA et Col., 1980), la nitrate réductase est très sensible à l'élution par des tampons de force ionique élevée, et elle est seulement retenue partiellement si la concentration du tampon utilisé est supérieure à 0,05 M. D'autre part l'élution spécifique par le NADH requiert la présence de FAD. Il semblerait qu'il en soit de même pour l'Epinard (FIDO et Col., 1984). Pour OJI et Col. (1985) la chromatographie d'affinité est l'étape la plus efficace d'un long procédé de purification comprenant : chromatographies sur hydroxylapatite et phényl sépharose, gel filtration puis HPLC comme dernière étape. Le bleu sépharose permet de multiplier par 500 l'activité spécifique.

Il existe d'autres chromatographies d'affinité, mais qui semblent être moins employées; en 1975, PORATH et Col., développent une nouvelle technique de purification qu'ils ont nommée chromatographie d'affinité par métal chélateur et qui consiste à attacher la moitié de la molécule d'EDTA sur une Sépharose qui est liée à un métal tel que le Zn^{++} ou le Cu^{++} . L'élution se fait par changement de force ionique ou de pH. REDINBAUGH et Col (1983) utilisent cette méthode et montrent que l'enzyme de *Cucurbita maxima* peut se lier à une colonne Zn^{++} et être éluée par du tampon à pH légèrement acide (pH 6,2).

PAN et NASON (1978) pour *Neurospora crassa* utilisent en fin de purification, une chromatographie d'affinité pour le FAD. Pour cette étape, il faut préalablement séparer le FAD de l'enzyme par focalisation isoélectrique et précipitation par le sulfate d'ammonium. La préparation obtenue est ensuite déposée sur une

colonne de FAD Sépharose puis éluée avec un tampon renfermant du FAD, mais le FAD n'est pas lié très fortement à l'enzyme chez les Champignons alors que la liaison FAD-enzyme semble beaucoup plus forte chez les végétaux supérieurs.

La chromatographie d'affinité sur 5' AMP Sépharose a été utilisée par FIDO et NOTTON (1984), l'enzyme est éluée avec un gradient de NADH. Utilisée comme dernière étape de purification, l'enzyme d'Epinard obtenue est purifiée 3 431 fois.

MATERIEL ET METHODES

A. - Origine de la suspension cellulaire de *Daucus carota*

1 - Préparation du matériel végétal

La suspension cellulaire est préparée à partir de fragments de hampes florales qui sont prélevées sur des plantes en début de floraison pour limiter au maximum les risques de pollution. Elles sont d'abord désinfectées par une solution de mercryl laurylé à 10 % pendant trois min., puis par une solution d'hypochlorite de calcium à 70 g/l pendant 10 min.

Des fragments d'environ 15-20 mm sont alors découpés et cultivés sur des milieux contenant les éléments minéraux et organiques de la solution de MURASHIGE et SKOOG (1962) renfermant 100 mg/l d'inositol et 6 g/l de gélose (biokar).

La formation de cals exige la présence de substances de type auxinique. Nous avons donc introduit dans le milieu soit de l'ANA à 1 mg/l, soit du 2,4-D à 0,5 mg/l et 1 mg/l.

Seul le 2,4-D à 1 mg/l permet une callogenèse importante. Les colonies tissulaires isolées à partir de ces cals néoformés, ont donc été cultivées sur le même milieu renfermant 1 mg/l de 2,4-D.

A partir de ces colonies tissulaires, nous avons isolé des suspensions cellulaires cultivées dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 200 ml de milieu de culture.

2 - Composition du milieu de culture

Le milieu de base de la suspension cellulaire de *Daucus carota* est constitué par la solution de MURASHIGE et SKOOG (1962) légèrement modifiée, sa composition exacte est donnée dans le tableau n° 1.

Tableau 1 : Composition du milieu de culture nécessaire
à la croissance de la suspension cellulaire
de *Daucus carota*.

Macroéléments minéraux	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	mg/l 440
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microéléments minéraux	
Fe-EDTA Merck	9,72
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ , H ₂ O	16,9
Vitamines	
Pyridoxine	0,5
Acide nicotinique	0,5
Vitamine B ₁	0,1
Glycocolle	2
Inositol	100
Hydrolysate de caséine	100
Saccharose	20 000
Substances de croissance	
2,4-D	0,25



3 - Conditions de culture

Les fioles d'Erlenmeyer sont placées sur des agitateurs rotatifs tournant à la vitesse de 70 rpm et dont l'inclinaison est de 45°.

Environ tous les 14 jours, 20 ml de la suspension cellulaire sont transférés dans des milieux neufs qui ont été autoclavés à 120° C pendant 20 min.

Les cellules sont alors entreposées dans une pièce dont la température est maintenue à 22° C ± 1° C. Les fioles d'Erlenmeyer reçoivent une intensité d'éclairement de 500 lux émise 12 heures par jour par des tubes fluorescents (De luxe Cool White). Pour obtenir des embryons somatiques, les cellules sont cultivées sur des milieux identiques à ceux des cultures initiales si ce n'est que le 2,4-D a été enlevé : après 14 jours de culture on observe déjà de nombreux embryoides aux stades globulaires ou cordiformes.

Mais c'est au cours du deuxième passage sur ce milieu que les embryons deviennent chlorophylliens et sont bien différenciés en racine, hypocotyle et cotylédons. Au troisième passage, ne restent que des embryons qui atteignent une taille de l'ordre du centimètre.

Pour effectuer des mesures, les cellules ou les embryons sont récupérés par filtration sous vide sur deux épaisseurs de papier filtre, à l'aide d'un entonnoir de Büchner.

On peut procéder à une filtration sélective sur des filtres en inox, de vide de maille de taille croissante (125, 200, 500 et 1 000 µm).

B. - Mesure des différentes activités enzymatiques

1 - Activité NAD(P)H:nitrate réductase mesurée "in vivo"

Des cellules de Carotte cultivées quatre, cinq ou six jours sont filtrées sous vide. La mesure de l'activité enzymatique "in vivo" consiste à doser le nitrite formé pendant l'incubation de

80 mg de cellules maintenues en conditions anaérobies (FERRARI et VARNER, 1971 ; JAWORSKI, 1971). Les 80 mg de cellules sont placés dans 2 ml de tampon contenant :

- 5 volumes de KNO_3 0,1 M
- 3 volumes de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M, (pH 7,5)
- 0,1 volume de n-propanol.

Le mélange cellules-tampon d'incubation est ensuite soumis à un faible courant d'azote pendant 45 sec. Puis le tube bouché est placé dans un bain-marie thermostaté à 28° C et maintenu à l'obscurité.

Après 15 min. d'incubation, la réaction enzymatique est stoppée par l'addition des deux réactifs colorés du nitrite :

- 1 ml de sulfanilamide (à 2 g/l d'HCl 3 N)
- 1 ml de N-1-naphtyl éthylène diamine dichloride (à 2,64 g/l d' H_2O).

Après décantation des cellules ou filtraton sur "miracloth" le surnageant est prélevé pour la lecture de la densité optique au colorimètre (320 RD Constant) à 540 nm.

L'activité enzymatique est exprimée en μmoles de NO_2^- formé par heure et par g. de matière fraîche ($\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$)

2 - Activité NAD(P)H:nitrate réductase mesurée "in vitro"

a) Méthode d'extraction

La mesure des activités enzymatiques "in vitro" nécessite la préparation d'un extrait effectué à partir de cellules non congelées. Les cellules (à raison de 1 g pour 3 ml) sont mises en suspension dans du tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 0,05 M, (pH 7,5) renferment :

- de la flavine adenine dinucléotide (FAD) 1 μM
 - de la leupeptine 1 μM
 - de l'acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA) 2 mM,
- puis elles sont broyées à l'aide d'un broyeur Ultraturax

pendant 1 min., 30 sec. et 30 sec. Le broyat est ensuite centrifugé pendant 20 min. à 12 500 rpm . Le surnageant recueilli constitue l'extrait brut.

b) Mesure des activités NADH:et NADPH : NR

100 µl de l'extrait brut obtenu sont placés dans un milieu d'incubation formé par :

- 1 ml de tampon phosphate 0,1 M (pH 7,5)
- 100 µl de KNO₃ 0,1 M
- 50 µl de NADH 5,2 mM

Après 15 min. d'incubation dans un bain-marie thermostaté à 28° C et maintenu à l'obscurité, la réaction enzymatique est stoppée par les réactifs des nitrites (sulfanilamide et N-1 -naphtyl éthylène diamine).

Le NADH peut interférer avec la lecture du nitrite, aussi, 100 µl d'ADH (alcool déshydrogénase) et 100 µl d'acétaldéhyde (5,6 ml/100 ml H₂O) sont ajoutés 1 min. avant les réactifs des nitrites. L'alcool déshydrogénase (ADH) catalyse la réaction :

Acétaldéhyde + NADH \longrightarrow alcool + NAD, réaction très rapide qui utilise le NADH restant.

La mesure de l'activité NADPH nitrate réductase s'effectue de la même façon, le NADH est remplacé par du NADPH (à 3 mg/l). L'ADH et l'acétaldéhyde ne sont pas utiles.

3 - Mesure des activités GDH (L-glutamate : NAD⁺ oxydo-reductase, EC .1.4.1.2.) et GS (L-glutamate : ammonia ligase (ADP) EC 6.3.1.2.)

Les cellules (à raison de 10 ml pour 1 g de Matière fraîche) sont extraites dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH8) de la même manière que pour l'activité nitrate réductase. Du β-mercaptoéthanol et du MgCl₂ peuvent être ajoutés au tampon d'extraction.

L'activité de la GDH est exprimée en μmol de NAD formé par min. et par g. de matière fraîche. A 2 ml de tampon d'incubation Tris-HCl 50 mM (pH8) contenant de l' α -céto glutarate 20 mM, NADH 0,37 mM et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 150 mM (GASPARIKOVA et Col., 1976) est ajouté 1 ml d'extrait. L'oxydation du NADH est suivie à 340 nm pendant 2 min. Le témoin est constitué par le même mélange sans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En ce qui concerne la GS, c'est l'activité synthétase qui est mesurée (O'NEAL et JOY, 1973). Un ml d'extrait enzymatique est ajouté à 2 ml d'un mélange constitué par du tampon d'incubation Tris-HCl 50 mM (pH 7,6) contenant du glutamate 120 mM, MgSO_4 30 mM, EDTA 1,5 mM, NH_2OH 9 mM et adénosine triphosphate (ATP) 12 mM. L'incubation s'effectue à 30° C pendant 15 min., puis la réaction est arrêtée par l'addition de 3 ml d'une solution de FeCl_3 370 mM, acide trichloracétique (TCA) 200 mM et HCl 0,67 N qui provoque également la coloration de l'hydroxamate formé. La teneur en hydroxamate est mesurée à 540 nm et calculée par rapport à une gamme étalon de γ -glutamyl hydroxamate (GHA) comprise entre 0 et 3 μmol . L'activité GS est donc exprimée en μmol d'hydroxamate formé par min. par g. de matière fraîche.

C. - Purification des enzymes

Différentes méthodes de purification ont été essayées, avant chaque chromatographie, l'extrait peut être précipité par le sulfate d' NH_4^+ (à 50 % de saturation) puis dessalé sur une colonne GF05 Trisacryl ou Séphadex G25.

1 - DEAE-cellulose

L'extrait est déposé sur une colonne (10 x 200 mm) de DEAE-cellulose préalablement équilibrée par du tampon phosphate 50 mM contenant FAD 1 μM , leupeptine 1 μM et EDTA 1mM (pH 7,5) pour la nitrate réductase ou du tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7,6) contenant du MgCl_2 1mM pour la GS. Après rinçage de la colonne, les protéines sont éluées par un gradient discontinu de NaCl de 0 à 1 M.

2 - Hydroxylapatite (ultrogel)

On procède exactement de la même façon que pour la chromatographie sur DEAE-cellulose mais l'éluion de l'enzyme s'effectue avec un gradient discontinu de molarité du tampon phosphate de 0,05 M à 0,3 M.

3 - Bleu Séphadex

Environ 10 ml d'extrait brut sont mélangés avec 5-10 ml de Bleu Séphadex préparé selon la méthode de BÖHME et Col. (1972). Le mélange est maintenu en agitation pendant une heure environ puis filtré sous vide. Le bleu récupéré par filtration est introduit dans une colonne de 2 cm de diamètre, que l'on lave abondamment avec du tampon phosphate 50 mM (pH 7,5). Une fraction de l'enzyme est éluée par du tampon phosphate 50 mM (pH 7,5) contenant du FAD 1 μ M de la leupeptine 1 mM, de l'EDTA 1 mM et du NADH 200 mM. D'autres fractions enzymatiques peuvent être éluées par du tampon phosphate contenant du NADPH 200 mM ou du KCl 1 M.

4 - 5'AMP Séphadex

Le support est formé par dissolution de 500 mg de 5'AMP-Sépha-rose 4B (Pharmacia) dans 3 ml de tampon phosphate 50 mM (pH 7,5). L'AMP sépharose est introduit dans une colonne de 2,5 cm de diamètre et est équilibrée avec du tampon phosphate. On peut alors déposer un extrait à la surface du gel et laver abondamment la colonne avec le même tampon. L'enzyme est éluée de la colonne par du tampon phosphate 50 mM (pH 7,5) renfermant: EDTA 1 mM, FAD 1 μ M, leupeptine 1 μ M et du NADH 200 mM.

5 - Dosage des protéines

Les protéines sont dosées à l'aide de la solution commerciale de BIORAD qui est basée sur la méthode de BRADFORD (1976).

D. - Analyses en électrophorèse sur gel de polyacrylamide

On peut analyser les fractions enzymatiques brutes ou purifiées en électrophorèse, selon la méthode de DAVIS (1964) légèrement modifiée.

Préparation des gels :

- gel de séparation

- 1 volume de solution A (36,6 g Tris pour 100 ml H₂O amené à pH 8,9)

- 2 volumes acrylamide (acrylamide 28 % bisacrylamide 0,735 % dans H₂O)
- 5 volumes H₂O

L'addition de 75 µl de persulfate d'ammonium à 10 % et de 50 µl de tétra.méthylène.diamine (TEMED) provoque la polymérisation du gel.

- gel de concentration

- 1 volume de solution B (5,98 g de Tris dans 100 ml H₂O amené à pH 6,7)
- 2 volumes d'acrylamide (acrylamide 10 %, bisacrylamide 2,5 %, dans H₂O)
- 1 volume H₂O
- 1 volume de saccharose à 40 %.

Le gel est polymérisé avec 75 µl de persulfate d'ammonium et 50 µl de TEMED.

Le gel de séparation est d'abord coulé entre deux plaques sur une hauteur de 1 cm et après polymérisation le reste du gel de séparation est ajouté. Lorsque tout le gel est polymérisé, le gel de concentration est versé. On glisse le peigne qui délimitera les alvéoles dans lesquelles sont déposés les échantillons. Quand le gel est polymérisé, on enlève le peigne. On place les plaques dans la cuve à électrophorèse. La migration se fait dans un tampon Tris 5mM -glycine 40 mM (pH 8,3) sous 200 V pendant 120 à 150 min. puis sous 60 V pendant 1 nuit.

Après électrophorèse les protéines sont révélées par le Bleu de Coomassie (20 mg de Bleu, 2,5 ml d'acide perchlorique, qsp 50 ml H₂O). Après trempage dans le bleu pendant une heure, le gel est décoloré par l'acide acétique à 10 %.

L'activité GDH est mise en évidence en immergeant les gels pendant des durées de 5 à 30 min. à 30° C, à l'obscurité dans du tampon Tris-HCl (pH8) contenant du glutamate 30 mM, NAD 0,4 mM, nitrobleu de tétrazolium 1 mM et méthosulphate de phénazine 0,4 mM.

RESULTATS

A. - Méthodologie

La mesure de l'activité nitrate réductase a été effectuée par la méthode "in vitro" et par celle dite "in vivo". Il s'est avéré au cours de nos recherches que seule la mesure "in vivo" est applicable aux embryons somatiques, alors que pour les cellules, les deux méthodes sont possibles.

1 - Mesure de l'activité nitrate réductase "in vivo"

a) Action du propanol et du KNO₃ sur l'activité

Pour la mesure de l'activité nitrate réductase "in vivo" les cellules sont incubées 15 min. dans un tampon constitué de 5 volumes de KNO₃ 0,1 M, 3 volumes de Tampon phosphate KH₂ PO₄ /K₂HPO₄ 0,1 M (pH 7,5) et 0,1 volume de propanol. Le KNO₃ est le substrat de l'activité nitrate réductase et le propanol qui modifie la perméabilité membranaire favorise les échanges ioniques entre les différents compartiments cellulaires et du milieu vers les cellules ou les embryons.

Nous avons donc fait varier le KNO₃ et le propanol du tampon d'incubation pour des cellules et des embryons somatiques âgés de 6 jours. Les résultats sont reportés dans le tableau n° 2.

Tableau 2 : Activité nitrate réductase de cellules ou d'embryons de Carotte incubés en présence de doses variables de propanol et KNO₃.

	Tampon 3 V. propanol 0,1 V. KNO ₃ 5 V.	Tampon 3 V. propanol 0,05 V. KNO ₃ 5 V.	Tampon 3 V. KNO ₃ 5 V.	Tampon 3 V. propanol 0,1 V	Tampon seul
Cellules *	100 %	81 %	61 %	43 %	20 %
Embryons * somatiques	100 %	45 %	19 %	57 %	9 %

* Cellules prélevées après 6 jours de culture

* Embryons somatiques prélevés après 6 jours de culture dans une suspension qui a déjà subi 2 cycles sans auxine.

V. = Volume

Le maximum du pic d'activité enzymatique se situant entre le 4ème et le 6ème jour, les mesures sont donc effectuées après six jours de culture. 100 % d'activité représente chez les cellules $1,8 \mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$ et chez les embryons $2,25 \mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$.

En absence de propanol dans le milieu d'incubation, les embryons sont pratiquement incapables de réduire le nitrate exogène (19 % de l'activité témoin) alors que les cellules conservent 61 % d'activité.

La diminution de moitié du propanol entraîne une forte baisse de l'activité nitrate réductase des embryons somatiques (55 %) mais une diminution nettement moindre de l'activité nitrate réductase des cellules (19 %).

Le propanol modifie donc plus l'activité nitrate réductase des embryons que celle des cellules.

Des mesures ont également été effectuées en absence de propanol et de nitrate exogène. Ce sont donc de véritables mesures "in situ". Les valeurs sont toujours plus élevées chez les cellules que chez les embryons. On peut donc se demander si les cellules (20 % d'activité enzymatique) contiennent plus de nitrate endogène que les embryons (9 % d'activité de réduction).

Or l'addition de propanol seul montre que l'activité est plus importante (57 %) chez les embryons que chez les cellules (43 %).

Les différences observées pourraient donc correspondre à l'existence de structures différenciées chez les embryons et à un éloignement géographique plus important des pools de stockage et de réduction. Cela signifie que du nitrate pourrait être stocké dans des cellules qui ne possèdent pas de nitrate réductase et qui sont différentes de celles qui réduisent le nitrate.

b) Recherche du pH optimal de l'activité enzymatique mesurée "in vivo"

Les cellules sont mises en suspension dans le milieu d'incubation habituel mais dont le pH varie de 6,5 à 8,5 (cf. tableau n° 3).

Tableau 3 : Variations de l'activité nitrate réductase mesurée "in vivo" en fonction du pH du milieu d'incubation.

pH	8,5	8	7,5	7	6,5
activité NR	0,95	1,05	1,02	0,91	0,90

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

Bien qu'un optimum soit détectable à pH 8 l'activité nitrate réductase n'est guère modifiée par le pH du milieu d'incubation.

La cellule est un milieu tamponné dont la composition interne n'est peut-être pas modifiée par l'amplitude de la variation de pH du milieu externe, mais la perméabilité du nitrate est peut-être modifiée.

2 - Mesure de l'activité nitrate réductase "in vitro"

a) Conditions d'extraction de la nitrate réductase

Afin de pouvoir effectuer des mesures dans des conditions standardisées, le matériel végétal congelé par de l'azote liquide est souvent stocké dans un congélateur. Mais la congélation des cellules de Carotte se traduit très souvent par une perte de l'activité nitrate réductase (cf. tableau n° 4, p. 42).

Tableau 4 : Action de la congélation sur l'activité enzymatique des cellules de *Daucus carota*.

	Cellules congelées à l'azote liquide puis à - 20° C pendant plusieurs jours	Cellules fraîches congelées à l'azote liquide avant broyage.	Cellules fraîches broyées immédiatement après prélèvement.
Activité NR en %	26 %	62 %	100 %

Les cellules sont prélevées après 5 jours de culture 100 % d'activité enzymatique représente 1,78 μ moles $NO_2^- \cdot h^{-1} \cdot g \text{ MF}^{-1}$.

Il nous a donc toujours fallu travailler avec du matériel frais, broyé immédiatement après le prélèvement et la filtration des cellules.

Celles-ci sont donc mises en suspension dans un tampon d'extraction dont la composition peut varier. L'extraction de la nitrate réductase avec un simple tampon phosphate ne permet pas de mesurer l'activité nitrate réductase. Il nous a donc fallu ajouter des protecteurs ou stabilisateurs de l'enzyme. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau n°5.

Tableau 5 : Action de diverses substances protectrices sur l'activité nitrate réductase mesurée "in vitro".

Composition du tampon d'extraction	% d'activité NR
tampon phosphate seul	0
" + EDTA 1 mM	9
" + EDTA 1 mM + Leupeptine 1 μ M	38
" + " + " + FAD 1 μ M	97
" + EDTA 2 mM + " + "	100
" + EDTA 3 mM + " + "	98
" + EDTA 2 mM + Leupeptine 1 μ M + FAD 1 μ M + PVP 5 %	35
" + " + " + " + dithiothréitol 5 mM	0
" + " + " + " + Triton X100 0,1 %	102
" + " + " + " + Cystéine 1 mM, 5 mM, 10 mM	100
" + " + " + " + Caséine 5 mM	100

Lorsque l'on extrait la nitrate réductase dans un tampon phosphate seul, l'activité est nulle. L'addition d'EDTA, provoque l'apparition de l'activité nitrate réductase mais celle-ci reste très faible. La leupeptine, qui agit par l'inhibition de protéases, augmente aussi l'activité enzymatique, mais c'est surtout le FAD qui, associé à l'EDTA et la leupeptine, permet de mesurer une activité enzymatique plus élevée.

Si l'on ajoute au tampon d'extraction des protecteurs de ponts dissulfures, on n'observe, avec la cystéine, aucun changement dans la mesure de l'activité nitrate réductase, mais avec du dithiothréitol, l'activité est complètement inhibée.

L'emploi de protecteurs anti-oxydants, n'améliore pas les résultats ; la caséine qui peut aussi servir de substrat à d'éventuelles protéases n'a pas de rôle dans l'extraction de la nitrate réductase, et le PVP, un anti-oxydant des phénols qui ne se transforment donc pas en quinones, inhibe l'activité enzymatique de 65 %.

Le Triton X100, ne modifie pas significativement l'activité enzymatique, il agit surtout sur la dissolution des protéines dans les extraits qui deviennent plus clairs et donc il permet une lecture plus juste de la DO, il n'est cependant pas pratique à utiliser.

Pour la suite de nos travaux, nous avons donc retenu le tampon dont la composition est la suivante :
tampon phosphate 0,1 M (pH 7,5), EDTA 2mM, FAD 1 μ M et leupeptine 1 μ M.

Pour la suite du processus d'extraction nous avons déterminé quelle masse de cellules, pour un rapport constant (masse de cellules/volume de tampon), permet la meilleure extraction de l'enzyme (cf. tableau n° 6, p. 44).

Tableau 7 : Comparaison des activités NAD(P)H : NR des extraits d'Epinaud, de Carotte et d'un mélange des deux.

	Extrait Epinaud *	Extrait Carotte	Extrait Epinaud + * Carotte
Activité NADH : NR DO	0,202	0,181	0,395
Activité NADPH : NR DO	0	0,116	0,123

* L'enzyme d'Epinaud a été dilué au 1/50e.



Tableau 6 : Variations de l'activité nitrate réductase mesurée "in vivo" en fonction de la quantité de cellules broyées et du temps de broyage.

Poids de cellules	1 g	3 g	3 g	9 g	9 g
Temps de broyage	2 min.	2 min.	1 min. 30'	1 min.	2 min.
DO	0,297	0,282	0,244	0,289	0,162

La durée du broyage ne semble pas importante du moment que l'on veille à éviter un réchauffement du mélange, par des temps de pause. Il n'est par ailleurs pas indiqué de broyer des masses importantes de cellules, sans doute, parce que la circulation de la suspension entre les lames de l'Ultraturax se fait mal et que l'enzyme n'est donc pas libérée dans le milieu. Il vaut donc mieux broyer des quantités de l'ordre de 2 à 3 g à la fois.

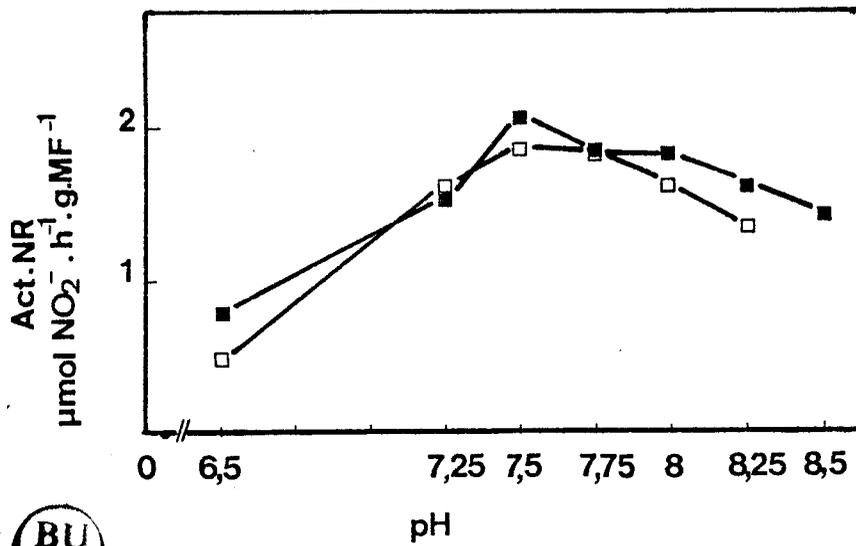
b) Mesure des activités enzymatiques

Nous avons vu dans l'historique que chez les végétaux, la nitrate réductase est active en présence de donneurs d'électrons dont la nature peut varier.

La Carotte sauvage présente deux types d'activité qui peuvent être mises en évidence séparément : la NADH : NR et la NADPH : NR, celle-ci a souvent été décrite comme un artéfact de la NADH : NR, dû à l'action de phosphatases qui transforment NADPH en NADH.

Nous avons vérifié à l'aide d'un extrait brut d'Epinard, si cette activité NADPH : NR chez la Carotte est vraie (cf. tableau n° 7).

Figure 1 : Activités NADH : NR (■—■)
et NADPH : NR (□—□) en
fonction du pH ("in vitro")



La nitrate réductase de l'Épinard n'est active qu'en présence de NADH. Dans ces conditions, si l'extrait des cellules de *Daucus carota* contient une phosphatase qui transforme le NADPH en NADH, on devrait observer un accroissement considérable de l'activité NADPH : nitrate réductase lorsque les deux enzymes sont mélangées. L'activité enzymatique des deux extraits mélangés est égale à la somme des activités NADH : NR des deux activités séparées. En présence d'extrait de Carotte, l'activité NADH:NR de l'extrait d'Épinard n'a donc pas augmenté. La nitrate réductase de Carotte est donc bispécifique.

c) pH et stabilité mesurés "in vitro"

Nous avons recherché à quel pH la nitrate réductase est la plus active en présence de NADH ou de NADPH comme donneurs d'électrons. Pour cela, les cellules sont broyées et mises à incuber dans des tampons dont seul le pH varie.

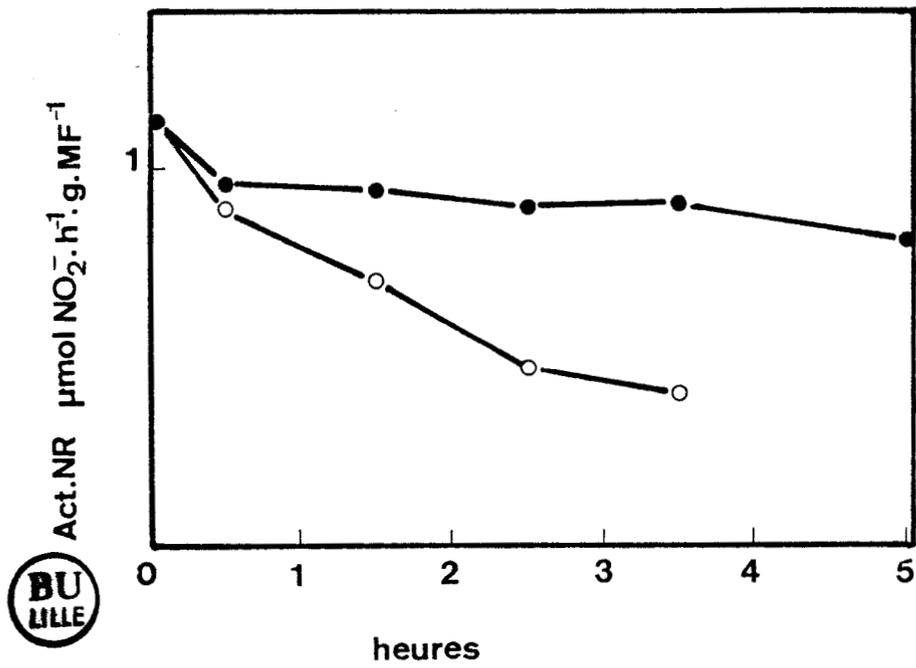
Les résultats sont reportés figure n° 1.

Pour l'activité NADH : NR, le maximum se situe à pH 7,5, pour l'activité NADPH : NR il est à pH 7,75 ; mais la variation du pH de 7,5 à 7,75 est très faible. On peut considérer que les deux activités NADH : et NADPH : NR ont des pH optimums voisins.

L'activité nitrate réductase mesurée "in vitro" est plus sensible aux variations de pH que celle mesurée "in vivo". Dans ce dernier cas, l'enzyme reste dans la cellule qui régule son pH. Pour la mesure "in vitro", la nitrate réductase est extraite et devient donc plus dépendante de la composition du milieu d'incubation.

Pour des raisons de commodité toutes nos mesures qui suivent, aussi bien pour l'activité NADH : NR que pour l'activité NADPH : NR, sont effectuées à pH 7,5.

Figure 2 : Etude de la stabilité de la nitrate réductase mesurée "in vitro" L'extrait est conservé à 4° C (●-●) ou à 22° C (○-○).



La stabilité de la nitrate réductase a été étudiée avec un extrait de cellules conservé à 4° C et un autre extrait des mêmes cellules conservé à 22° C.

Le tampon d'extraction est celui qui a été décrit plus haut et qui contient de l'EDTA 2 mM et du FAD 1 μ M qui favorisent la stabilité de l'enzyme.

. Les résultats sont reportés figure n° 2.

La température de 4° C permet à l'extrait de bien se conserver pendant 5 heures, alors qu'à 22° C l'activité de réduction chute rapidement.

B. - Caractéristiques cinétiques de la nitrate réductase des cellules.

1 - Détermination des K_m NO_3 , K_m NADH et K_m NADPH de la nitrate réductase de *Daucus carota*

Afin de déterminer l'affinité de la nitrate réductase pour son substrat et ses donneurs d'électrons, le NADH et le NADPH, on détermine ses paramètres cinétiques, les K_m NO_3 , K_m NADH et K_m NADPH.

On utilise des extraits de cellules issues d'une culture de 4, 5 ou 6 jours et partiellement purifiés par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose, suivie d'une précipitation par le sulfate d'ammonium (à 50 % de saturation) qui permet la conservation de l'extrait purifié pendant 12 à 24 heures à 4° C.

a) Calcul des K_m pour le nitrate

Les représentations des vitesses de réaction selon MICHAELIS et MENTEN sont données dans les figures n° 3 et 5. (p. 51-52).

L'activité nitrate réductase est mesurée par rapport à une gamme de concentrations en KNO_3 soit avec du NADH (figure n° 3, p. 51), soit avec du NADPH (figure n° 5, p. 52) comme donneurs d'électrons.

La détermination des K_m s'effectue selon les représentations de LINEWEAVER et BURK (figures n° 4 et 6 , p. 51-52).

Avec NADH comme donneur d'électrons, le K_m NO_3 sur la figure n° 4 (p. 51) est donné par la droite formée par les inverses. Le K_m est l'inverse du point qui coupe l'axe des abscisses.

On obtient donc $1/K_m = 3,85 \text{ mM}^{-1}$ soit $K_m = 2,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

b - Calcul du K_m pour le NADH

On procède toujours de la même manière que pour la détermination des K_m du nitrate, dont la concentration sera fixée à 80 mM. Les mesures sont effectuées avec les mêmes volumes de milieu d'incubation et d'enzyme, seule change la teneur en NADH (cf. figure n° 7 , p. 53).

On peut donc déterminer une valeur de K_m selon la représentation de LINEWEAVER et BURK (cf. figure n° 8 , p. 53). Dans le cas du NADH, la courbe de vitesse de réaction (figure n° 7 , p. 53) présente un point d'inflexion et une allure sigmoïdale. Le K_m se détermine donc par le tracé d'une tangente à la courbe des inverses (figure n° 8, p. 53). Le K_m est le point sur la tangente qui traverse l'axe des abscisses.

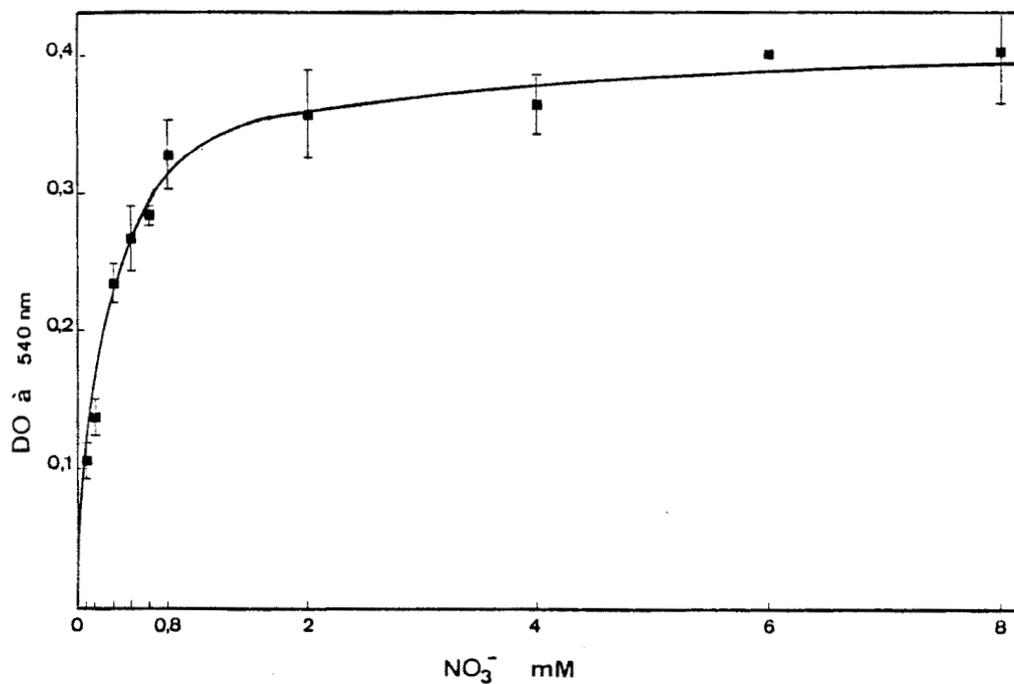
On peut donc déterminer sur la figure n° 8 (p. 53) :
 $1/K_m = 0,06 \text{ mM}^{-1}$ soit $K_m = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$.

c) Calcul du K_m pour le NADPH

Dans le cas du NADPH, la représentation de la vitesse de réaction est également sigmoïdale (cf. figure n° 9, p. 54), le K_m est donc aussi déterminé par la tangente à la courbe des inverses (cf. figure n° 10 , p. 54).

$1/K_m = -0,026 \text{ mM}^{-1}$ soit $K_m = 3,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Figure 3 : Courbe d'activité nitrate réductase "in vitro" en fonction de la concentration en nitrate, avec NADH comme donneur d'électrons.



L'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n = 4).

Figure 4 : Calcul du Km NO₃ de la nitrate réductase de Carotte cultivée en suspension cellulaire d'après la représentation de LINEWEAVER et BURK, avec NADH comme donneur d'électrons.

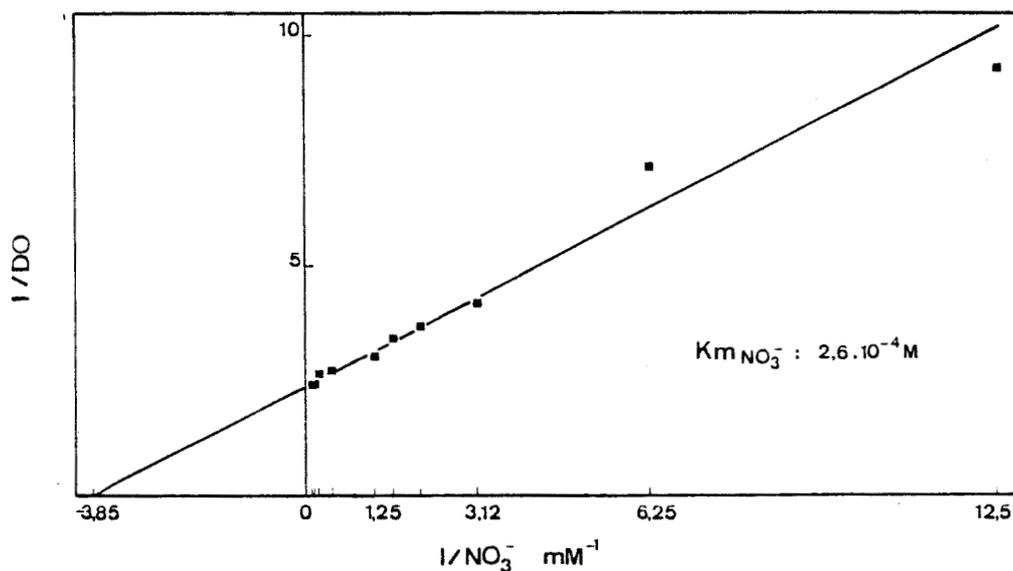
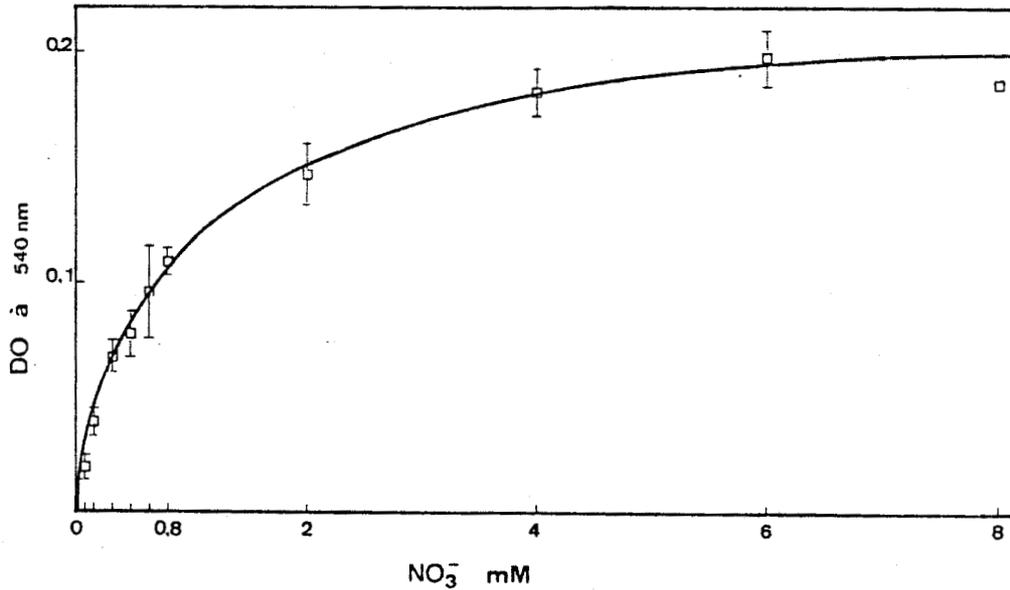


Figure 5 : Courbe d'activité nitrate réductase "in vitro" en fonction de la concentration en substrat : le KNO_3 , avec NADPH comme donneur d'électrons.



L'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % ($n = 4$).

Figure 6 : Calcul du $K_m \text{NO}_3$ de la nitrate réductase de Carotte cultivée en suspension cellulaire d'après la représentation de LINEWEAVER et BURK, avec NADPH comme donneur d'électrons.

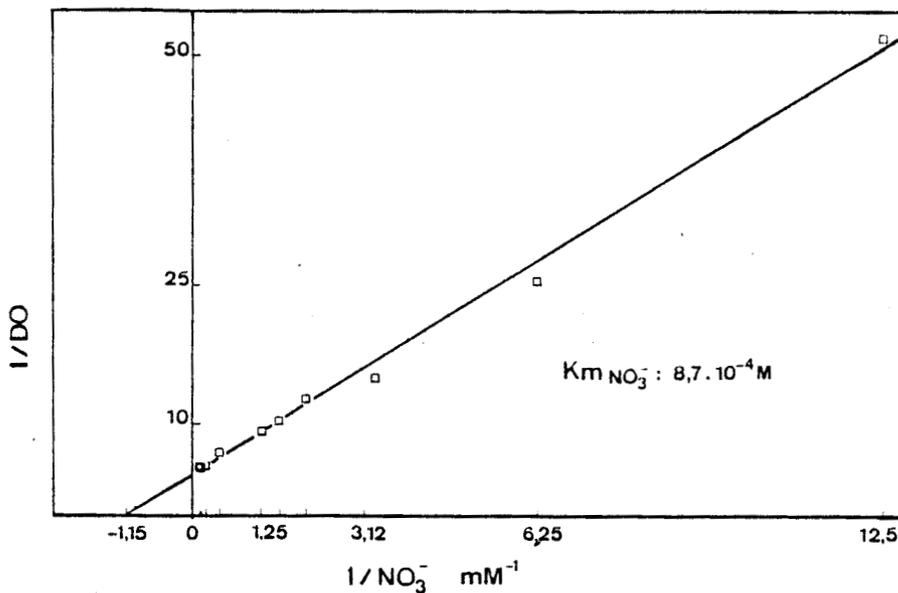
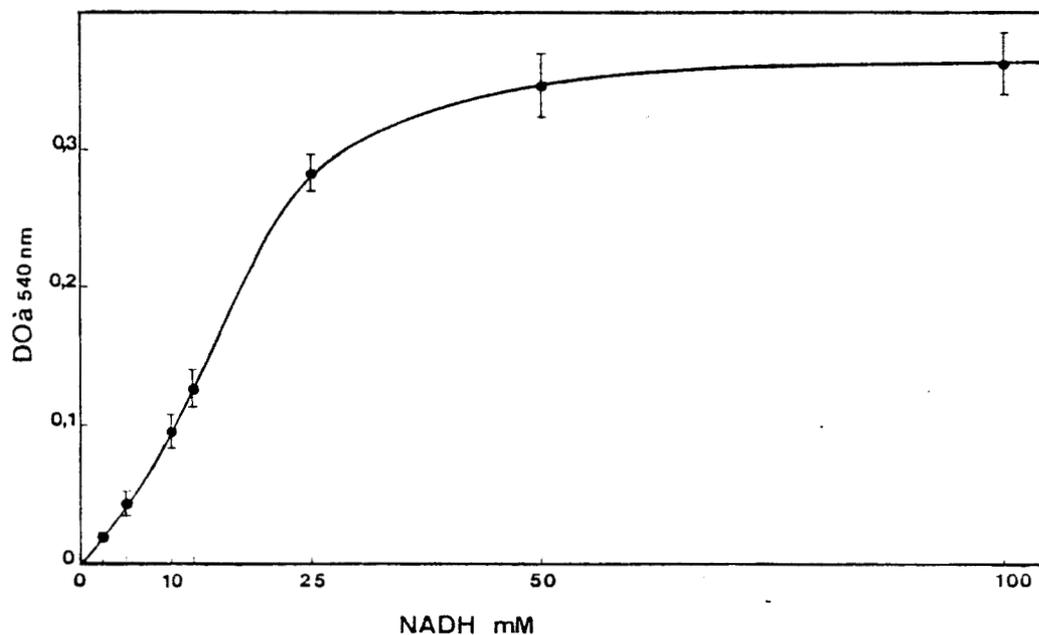


Figure 7 : Mesure de l'activité nitrate réductase "in vitro" en fonction de la concentration en NADH, à partir d'extraits issus de DEAE-cellulose.



L'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n = 4).

Figure 8 : Calcul du K_m NADH selon la représentation de LINEWEAVER et BURK.

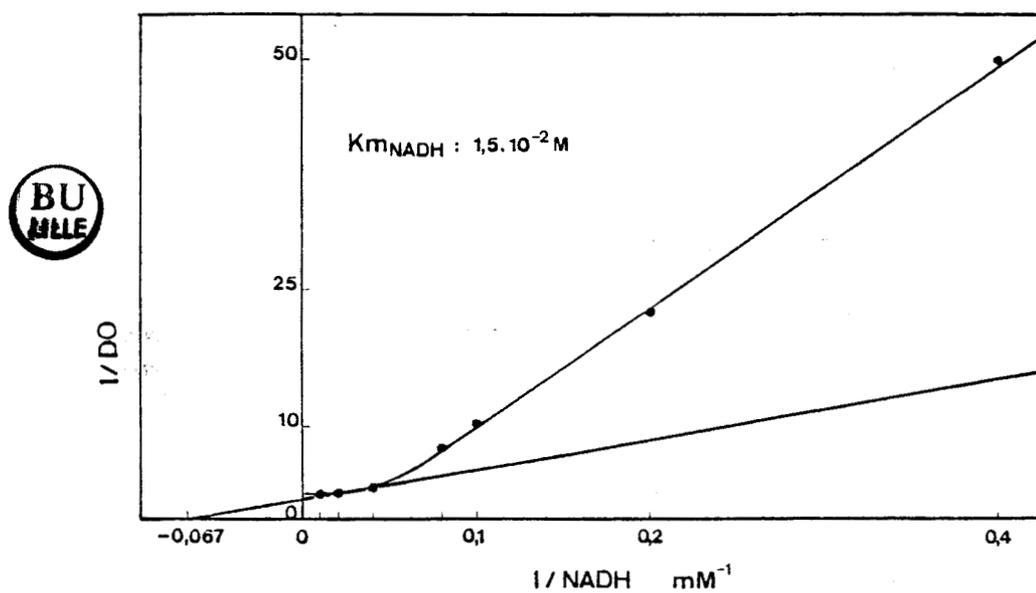
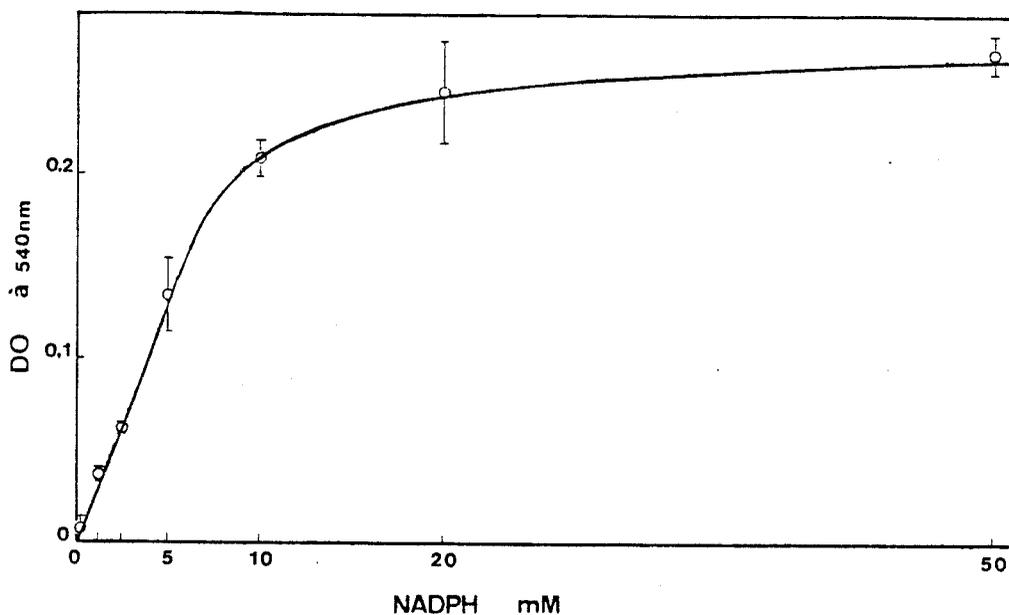


Figure 9 : Mesure de l'activité nitrate réductase "in vitro" en fonction de la concentration en NADPH, à partir d'extraits issus de DEAE-cellulose..



L'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n = 4).

Figure 10 : Calcul du K_m NADPH selon la représentation de LINEWEAVER et BURK.

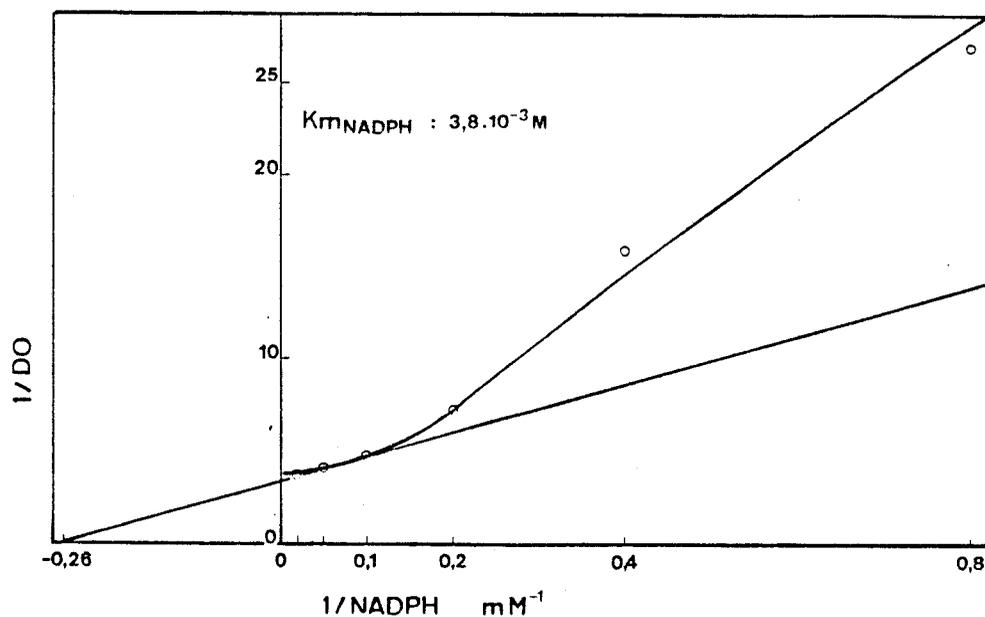
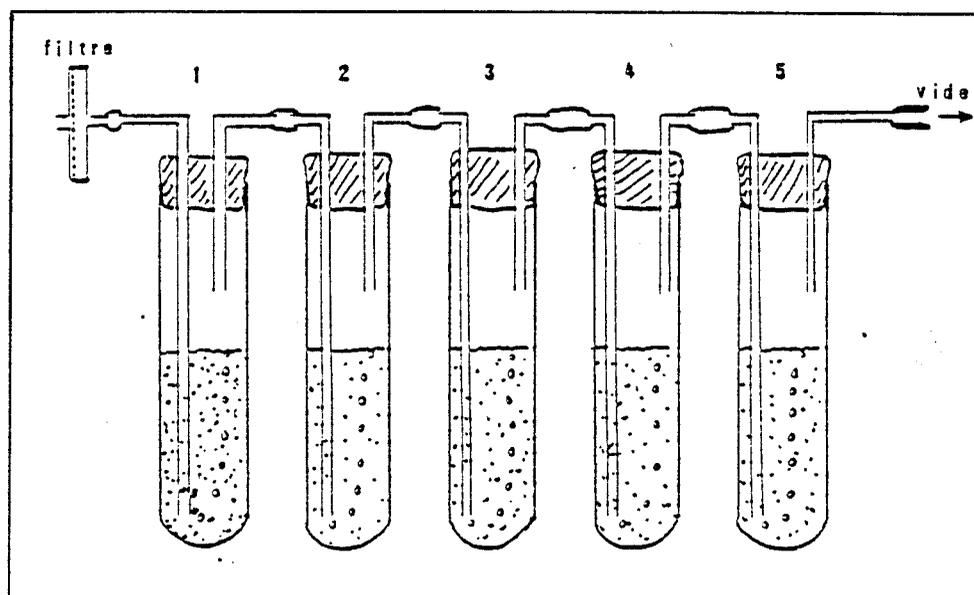


Schéma 3 : Montage expérimental utilisé pour étudier l'action des inhibiteurs métaboliques



Chaque tube renferme 20 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'iodo acétate, du malonate, de la roténone et de l'antimycine A.

Tableau 8 : Action de différents inhibiteurs du cycle de Krebs, de la chaîne respiratoire et de la glycolyse sur l'activité nitrate réductase mesurée "in vivo" et "in vitro".

		Témoin	roténone $10^{-2}M$	antimycine A $10^{-2}M$	malonate $5.10^{-3}M$	iodoacétate $5.10^{-3}M$
Activité NR "in vivo"	%	100	84	123	118	193 ou 90
Activité NADH: NR "in vitro"	%	100	94	134	133	88
Activité NADPH: NR "in vitro"	%	100	92	123	131	114

100 % d'activité nitrate réductase mesurée "in vivo" représente $2,62 \mu\text{moles NO}_2^-.h^{-1}. gMF^{-F}$

100 % d'activité NADH : et NADPH : NR mesurées

"in vitro" représentent respectivement $2,3 \mu\text{moles NO}_2^-.h^{-1}. gMF^{-1}$. et $1,5 \mu\text{moles NO}_2^-. h^{-1}. gMF^{-1}$.



Après le barbotage, les cellules sont de nouveau prélevées, lavées, filtrées puis pesées, pour mesurer l'activité nitrate réductase "in vivo". Le reste des cellules sert à confectionner un extrait brut dont on mesure l'activité "in vitro".

Les résultats obtenus sont reportés tableau n° 8.

La roténone provoque une inhibition de l'activité nitrate réductase aussi bien "in vivo" que "in vitro". L'inhibition de l'activité enzymatique "in vitro" (6 % et 8 %) semble moins élevée que "in vivo" (16 %).

Lorsque l'on fait agir l'antimycine A, on obtient l'inverse, elle provoque une activation des activités mesurées "in vivo" et "in vitro", avec NADH et NADPH comme donneurs d'électrons. L'acide malonique joue le même rôle activateur que l'antimycine A. Mais pour ce qui est de l'iodoacétate, on ne peut pas déterminer son rôle exact étant donné les résultats contradictoires que nous avons observés en répétant l'expérience. Nous avons obtenu autant de fois une action inhibitrice d'environ 10 % qu'une action activatrice très élevée (93 %). Le métabolisme des cellules est peut-être perturbé par l'éthanol introduit dans le milieu d'incubation. Les résultats obtenus "in vitro" sont totalement différents de ceux obtenus par la méthode "in vivo". Comme l'enzyme est bispécifique vis à vis du donneur d'électrons, le NADPH remplace peut-être le NADH dans certaines conditions, ce qui n'est pas décelable par la méthode "in vitro".

C. - Purification de l'enzyme

Toutes les opérations d'extraction et de purification ont été effectuées à une température voisine de 4° C.

Nous avons testé différentes méthodes de purification.

Tableau 9 : Purification de la NAD(P)H : nitrate réductase de Carotte sauvage par chromatographie sur Bleu Séphadex.

	Activité NADH : NR	Activité spécifique	Taux de purification	Activité NADPH : NR
Extrait brut	3,144	0,0016	1	1,112
lavage tampon phosphate	0,768			0,192
lavage NADH 200 mM	0,468	1,21	7,56	0,048
lavage NADPH 200 mM	0,142	0,41	256	0,108
lavage KCl M	0,732			0,516

Les activités NADH : et NADPH : NR sont exprimées en $\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$.

L'activité spécifique est donnée par le rapport de l'activité enzymatique et de la quantité de protéines, elle est exprimée en $\frac{\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}}{\text{mg protéines}}$

Le taux de purification est le rapport de l'activité spécifique de l'extrait considéré sur celle de l'extrait brut.



1 - Le Bleu Séphadex

La méthode de chromatographie sur bleu Séphadex a été décrite au chapitre Matériel et Méthodes

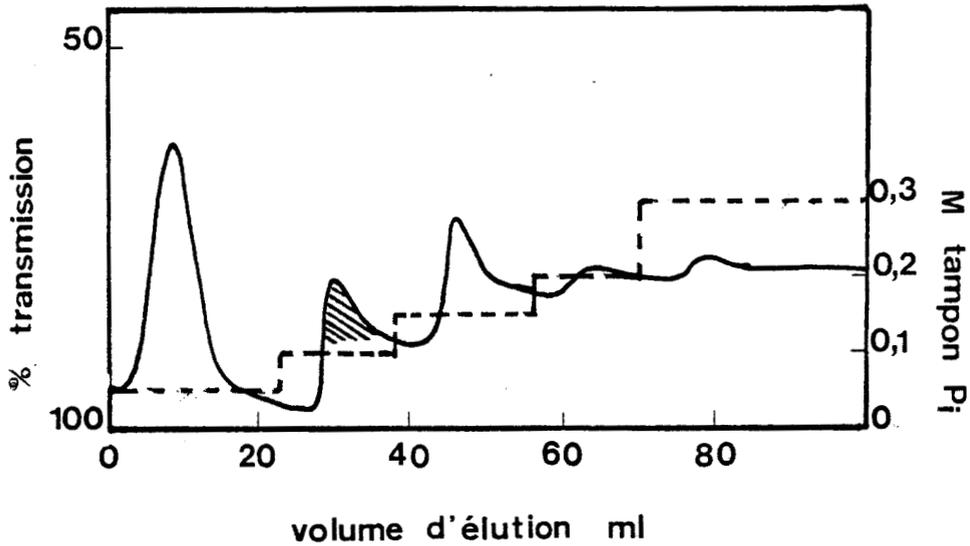
Rappelons que l'enzyme se fixe par son site NADH sur la colonne (Bleu Cibacron). La protéine fixée peut être éluée par du NADH ou du KCl mais nous avons aussi procédé à des essais d'éluion par le NADPH.

Les résultats sont reportés dans le Tableau n° 9.

Une quantité non négligeable de l'enzyme ne se liant pas au bleu, elle est directement filtrée lorsque l'on lave la colonne avec du tampon de même composition que le tampon d'extraction. Comme la liaison se fait par le NADH, toutes les enzymes à NADH peuvent se lier et par conséquent il y a compétition entre les différentes enzymes, d'où la faible proportion de nitrate réductase fixée. Néanmoins, des molécules se lient quand même car l'éluion par du tampon contenant du NADH permet d'obtenir un pic de protéines qui présente une activité enzymatique ; cette activité est faible mais la teneur en protéines de l'éluat aussi, et on obtient donc une fraction assez bien purifiée (756 fois) en une seule étape.

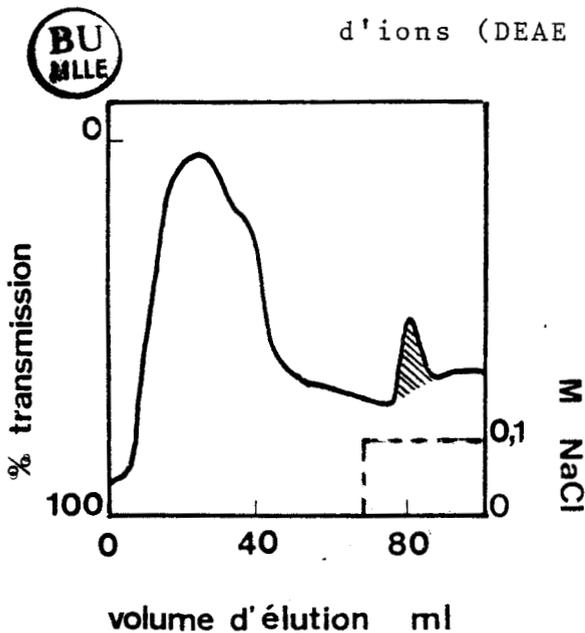
On peut aussi récolter une fraction, qui présente un taux élevé de purification (256 fois), éluée par le NADPH, mais l'activité enzymatique est très faible. Par contre, l'éluion avec du tampon de force ionique très élevée (KCl 1M), élue encore de nombreuses protéines dont la nitrate réductase. Cette fraction présente une activité enzymatique élevée et à cause de son faible taux de purification, elle peut être utilisée pour la suite du processus de purification et peut être chromatographiée sur hydroxylapatite pour une chromatographie d'adsorption.

Figure 11 : Courbe d'élution d'un extrait partiellement purifié de Carotte en chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite.



*Le pic hachuré correspond à celui qui contient l'activité nitrate réductase.
Elution par un gradient discontinu en NaCl
La DO des fractions est lue à 280 nm.*

Figure 12 : Courbe d'élution d'un extrait brut de Carotte en chromatographie d'échange d'ions (DEAE cellulose).



*Le pic hachuré correspond à celui qui contient l'activité nitrate réductase
La DO des fractions est lue à 280 nm.*

2 - La chromatographie sur hydroxylapatite (Ultrogel)

La fraction éluée par le KCl 1 M en chromatographie sur Bleu Séphadex est donc reprise, dessalée par tamisage moléculaire à l'aide d'une colonne de Séphadex G25 puis déposée sur une colonne d'hydroxylapatite.

L'élué des protéines se fait par un gradient discontinu de tampon phosphate dont la molarité varie de 0 à M. Le profil d'élué obtenu est le suivant (cf figure n° 11).

Les différents pics obtenus sont récupérés et l'activité nitrate réductase et le taux de protéines mesurés.

On obtient une très faible activité dans le pic élué avec le tampon 0,1 M ($0,05 \mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gMF}^{-1}$).

En mesurant le taux de protéines on en déduit l'activité spécifique qui est de $0,049 \frac{\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gMF}^{-1}}{\text{mg protéines}}$. On a donc un extrait purifié 81 fois mais dont l'activité est très faible.

3 - La chromatographie sur DEAE-cellulose

Nous avons aussi essayé de purifier la nitrate réductase par chromatographie d'échanges d'ions, et pour cela nous avons utilisé une DEAE-cellulose.

L'étape DEAE-cellulose peut être précédée d'une précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium à 50 % de son taux de saturation et d'un dessalage par filtration sur Séphacryl GF05 ou Séphadex G25. Cependant on observe alors une trop grande perte d'activité enzymatique, on dépose donc directement l'extrait brut sur la colonne de DEAE-cellulose. Les protéines sont éluées par un gradient discontinu de NaCl de 0 à 0,2 M. On peut observer le profil d'élué suivant (cf figure n° 12).

La nitrate réductase est éluée par une molarité en NaCl de 0,1.

L'activité enzymatique est de 1,45 $\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gMF}^{-1}$ (cf tableau n° 10).

Tableau 10 : Purification par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose de la nitrate réductase de Carotte sauvage.

	Activité NADH : NR	Activité spécifique	taux de purification
Extrait brut	2,38	0,0035	1
Lavage NaCl 0,1 M	1,45	0,058	16

*L'activité NADH : NR est exprimée en $\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gMF}^{-1}$
L'activité spécifique est donnée par le rapport de l'activité enzymatique et de la quantité de protéines, elle est exprimée en $\frac{\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gMF}^{-1}}{\text{mg protéines}}$*

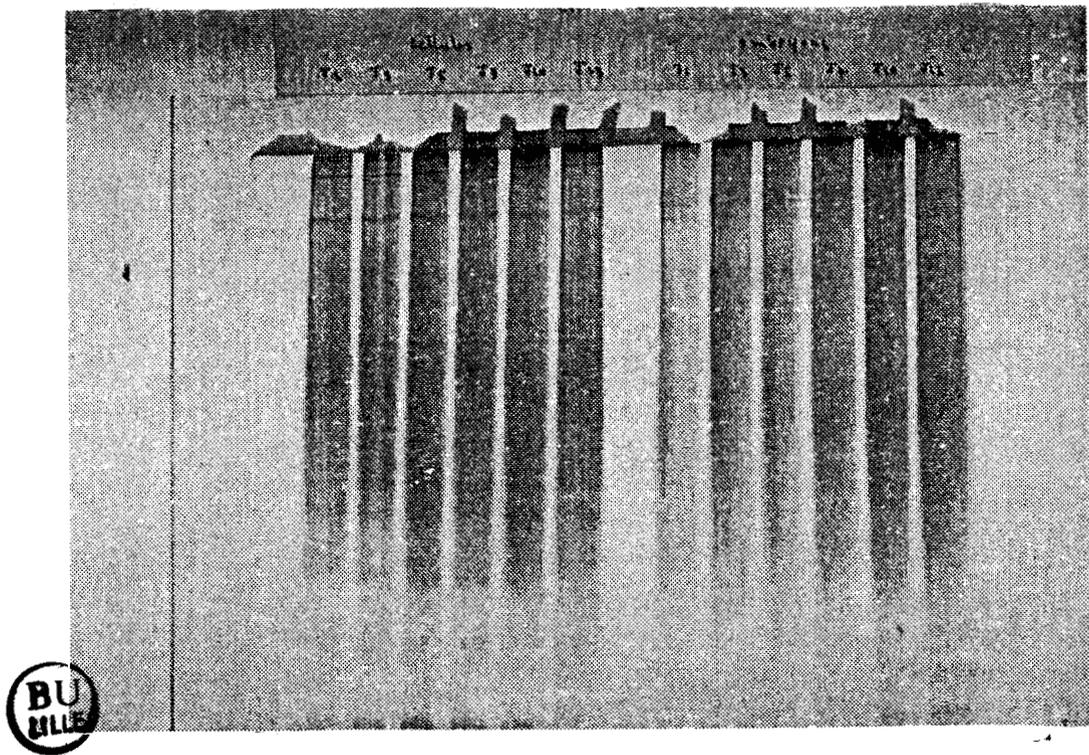
Le taux de purification est le rapport de l'activité spécifique de l'extrait considéré sur celle de l'extrait brut.

L'activité enzymatique reste donc élevée bien que le taux de purification ne soit pas très fort. L'intérêt de la DEAE-cellulose est d'obtenir une préparation ayant une bonne activité nitrate réductase qui peut être chromatographiée sur une colonne d'affinité. Nous avons donc envisagé une chromatographie d'affinité sur 5'AMP sépharose avec nos extraits chromatographiés sur DEAE-cellulose.

4 - La 5'AMP Sépharose

La chromatographie sur 5'AMP Sépharose permet une liaison d'affinité de la nitrate réductase par le site à NADH. Comme avec le bleu Séphadex, le NADH permet l'éluion de la protéine enzymatique. Et l'on procède donc de la même façon que pour la chromatographie sur Bleu Séphadex.

Photo 1 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide d'extraits d'embryons somatiques et de cellules de Carotte, prélevés à des stades différents de la croissance.



On retrouve dans la fraction éluée par le NADH 200 mM, une faible activité enzymatique de $0,11 \mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$. La fraction n'est purifiée que 187 fois, ce n'est pas un résultat satisfaisant pour une chromatographie d'affinité.

La technique qui semble la plus intéressante est la chromatographie sur Bleu Séphadex, de par son taux de purification élevé, cependant l'activité enzymatique retrouvée est faible.

5 - Electrophorèse

Pour déterminer si les extraits obtenus sont bien purifiés, nous avons fait des électrophorèses mais le tampon d'extraction et les tampons d'éluion qui contiennent des phosphates, qui sont conducteurs, ont perturbé la migration. Nous aurions pu enlever les sels des tampons, mais cette étape de dessalage est longue et fait chuter l'activité enzymatique.

Néanmoins des extraits bruts ont quand même été déposés en électrophorèse et les résultats ont été photographiés (photo n° 1).

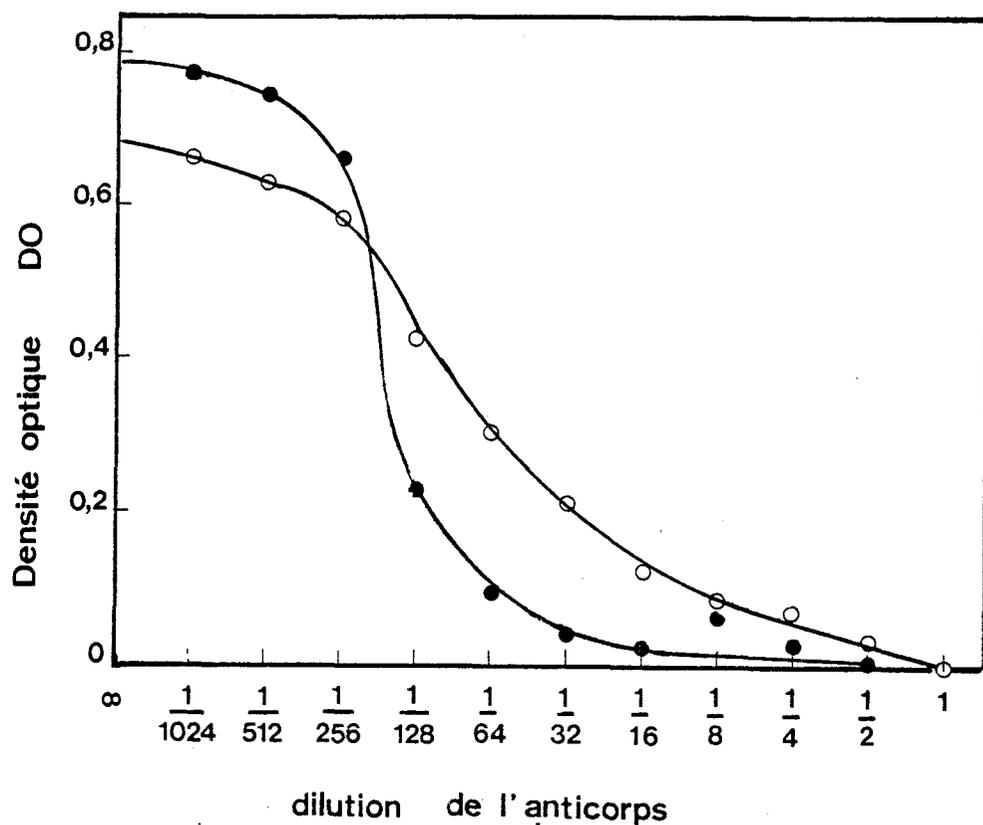
Les extraits déposés sont des extraits de cellules et d'embryons prélevés à différents stades de croissance.

L'électrophorégramme des extraits de cellules présente un nombre de bandes supérieur et mieux séparées que celles d'extrait d'embryons.

Nous avons essayé de localiser la nitrate réductase. Pour cela, nous avons déposé sur un gel d'acrylamide toute une série d'extraits bruts pour obtenir une grande quantité d'enzyme et pouvoir mesurer l'activité enzymatique dans le gel.

Après électrophorèse, le gel est récupéré et découpé en fines bandes de 2 à 3 mm qui sont mises à incuber dans du tampon phosphate 50 mM (pH 7,5) additionné de KNO_3 0,1 M et

Figure 13 : Réactions d'immunoprécipitation de la nitrate réductase.



Dilution de l'antisérum : 1 correspond à l'immunsérum non dilué (0,100 ml).

Les dilutions sont faites par addition du sérum physiologique selon la progression géométrique dont le taux est 1 : 2.

- Silène
- Epinard



de NADH $1\mu\text{M}$ pour une mesure d'activité nitrate réductase.

Après une heure trente d'incubation, on arrête la réaction par les réactifs du nitrite et on observe que l'activité se situe au niveau du gel de concentration. Il y a donc une mauvaise migration des molécules.

La nitrate réductase ne rentre donc pas dans le gel de séparation. Elle se trouve peut-être liée à des structures cellulaires non dissociées au cours de l'extraction, des structures membranaires par exemple.

6 - Immunoprécipitation

Des réactions d'immunoprécipitation ont été faites avec un extrait de *Daucus carota* chromatographié sur DEAE cellulose, qui a été testé contre les anticorps d'Epinarde et les anticorps de Silène.

Pour cela, on met en contact l'extrait de Carotte avec une gamme d'anticorps d'Epinarde dilué de moitié selon une progression géométrique. Il y a précipitation si l'enzyme réagit avec les anticorps. On centrifuge dans des tubes Ependorf et l'on récupère le surnageant pour en mesurer l'activité nitrate réductase. Si le surnageant est actif, l'enzyme n'a pas réagi avec les anticorps, par contre s'il n'y a pas d'activité, les anticorps ont réagi avec l'enzyme de Carotte. Les résultats sont reportés figure n° 13.

La nitrate réductase est reconnue par les anticorps de Silène et d'Epinarde, il existe donc des déterminants communs. Pourtant aucune réaction de précipitation n'est observée avec ces immunosérums par la méthode de double diffusion dans l'agarose (méthode d'OUCHTERLONY, 1949). Cemanque de réaction est peut-être

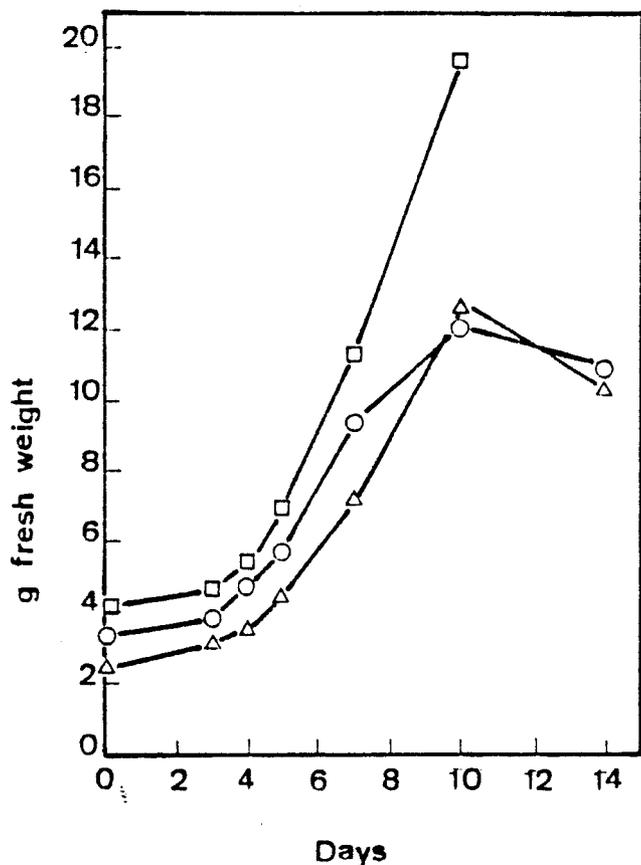
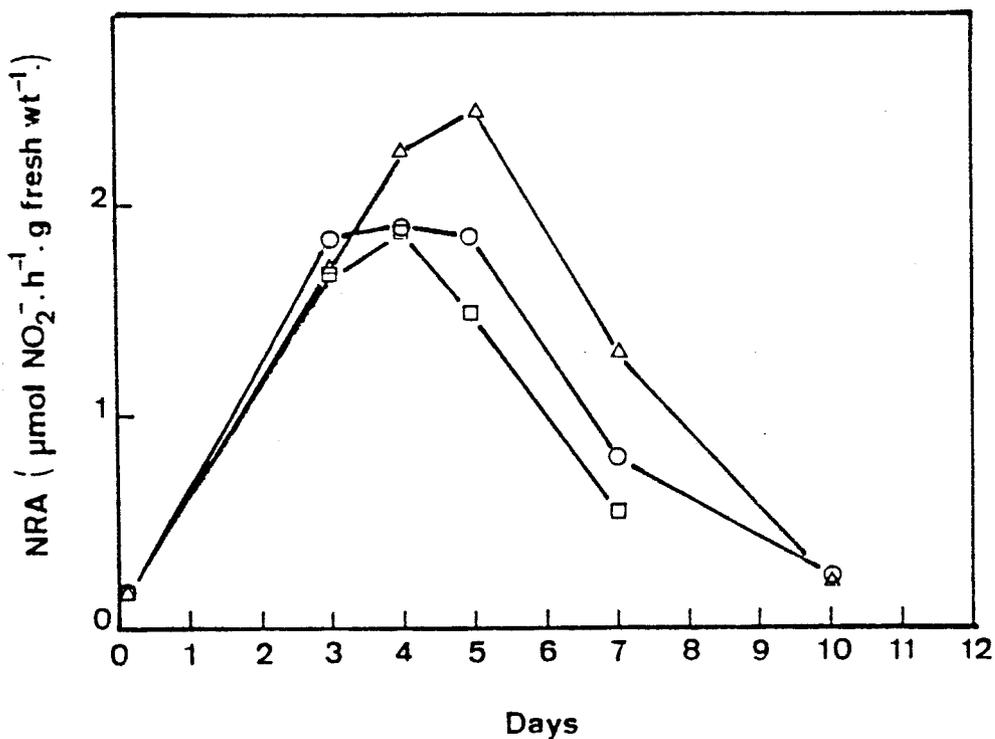


Figure 14 : Croissance des cellules de *Daucus carota* avec différents volumes d'ensemencement :
△—△ 15 ml
○—○ 20 ml
□—□ 25 ml.

Figure 15 : Variations de l'activité nitrate réductase des cellules de *Daucus carota* au cours de la croissance, avec différents volumes d'ensemencement :
△—△ 15 ml, ○—○ 20 ml, □—□ 25 ml.



dû au fait que l'enzyme ne diffuse pas plus dans le gel d'agarose que dans un gel de polyacrylamide. Mais on devrait dans ce cas observer un arc de précipitation près des puits contenant les antigènes. Une autre possibilité est que le nombre de déterminants communs n'est pas suffisant pour provoquer une réaction de précipitation ; la fixation des anticorps sur l'antigène provoque cependant l'inactivation enzymatique parce qu'elle se fait sur un déterminant proche du site catalytique.

D. - Evolution de l'activité nitrate réductase et de la croissance des cellules et des embryons.

1 - En fonction de la quantité de cellules ou embryons ensemencée .

Les cellules sont cultivées dans des milieux renfermant du nitrate de potassium et du nitrate d'ammonium, qui permettent l'induction de la nitrate réductase.

Nous avons étudié l'effet d'un ensemencement plus ou moins important sur la croissance de la suspension cellulaire et l'évolution de l'activité nitrate réductase.

D'ordinaire, les suspensions sont ensemencées par prélèvement de 20 ml d'une culture de 14 jours ; pour cette expérience, nous avons préparé trois séries de fioles dans lesquelles on ensemence 15, 20 ou 25 ml, ce qui correspond à 2,4 ; 3,2 et 4 grammes de matière fraîche.

Les courbes de croissance ont été établies (figure n° 14) ainsi que les courbes d'activité enzymatique correspondantes (figure n° 15). Les activités nitrate réductase ont été mesurées

"in vivo" tous les 2 ou 3 jours à la même heure. Les courbes de croissance sont établies par estimation du poids de matière fraîche.

Les cultures qui sont ensemencées avec 15 ml de matériel végétal ont une croissance plus lente que les cultures ensemencées avec 20 ml ou 25 ml.

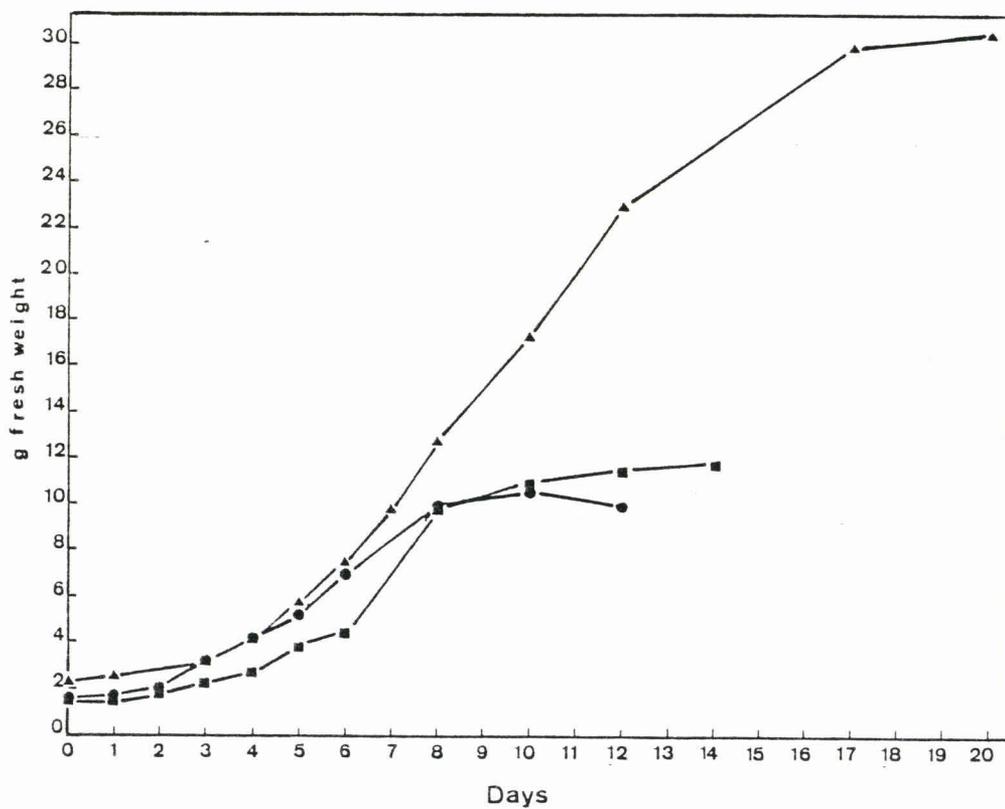
Quant à l'activité enzymatique, en début de culture, les trois courbes se superposent, mais selon que la croissance est faible ou forte, les pics d'activité se prolongent ou l'activité chute.

Il apparaît que lorsque la croissance est faible (si on ensemence 15 ml), l'activité enzymatique présente un pic plus large, avec un maximum d'activité au 5ème jour de $2,3 \mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$. Alors que plus la croissance est rapide plus l'activité est faible et le pic d'activité se rétrécit; pour un ensemencement de 25 ml, on observe un maximum d'activité au 4ème jour de culture, de $1,9 \mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$. La croissance étant accélérée l'activité nitrate réductase apparaît et disparaît plus vite.

2 - Au cours de l'évolution des embryons

Comme nous l'avons dit précédemment, les cellules de *Daucus carota* se multiplient dans un milieu renfermant du 2,4-D (0,25 mg/l), si on enlève le 2,4-D du milieu de culture, les cellules peuvent évoluer en embryons somatiques, d'autant plus qu'il existe déjà un grand nombre de structures proembryonnaires dans les cultures en présence de 2,4-D. Les structures proembryonnaires sont des amas cellulaires à partir desquels les embryons sont initiés.

Figure 16 : Croissance des cellules et embryons de *Daucus carota* selon le stade de développement.



- embryons somatiques: 1er passage dans un milieu sans hormone
- ▲—▲ embryons somatiques: 2ème passage dans un milieu sans hormone
- cellules cultivées sur un milieu avec 2,4-D (0,25 mg/l).

Au premier passage sans 2,4-D , de nombreuses cellules se transforment en proembryons, puis en embryons somatiques et quelques uns atteignent en fin de culture, le stade "torpille".

Au second passage, presque toutes les cellules se sont transformées ; les embryons ont déjà des formes bien différenciées, il subsiste néanmoins des embryons cordiformes et globulaires.

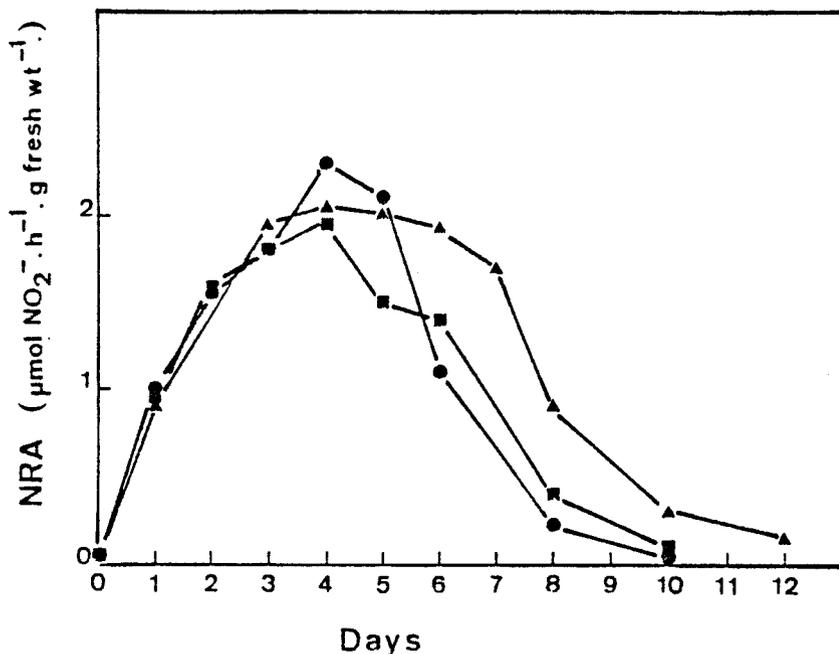
Nous avons établi, les courbes de croissance (figure n° 16), les courbes d'activité nitrate réductase mesurées "in vivo" (figure n° 17, p. 73) et les courbes de variation du pH (figure n° 18, p. 73) des milieux de culture des cellules et des embryons somatiques au premier et au second passage dans un milieu sans hormone.

Si l'on observe la figure n° 16, il semble que les embryons aient une croissance plus longue due peut-être à la présence de la chlorophylle qui leur confère une autotrophie lorsque la source carbonée est épuisée. La croissance de la suspension au deuxième passage sur un milieu sans hormone est plus longue, mais c'est moins net pour le premier passage, d'ailleurs les embryons à ce stade ne sont presque pas chlorophylliens.

Nous ne pouvons rien conclure de significatif des courbes d'activité nitrate réductase (figure n° 17, p. 73), mais il semblerait qu'il y ait une légère tendance à une augmentation du pic d'activité enzymatique au cours de l'embryogenèse. Cette observation sera complétée par une mesure de l'activité de réduction sur les embryons eux-mêmes.

On peut cependant observer de grandes différences au niveau des courbes de pH des milieux de culture (figure n° 18, p. 73). Le pH au cours de la croissance des cellules varie fortement, il commence d'abord par baisser de 5,7 à 4,6 jusqu'au 4ème jour, cela correspond à la libération d'ions H^+ lorsque l'ammonium est

Figure 17 : Variations de l'activité nitrate réductase des cellules et embryons de Carotte au cours de la croissance et selon le stade de développement.

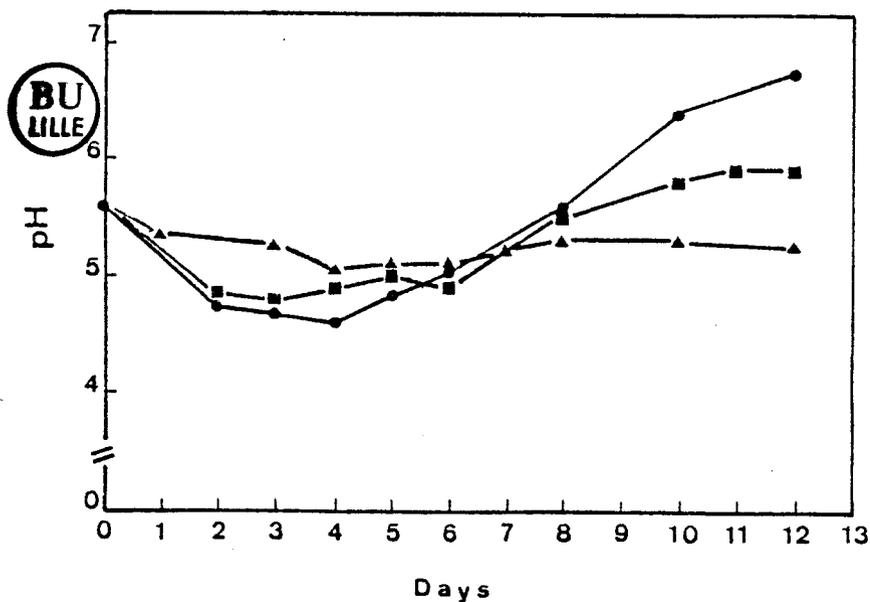


■-■ embryons somatiques
1er passage dans un
milieu sans hormone.

▲-▲ embryons somatiques
2ème passage dans un
milieu sans hormone

●-● cellules cultivées
dans un milieu avec
2,4-D (0,25 mg/l)

Figure 18 : Variations du pH du milieu de culture au cours de la croissance en fonction du stade de développement des cellules et des embryons de Carotte.



absorbé. Ensuite le pH remonte pour atteindre 6,8 au 12^{ème} jour de culture. Cette remontée de pH correspond à l'absorption du nitrate.

Il apparaît que dans les suspensions d'embryons somatiques, plus les embryons sont différenciés, plus le pH est stable. En effet dans les cultures d'embryons au deuxième passage sur un milieu sans 2,4-D, le pH ne varie pas tout au long de la culture ; il descend à 5,05 en début de culture (4^{ème} jour) mais ne remonte qu'à 5,3 en fin de culture. Les cellules et embryons cultivés au premier passage sur un milieu sans hormone présentent une courbe de pH intermédiaire.

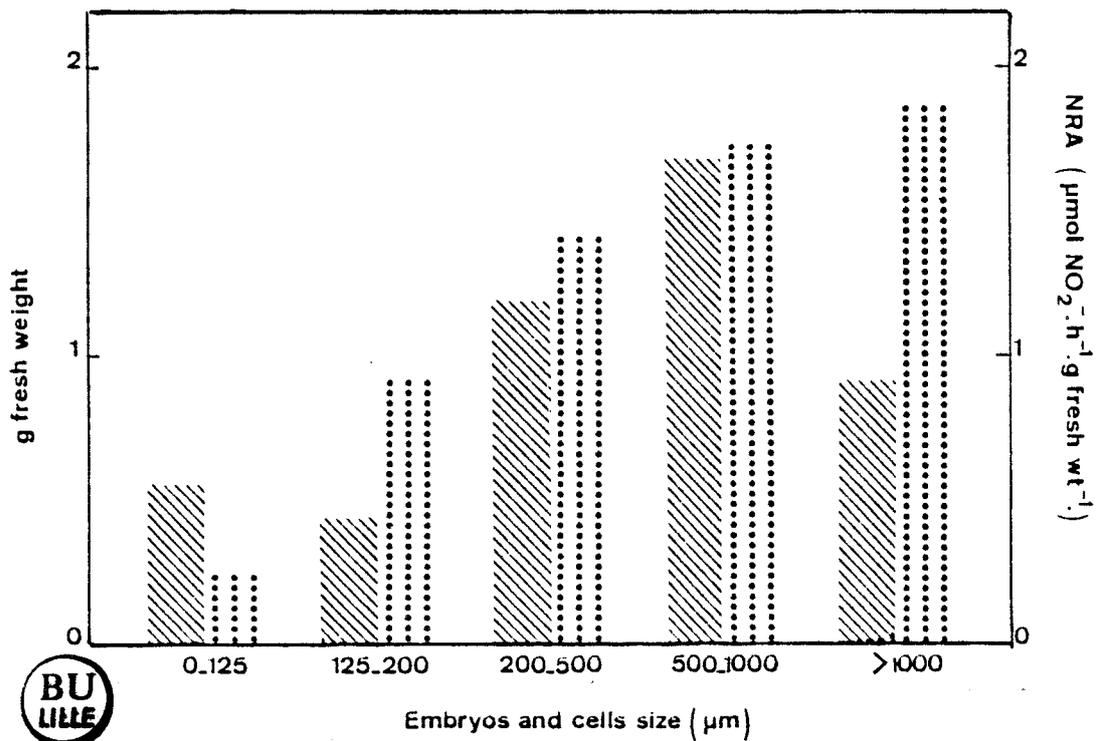
3 - Activité nitrate réductase en fonction de la taille des cellules et des embryons.

Après le deuxième passage sans hormone, la suspension est formée par un mélange de cellules et d'embryons qui ont des formes globulaires, cordiformes et "torpilles" et des formes plus différenciées.

Nous les avons séparés en fonction de leur taille, pour mesurer dans chaque fraction l'activité enzymatique (figure n° 19, p. 75). Les cellules et les embryons, après cinq jours de culture, sont filtrés sur des filtres en inox de tailles de mailles différentes (125, 200, 500 μ m et 1 mm) et l'on obtient donc cinq fractions qui sont pesées et dont on mesure l'activité nitrate réductase "in vivo". De plus, pour mieux visualiser les formes embryonnaires dans chacune des fractions, des photos ont été prises (photos n° 2, 3, 4, 5 et 6., p. 76, 77, 78).

Les résultats obtenus sont reportés figure n° 19, p. 75.

Figure 19 : Décomposition d'une culture d'embryons somatiques (2ème passage dans un milieu sans hormone) selon la taille des embryons. Evaluation du poids frais et de l'activité nitrate réductase de chaque fraction.



▨ poids matière fraîche
●●● activité nitrate réductase

Photo 2 : Vue au microscope (obj. x 10) de la fraction d'embryons compris entre 0 et 125 μm lorsque des embryons somatiques sont séparés en fonction de leur taille après deux passages dans un milieu sans hormone.

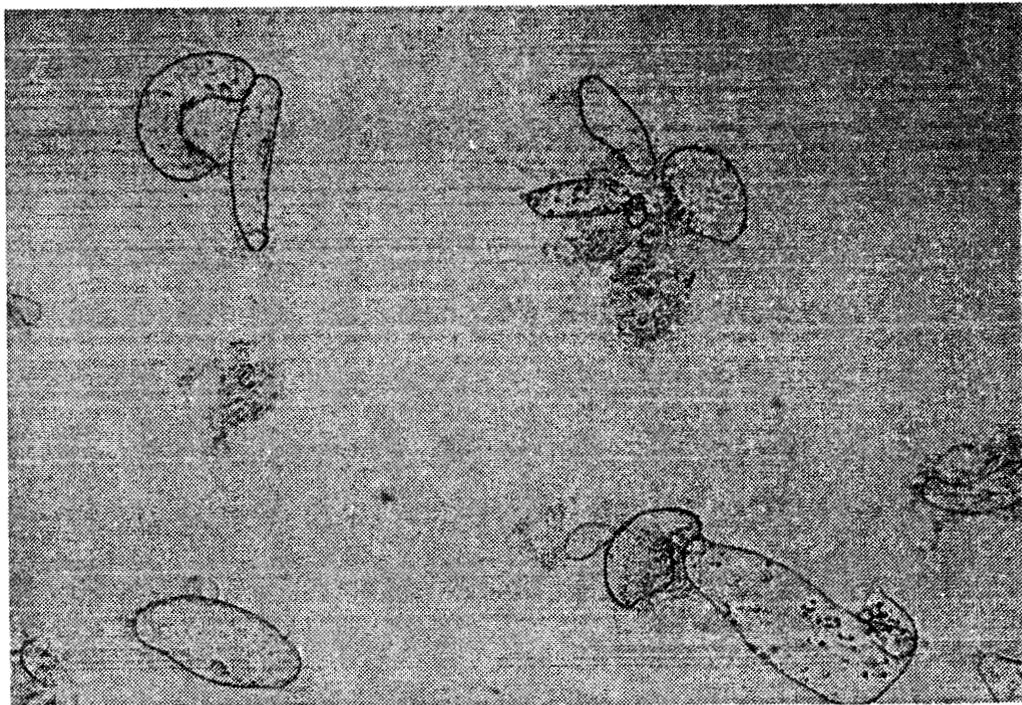


Photo 3 : Vue au microscope (obj. x 10) de la fraction d'embryons compris entre 175 et 200 μm .

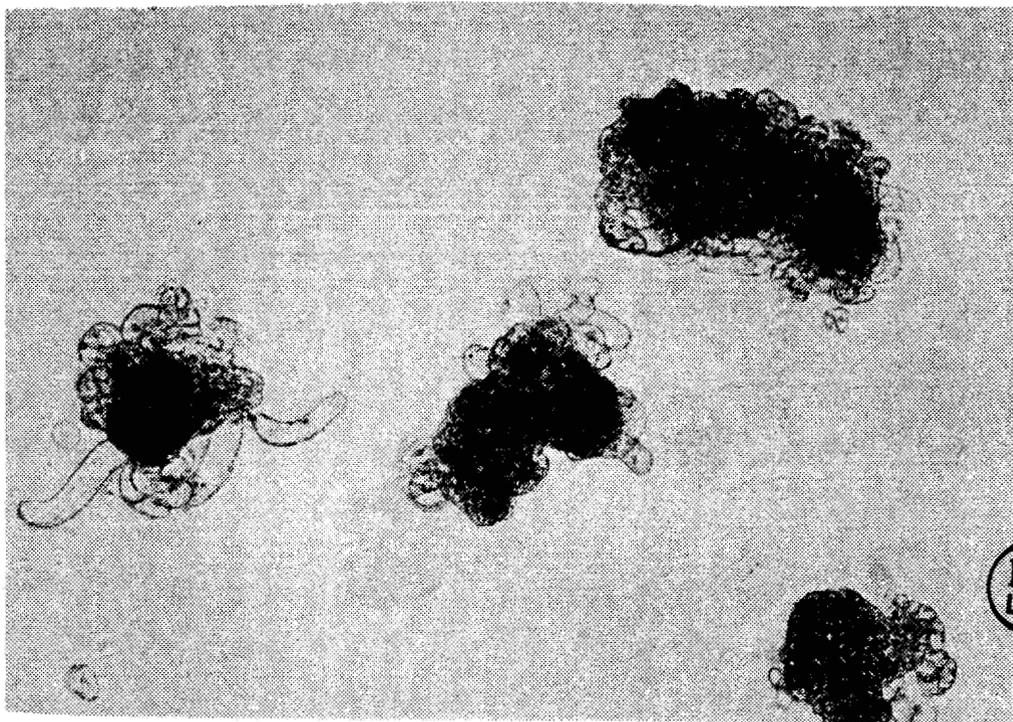


Photo 4 : Vue à la loupe binoculaire (obj. x 2) de la fraction d'embryons compris entre 200 et 500 μm lorsque l'on sépare des embryons somatiques en fonction de leur taille après deux passages dans un milieu sans hormone.

Photo 5 : Vue à la loupe binoculaire (obj. x 2) de la fraction d'embryons compris entre 500 μm et 1 mm.

Photo 6 : Vue à la loupe binoculaire (obj. x 2) de la fraction d'embryons > 1 mm.

Photo 4

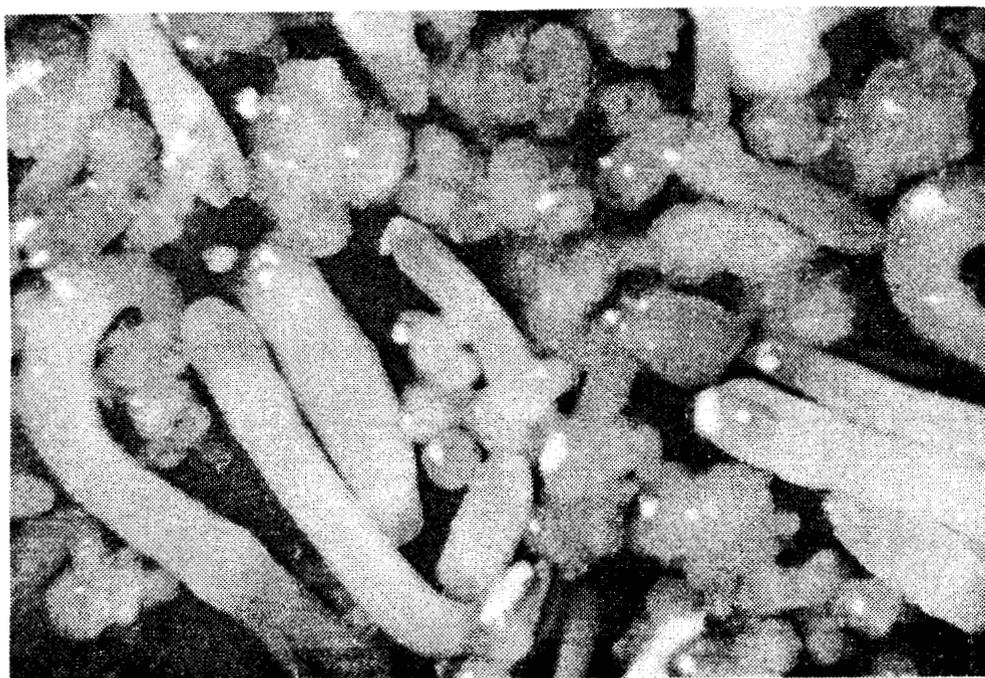
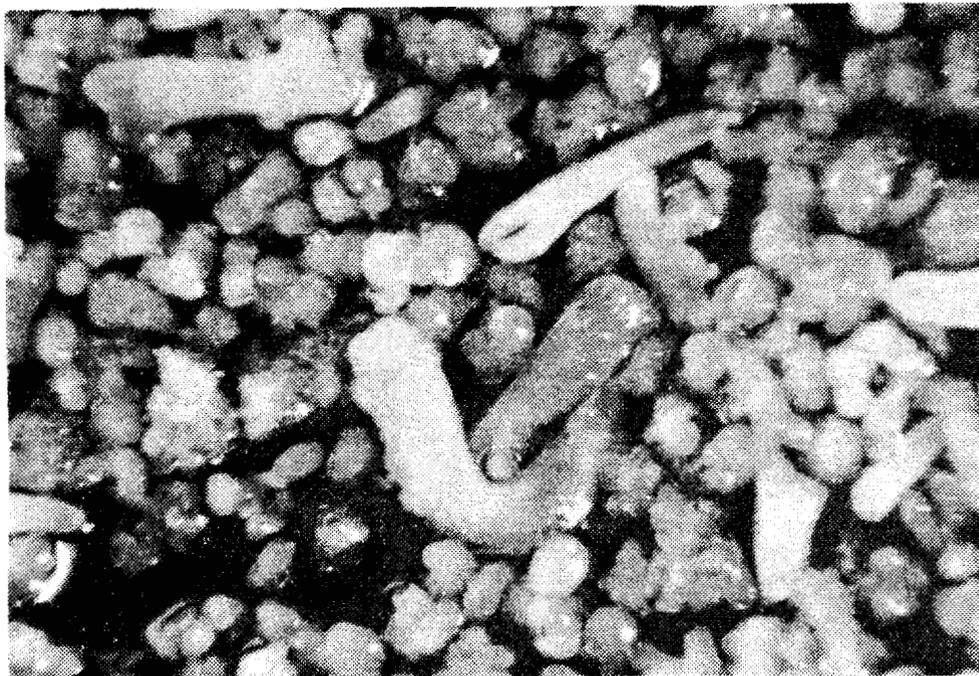


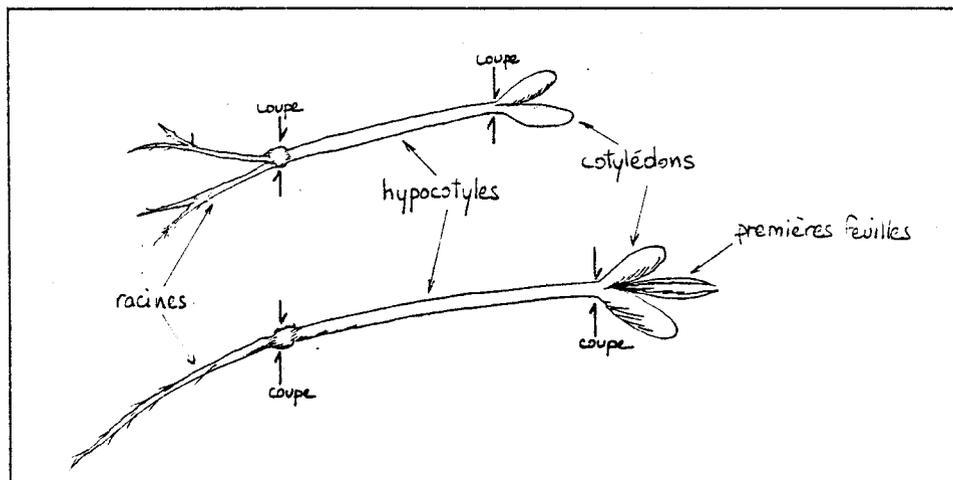
Photo 5



Photo 6



Schéma 4 : Coupe des plantules de Carotte issues d'embryons somatiques.



Les plantules sont coupées en trois parties :
- racines
- hypocotyles
- cotylédons et premières feuilles

Tableau 11 : Activité nitrate réductase "in vivo" dans les différentes parties des plantules.



	hypocotyles	feuilles	racines
activité NR après 5 h. de culture	0,075	0,425	0,100
activité NR après 24 h. de culture	0,025	0,250	0,005

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

A ce stade de la culture, il ne subsiste quasiment plus de cellules isolées ou de petits amas cellulaires. Ces formes sont présentes dans la fraction 0-125 μm , qui ne représente que 12 % de la culture totale. Les autres fractions représentent des formes embryonnaires plus ou moins différenciées, du proembryon à un embryon où déjà on peut observer une ébauche racinaire et des cotylédons.

La majorité des formes ont des tailles comprises entre 200 μm et 1 mm. Mais le plus intéressant est que l'activité nitrate réductase mesurée "in vivo" chez les cellules et les embryons est en nette augmentation en fonction de leur taille ; plus les embryons sont différenciés, plus l'activité enzymatique est élevée. On passe de 0,26 $\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$ pour les cellules à 1,87 $\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$ chez les embryons les plus différenciés, dans la même fiole, donc qui ont été mis en culture en même temps et dans les mêmes conditions.

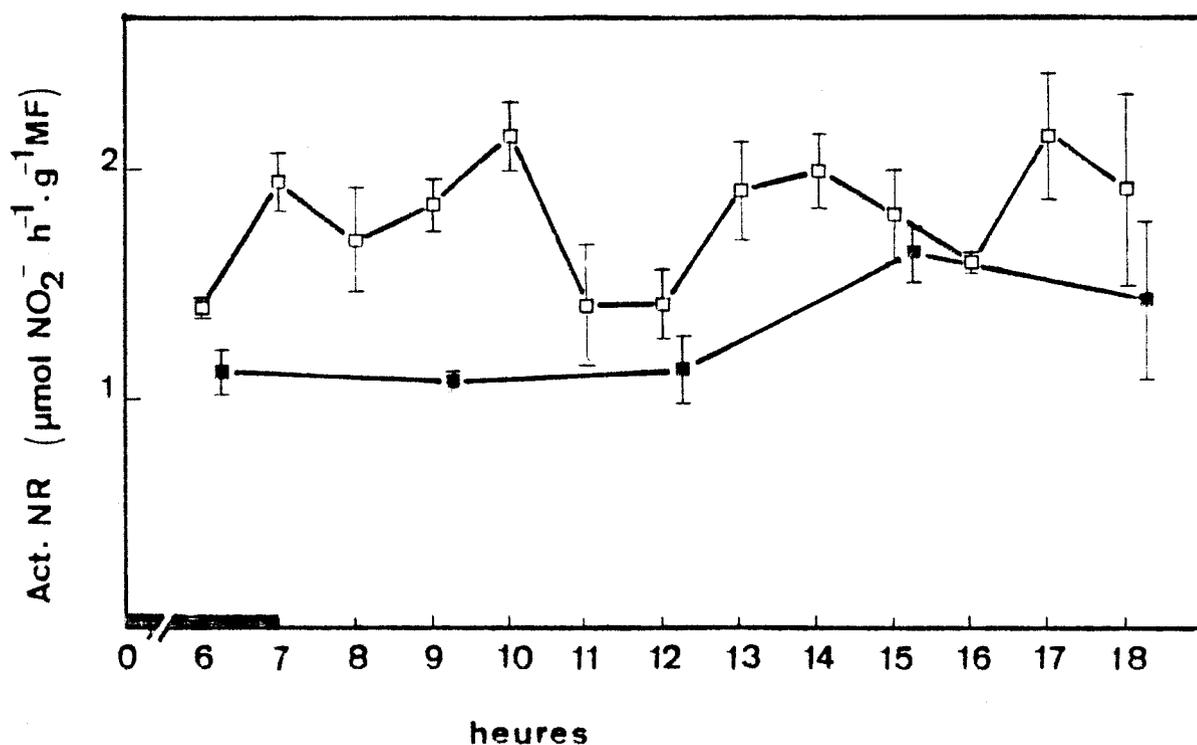
4 - Activité enzymatique des plantules.

Pour essayer de déterminer le rôle de la nitrate réductase dans la différenciation, nous avons prélevé les formes les plus différenciées de la suspension en fin de culture, et nous les avons déposées sur un milieu gélosé renfermant essentiellement du KNO_3 (3,8 g/l) de façon à induire la nitrate réductase.

L'activité enzymatique est mesurée 5 h. et 24 h. après la mise en culture, dans les différentes parties des plantules (cf schéma n° 4 et tableau n° 11).

Il y a une nette différence entre les racines et les hypocotyles d'une part et les feuilles d'autre part. La nitrate réductase ne semble localisée que dans les parties chlorophylliennes de la plantule. On peut considérer que dans les hypocotyles et les racines, l'activité enzymatique est nulle après 24 h. de culture.

Figure 20 : Variations de l'activité nitrate réductase au cours d'une journée, en fonction de la lumière, chez des embryons somatiques (4ème jour du 2ème passage dans un milieu sans hormone).



■—■ embryons somatiques cultivés à l'obscurité
□—□ embryons somatiques cultivés en lumière 12/12.

L'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % ($n = 4$).

5 - Evolution de l'activité nitrate réductase en fonction de la lumière.

Les embryons somatiques étant des structures chlorophylliennes, il nous a paru intéressant d'étudier l'action de la lumière sur l'activité nitrate réductase des embryons somatiques.

Pour cela, nous avons utilisé des embryons somatiques bien différenciés, au 3ème passage sur un milieu sans hormone. La moitié des fioles ensemencées est maintenue à l'obscurité totale, l'autre moitié subit une alternance lumière-obscurité d'une périodicité 12/12. La période lumière s'étend de 7 h. du matin à 19 h.

Les mesures sont faites au cours de la troisième journée de culture, elles débutent à 6 h. du matin, et sont effectuées pendant 12 h. Les résultats sont reportés figure n° 20.

L'activité nitrate réductase est plus faible si les embryons somatiques sont maintenus à l'obscurité que s'ils subissent l'alternance lumière-obscurité.

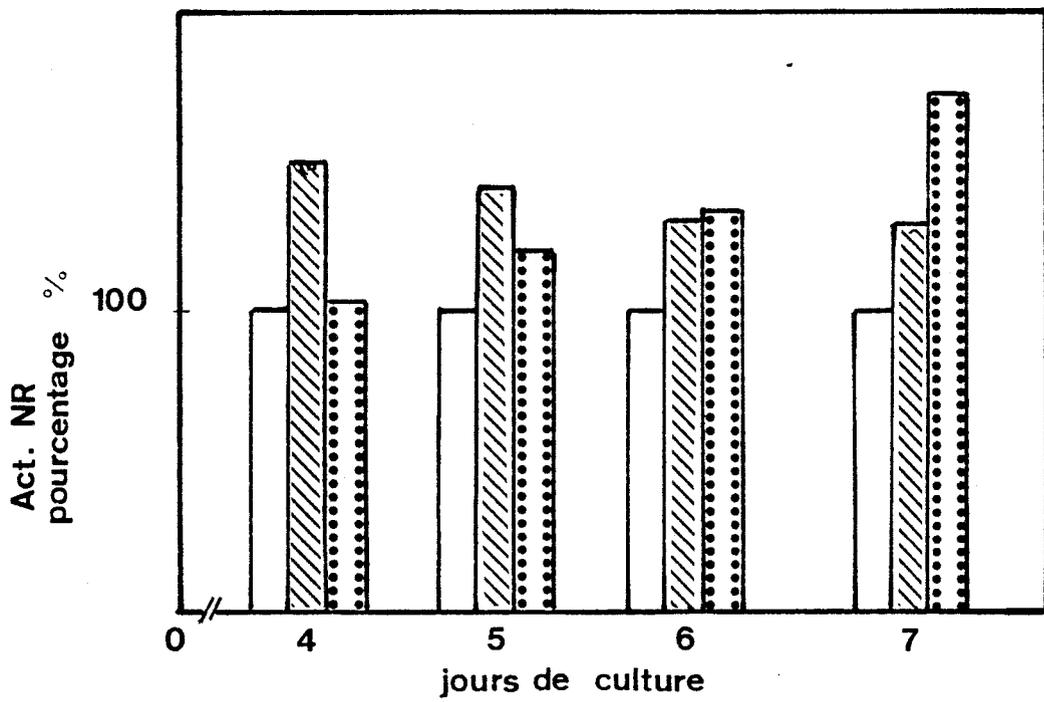
L'activité semble plus stable à l'obscurité, alors que l'on peut observer des variations chez les embryons éclairés ; en une heure d'intervalle, l'activité peut passer de $2,26 \mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$ à $1,42 \mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g MF}^{-1}$;

Les variations ne semblent pas suivre une périodicité particulière et sont assez irrégulières.

6 - Action de l'acide abscissique sur la croissance et l'activité nitrate réductase.

Le fait que nous ayons observé que l'activité enzymatique est plus élevée lorsque la croissance est lente (cf.D.- 1-) nous a incité à utiliser l'acide abscissique (ABA) dans nos cultures de cellules. De plus, certains auteurs (THOMAS et Col., 1985) parlent d'un effet activateur de l'ABA sur l'embryogenèse somatique.

Figure 21 : Variations de l'activité nitrate réductase des cellules de *Daucus carota* au cours de la croissance, en présence d'ABA.



- ABA $10^{-4} M$
- /// ABA $0,4 \cdot 10^{-6} M$
- Témoin

Nous avons donc incorporé dans des fioles de cellules, au moment de l'ensemencement, deux concentrations d'ABA : $0,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ et 10^{-4} M et nous avons suivi l'évolution de l'activité nitrate réductase après quelques jours de culture. Les résultats sont reportés figure n° 21.

Après 7 jours de culture, les cellules sont pesées et on observe que par rapport au témoin (100 % = 5,095 g), la concentration en ABA 10^{-4} M est complètement inhibitrice de la croissance (73 % d'inhibition) alors que la concentration $0,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ne provoque qu'une légère inhibition (20 %).

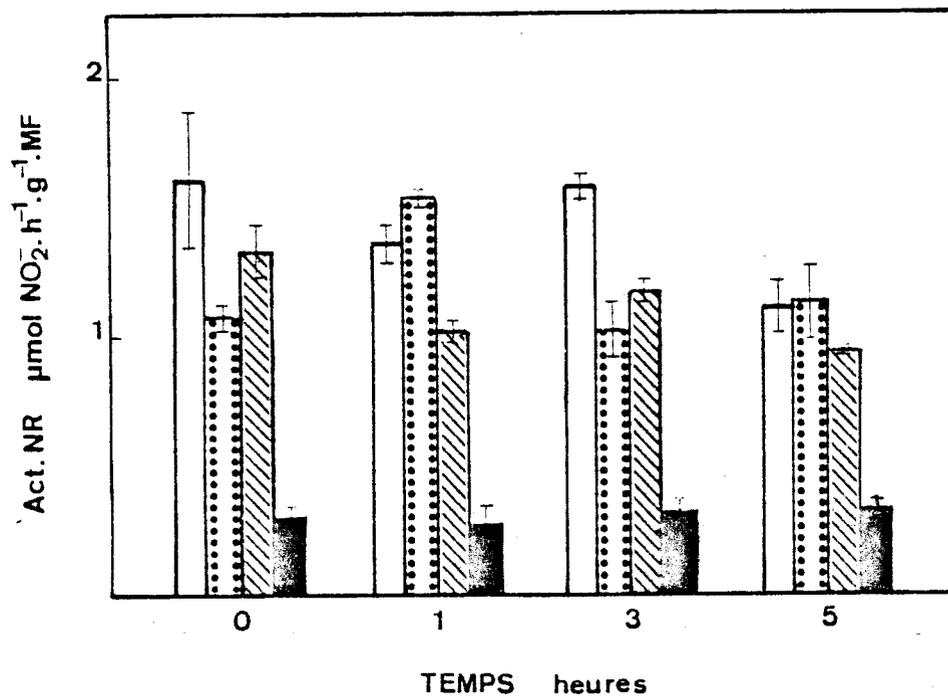
Quant à l'activité enzymatique, elle est accrue en présence d'ABA. En effet lorsque l'on ajoute $0,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ à la suspension cellulaire, l'activité nitrate réductase représente 151 % du témoin au 4ème jour ; mais cette activité s'amenuise au cours du temps ; au 7ème jour de culture, l'activation n'est plus que de 129 % ; la suspension semble revenue, au cours du temps, à une croissance et à un taux d'activité identiques à ceux du témoin.

Pour une concentration en ABA de 10^{-4} M , en début de culture, l'activité nitrate réductase n'est pas accrue (102 % à 4 jours), mais ensuite l'activité augmente : 117 % à 5 jours, 132 % à 6 jours et 174 % à 7 jours. Les cellules apparemment ne se multiplient plus du tout, mais elles ne sont pas mortes car il subsiste une activité enzymatique très élevée.

Cela confirme donc que l'activité nitrate réductase est "antagoniste" de la croissance et donc que moins les cellules se multiplient plus l'activité enzymatique est élevée.

Lorsque l'on applique $0,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ d'ABA à une culture et que l'on observe son effet sur l'embryogenèse somatique jusqu'au 2ème passage sur un milieu sans hormone, on n'observe aucune différence dans le développement des embryons par rapport à un témoin.

Figure 22 : Variations de l'activité nitrate réductase des embryons somatiques de Carotte, mesurée "in vivo" au cours de la croissance en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique.



- témoin
- cordycépine (2,5 $\mu\text{g/ml}$)
- /// cycloheximide (5 $\mu\text{g/ml}$)
- 6-méthyl purine (7,5 $\mu\text{g/ml}$)

L'intervalle de confiance est calculé au risque de 5 % (n =4).

E. - Action d'inhibiteurs de la synthèse protéique

Dans le but d'étudier l'inductibilité de la nitrate réductase, nous avons fait agir des inhibiteurs de la synthèse protéique sur des embryons somatiques qui sont soumis à un 2ème passage dans un milieu dépourvu en auxine :

- la cordycépine (7,5 µg/ml) qui inhibe la polyadénylation des ARN messagers

- la 6-méthyl purine (2,5 µg/ml) qui inhibe la transcription de tous les ARN.

- la cycloheximide (5 µg/ml) qui bloque l'initiation des chaînes peptidiques en inhibant la progression des ARN messagers le long des polysomes et empêche donc la traduction des messagers.

1 - Action des inhibiteurs sur l'activité nitrate réductase

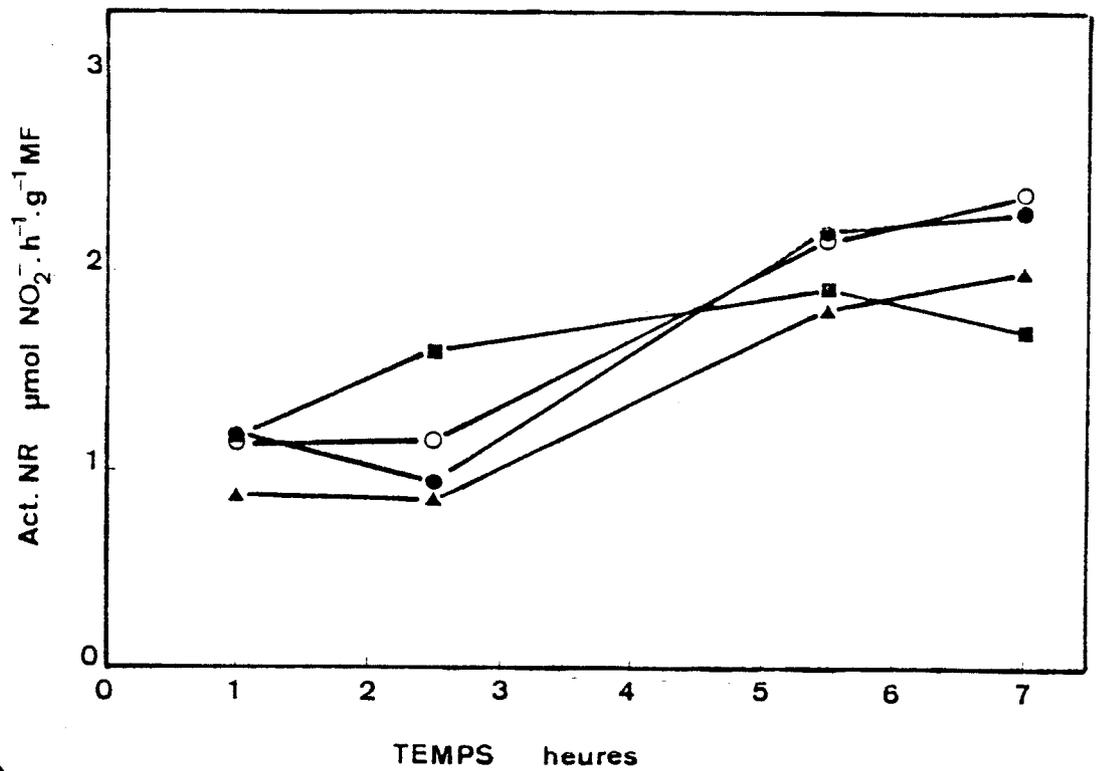
Les inhibiteurs peuvent être incorporés au moment de l'ensemencement, 1 h., 3 h. ou 5 h. après et la mesure de l'activité enzymatique se fait 48 h. après l'addition des inhibiteurs. Les résultats sont reportés figure n° 22.

Lorsque les inhibiteurs sont ajoutés 48 h. après le début de la culture, les mesures d'activité se font 1 h., 2 h. 30, 5 h 30 et 7 h. après leur incorporation. Les résultats sont reportés figure n° 23 (p. 87).

L'incorporation de la 6-méthyl purine au moment du repiquage, 1 h., 3 h. ou 5 h après inhibe fortement l'activité enzymatique (cf. figure n° 22).

La cycloheximide provoque toujours une inhibition, mais moindre que celle due à la 6-méthyl purine. Ceci peut être dû simplement à un effet de concentration. Cependant l'inhibition semble constante quel que soit le moment de l'incorporation ; elle diminue légèrement lorsque l'on introduit l'inhibiteur après 5 h. de culture .

Figure 23 : Variation de l'activité nitrate réductase des embryons somatiques après l'incorporation, à 48 h. de culture, d'inhibiteurs de la synthèse protéique.



- *témoin*
- *cordycépine (2,5 μg/ml)*
- *cycloheximide (5 μg/ml)*
- ▲—▲ *6-méthyl-purine (7,5 μg/ml)*

Quant à la cordycépine, son action varie suivant le moment de son incorporation. Si on l'additionne au moment de l'ensemencement ou après 3 h. de culture, elle est inhibitrice de l'activité nitrate réductase. Si par contre on l'ajoute après 1 h. ou 5 h. de culture, son effet est tout à fait inverse, elle provoque un accroissement de l'activité nitrate réductase.

Dans le but de savoir si la nitrate réductase est synthétisée, tout au long de la culture, nous avons introduit les inhibiteurs après 48 h. de culture ; on peut suivre l'évolution de l'activité nitrate réductase (cf. figure n° 23) juste après leur addition.

Les résultats sont sensiblement identiques à ceux de l'expérience précédente. Dès le début de l'incorporation, la 6-méthyl purine inhibe l'activité et son inhibition demeure constante dans le temps.

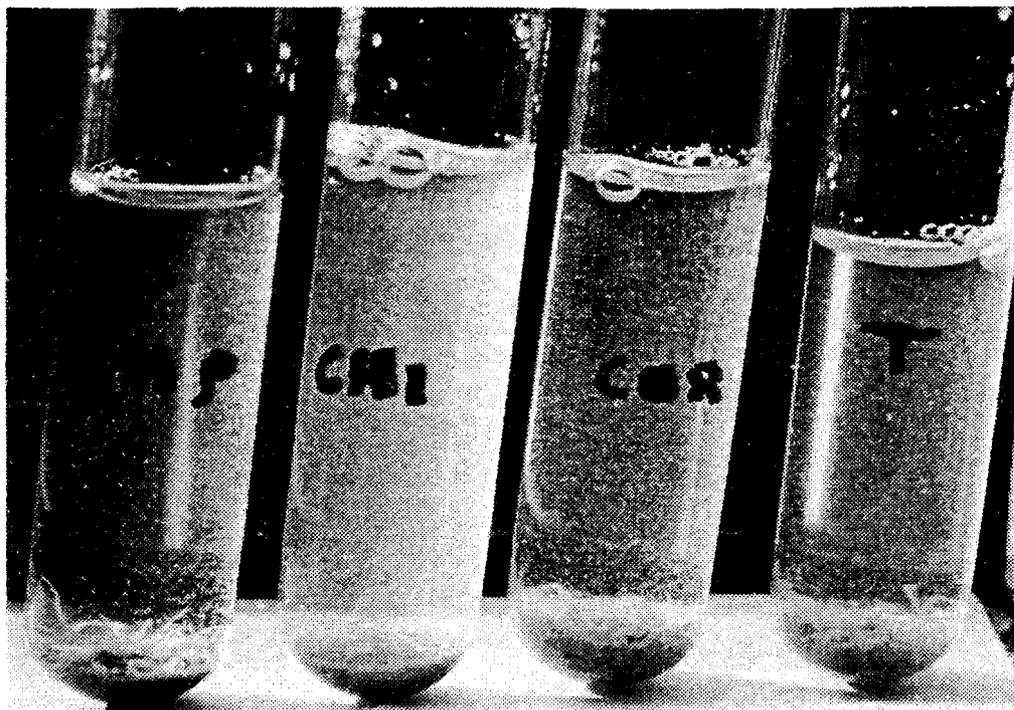
La cordycépine n'exerce pas d'action très nette, elle active et inhibe alternativement, mais à des taux très faibles.

Pour la cycloheximide, l'action est différente ; juste après son addition au milieu de culture, elle entraîne une activation de l'enzyme mais ensuite après 5 h. 30 elle provoque une inhibition qui s'accroît après 7 h. de culture.

2 - Action des inhibiteurs sur la croissance

En plus de l'action des inhibiteurs sur l'activité nitrate réductase, on peut étudier l'évolution de la croissance des embryons qui sont pesés après 5 jours de culture. Les embryons sont cultivés dans des tubes et les différentes cultures ont été photographiées et pesées (photo n° 7 et tableau n° 12, p. 89).

Photo 7 : Aspect général des cultures en tubes en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique.



T = Témoin
6-MP = 6-méthyl purine
CHI = cycloheximide
CORD = cordycépine



Tableau n° 12 : Variation de la croissance exprimée en poids de MF dans les cultures d'embryons somatiques cultivés en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique.

	témoin	cordycépine (7,5 µg/ml)	cycloheximide (5 µg/ml)	6-méthyl purine (2,5 µg/ml)
poids de MF en mg	397 ± 59	579 ± 27	338 ± 21	237 ± 15

On observe de fortes variations dans les poids de matière fraîche selon que l'on mette un inhibiteur ou pas, et selon la nature de l'inhibiteur.

La 6-méthyl purine inhibe la croissance des embryons somatiques, on obtient une moyenne de 237 mg par tube de culture alors que l'ensemble des embryons témoins pèse 397 mg. Ces observations sont confirmées par les photographies. La comparaison du témoin (photo n°8)* avec les embryons mis en présence de 6-méthyl purine (photo n° 9)* révèle une très nette différence, aussi bien dans la taille des embryons que dans les stades de développement : en présence de 6-méthylpurine. les embryons sont très petits, leur croissance semble arrêtée, leur coloration brune est sans doute le signe qu'un grand nombre d'entre eux sont morts.

La cycloheximide n'inhibe que très peu la croissance en poids de matière fraîche, mais l'observation des photographies (photo n°10)* montre très nettement qu'il existe un grand nombre de formes dédifférenciées, qui ressemblent à des cals. Peut-être l'inhibition de protéines embryogènes par la cycloheximide provoque t-elle une dédifférenciation des embryons en cals dont certains semblent nécrosés. Quant à la cordycépine, elle active fortement la croissance bien que son effet sur l'activité nitrate réductase ne fût pas très net. De plus l'observation à la loupe binoculaire (photo n° 11)* montre des formes plus différenciées que chez les témoins ; les formes qui possèdent des ébauches foliaires et des cotylédons sont en effet nettement plus abondantes et aucune trace de nécrose n'est discernable ; les embryons sont en effet très chlorophylliens.

* photos n° 8, 9, 10 et 11, cf p. 91 - 92 .

Vues à la loupe binoculaire (obj. x 2) d'embryons au 3ème passage dans un milieu sans hormone après 5 jours de culture, en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique.

Photo 8 : témoin

Photo 9 : embryons cultivés en présence de 6-méthyl purine

Photo 10 : embryons cultivés en présence de cycloheximide

Photo 11 : embryons cultivés en présence de cordycépine



Photo 8

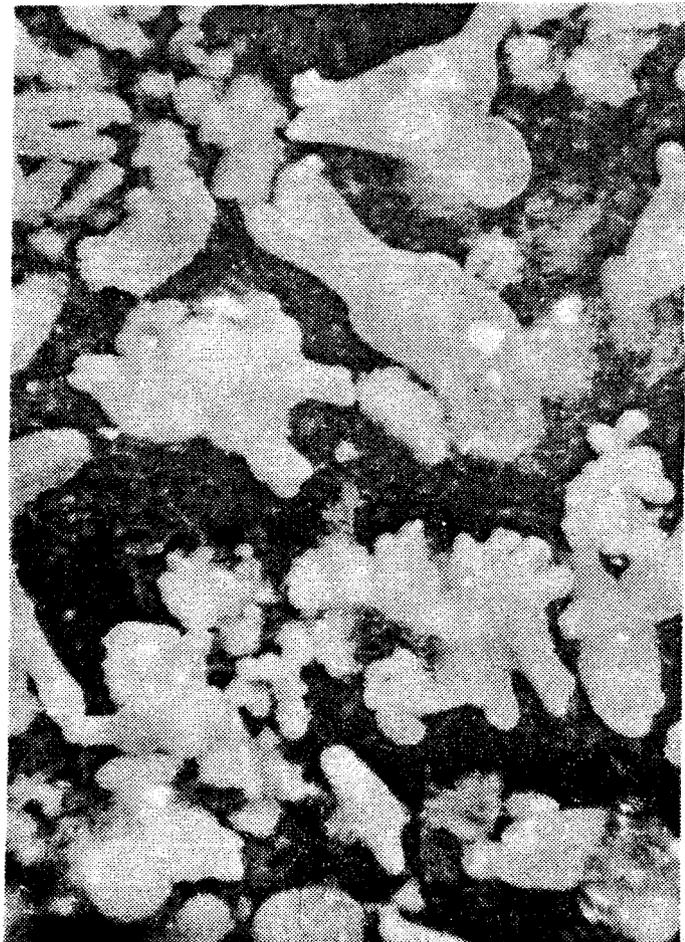


Photo 9

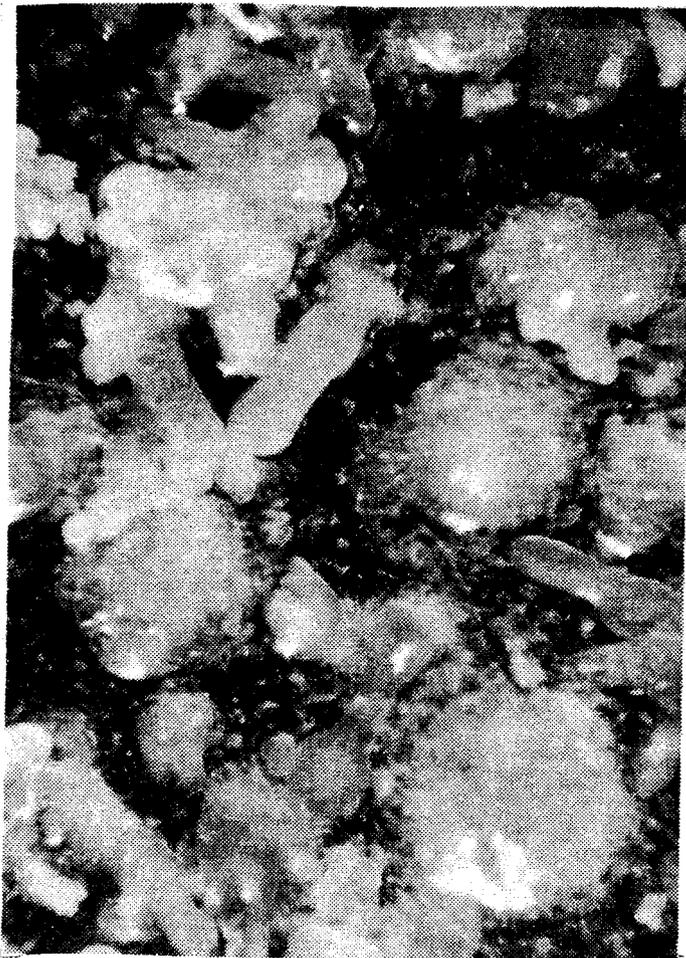


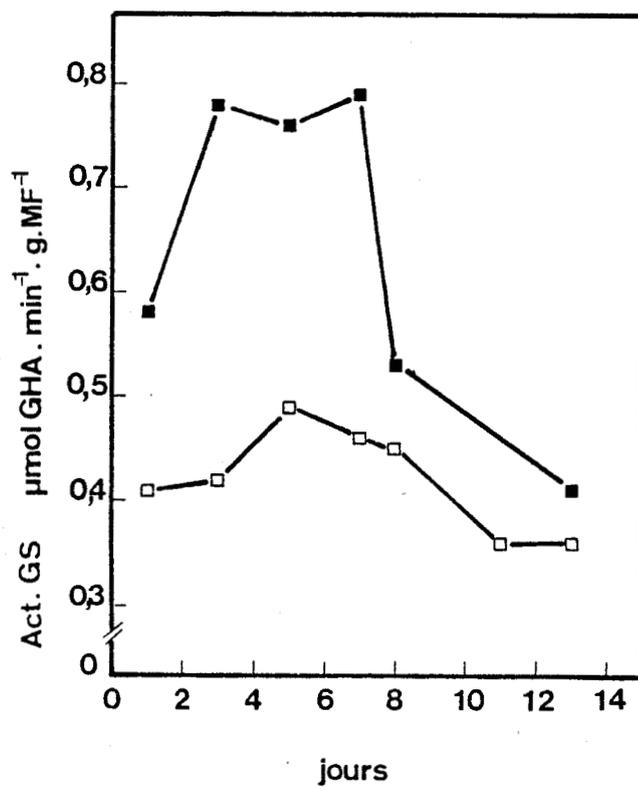
Photo 10



Photo 11



Figure 24 : Variations de l'activité GS des cellules et embryons somatiques de Carotte au cours de la croissance.



- — ■ *cellules*
- — □ *embryons somatiques (2ème passage dans un milieu sans hormone)*

F. - Etude de la glutamine synthétase et de la glutamate déshydrogénase

1 - Etude enzymatique de l'activité GS chez les cellules et les embryons de Carotte.

Afin d'étudier les variations de l'activité GS au cours de la croissance et du développement des cellules et des embryons somatiques de *Daucus carota*, le matériel végétal est prélevé tous les deux jours, congelé par de l'azote liquide et conservé au congélateur à -20° C.

Les activités enzymatiques sont mesurées dans des extraits bruts confectionnés tous en même temps à la fin du cycle de croissance.

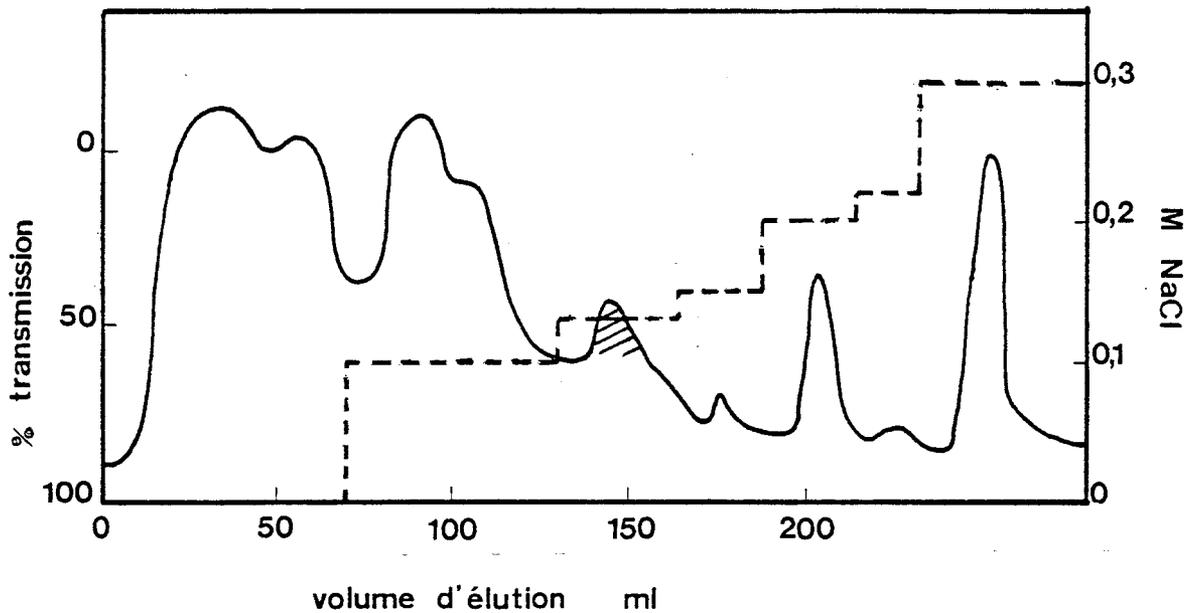
Les résultats sont reportés figure n° 24.

L'activité GS augmente dès le début du cycle de croissance des cellules, puis reste stable jusqu'au 8ème jour de culture, ensuite elle diminue brutalement.

Chez les embryons l'activité reste très faible tout au long de la culture, mais présente néanmoins un léger pic d'activité vers le 5ème jour.

La GS peut exister sous plusieurs formes et notamment deux formes qui ont des localisations cellulaires différentes ; l'une cytoplasmique se rencontre très souvent dans les cultures des cellules ; l'autre chloroplastique. Comme les embryons sont chlorophylliens mais que les cellules ne contiennent pas de chlorophylle, il importait donc de savoir si l'activité mesurée correspondait à une ou plusieurs formes de la GS. Aussi des chromatographies sur DEAE-cellulose ont elles été effectuées en utilisant des gradients discontinus de NaCl de 0 à 0,3 M. Les résultats sont reportés figure n° 25 et 26 (p. 95).

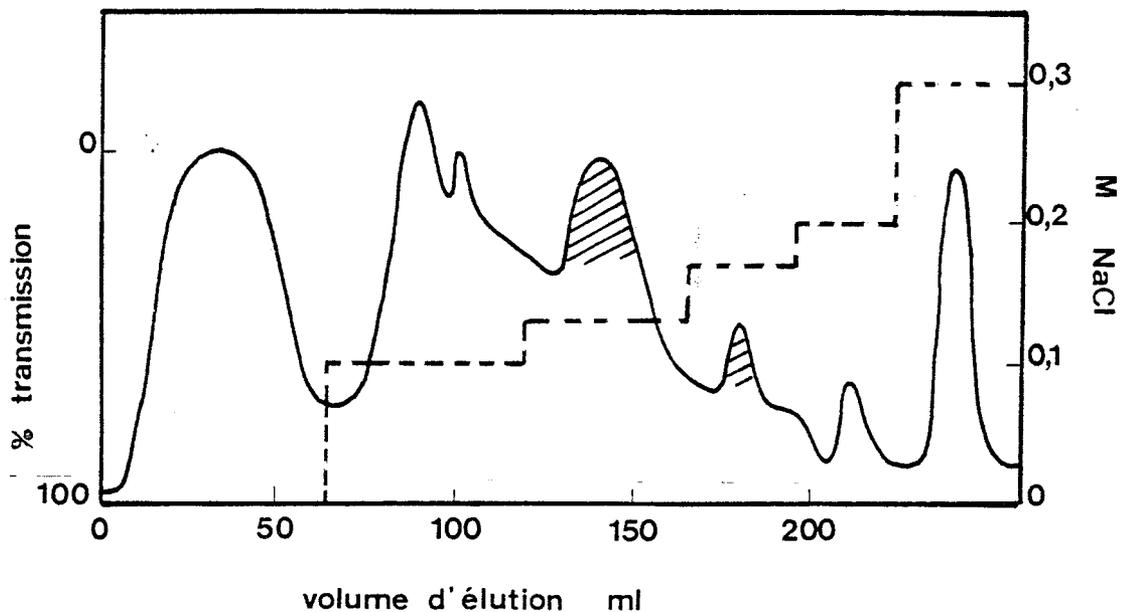
Figure 25 : Chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose d'un extrait brut de cellules de Carotte.



*Elution par un gradient discontinu en NaCl
La DO des fractions est lue à 280 nm.*

Le pic hachuré est celui qui contient l'activité GS.

Figure 26 : Chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose d'un extrait brut d'embryons somatiques de Carotte.



*Elution par un gradient discontinu en NaCl
La DO des fractions est lue à 280 nm.*

Le pic hachuré est celui qui contient l'activité GS.

Pour les cellules, l'activité se retrouve dans une fraction unique (figure n°25) qui correspond à une élution par du tampon contenant du NaCl 0,13 M. L'activité globale correspond donc en fait à une seule forme de l'enzyme.

Pour les embryons somatiques, deux fractions présentent une activité enzymatique. La première éluee par du tampon renfermant du NaCl 0,13 M présente une forte activité et correspond sans doute à la même forme que celle présente dans les cellules. La seconde est éluee par du tampon contenant du NaCl 0,17 M, mais son activité est très faible, elle correspond sans doute à une forme chloroplastique très instable.

Afin de conserver une bonne activité après chromatographie, il serait nécessaire d'entreprendre une étude détaillée des conditions d'extraction de l'enzyme : composition du tampon d'extraction, emploi de protecteurs adéquats, temps de broyage nécessaire à la rupture des chloroplastes.

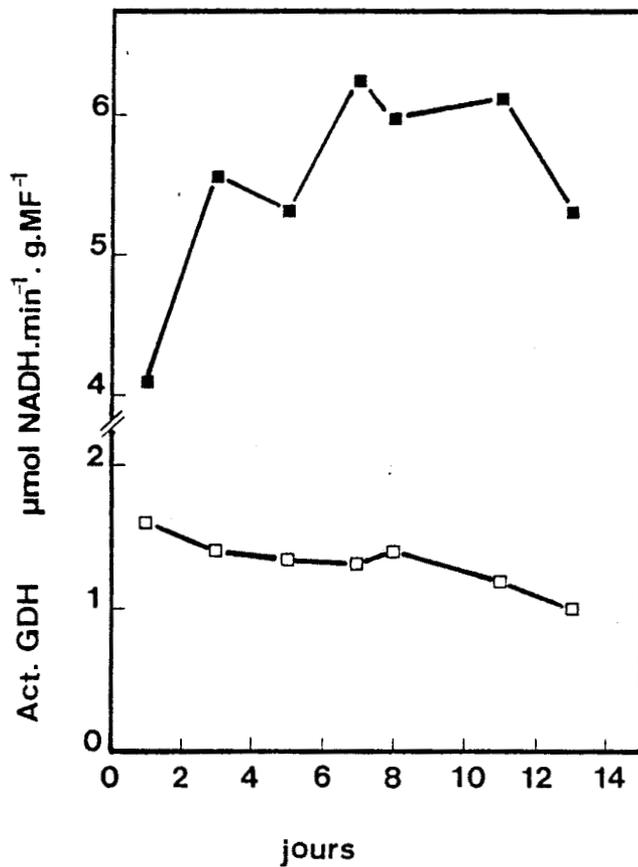
2 - Etude enzymatique de la GDH des cellules et des embryons somatiques de Carotte.

Les activités enzymatiques sont mesurées tous les deux jours (figure n° 27, p. 97), une grande différence s'observe également entre les cellules et les embryons somatiques.

Chez les cellules, l'activité reste très élevée durant toute la culture, alors que chez les embryons elle demeure faible et stable.

Comme les profils d'activité (figure n° 27, p. 97) sont très dissemblables, il paraît important de vérifier si les différences observées chez les cellules et les embryons sont liées à la présence ou non de formes différentes de la GDH.

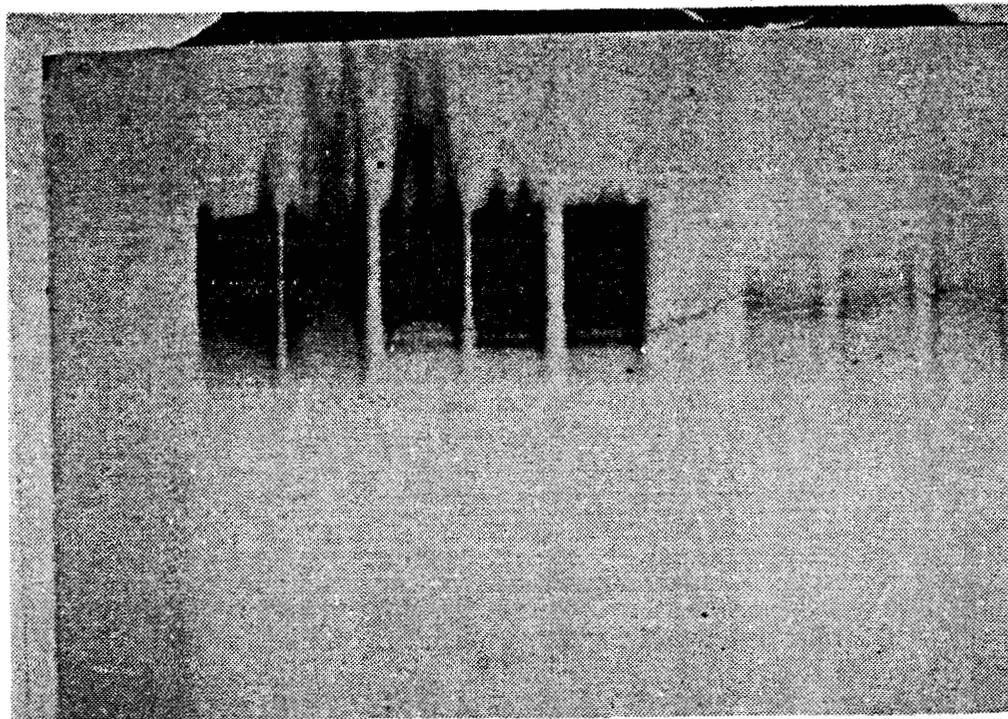
Figure 27 : Variations de l'activité GDH des cellules et embryons somatiques de Carotte, au cours de la croissance.



■—■ *cellules*
□—□ *embryons somatiques (2ème passage dans un milieu sans hormone).*

Les zymogrammes des extraits analysés en électrophorèse sur gel de polyacrylamide montrent l'existence d'isoformes identiques dans les deux types d'extraits ; mais leur nombre et leur activité est nettement plus faible chez les embryons (photo n° 12 et schéma n° 5, p. 99).

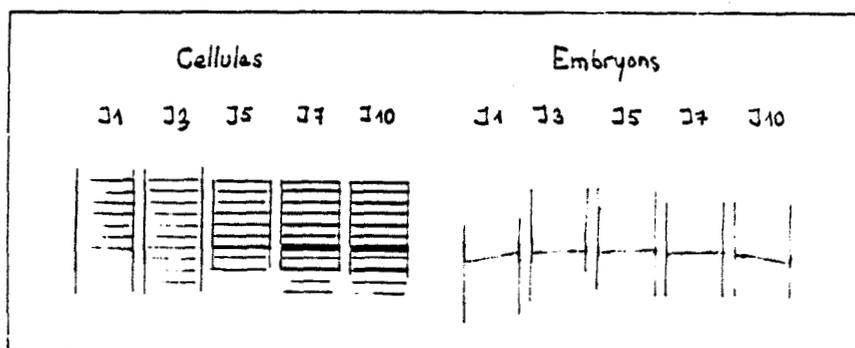
Photo 12 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide d'extraits d'embryons et de cellules de Carotte prélevés à des stades de croissance différents.



L'activité GDH est mise en évidence par les sels de tétrazolium.



Schéma 5 : Révélation de l'activité GDH par les sels de tétrazolium en électrophorèse sur gel de polyacrylamide.



Chez les cellules 11 bandes sont visibles surtout aux 5ème, 7ème et 10ème jours de culture.

Elles paraissent plus intenses aux 7ème et 10ème jours de culture.

Par contre chez les embryons aucune bande n'est décelable, seule une coloration plus accentuée nous permet de situer la GDH sur l'électrophorèse.

J : Jour

DISCUSSION

A. - Aspects méthodologiques - mesure de l'activité nitrate réductase.

Deux techniques de mesure ont été utilisées au cours de nos recherches ; la méthode de mesure "in vivo", effectuée sur des cellules ou des fragments d'organes (FERRARI et VARNER, 1971 ; JAWORSKI, 1971) donne de la réaction de réduction, une image réelle. Elle permet d'évaluer le nitrite formé dans les cellules ou dans les tissus maintenus en anaérobiose dans un milieu d'incubation liquide et à l'obscurité (HEUER et PLAUT, 1978). L'une des critiques avancée à l'encontre de la méthode de mesure "in vivo", est l'incorporation du propanol au milieu d'incubation. L'effet du propanol est controversé, DORCHIES (1984) et YONEYAMA (1981) observent que l'apport de propanol au milieu d'incubation, ne modifie pas l'activité.

Le propanol a en effet été utilisé parce qu'il modifie la perméabilité membranaire, ce qui permet un meilleur efflux du nitrite formé. Cependant il peut aussi provoquer une fuite de nitrate du pool de stockage vacuolaire, vers le pool métabolique en modifiant la perméabilité du tonoplaste (FERRARI et Col., 1973) ce qui se traduit par un accroissement de l'activité de réduction. C'est d'ailleurs ce que nous avons observé chez les cellules et les embryons de Carotte qui ne réagissent cependant pas de la même façon. Pour les cellules, l'effet du propanol est moins prononcé que pour les embryons, l'omission du propanol du tampon d'incubation provoque une baisse d'activité de 39 %, on retrouve donc 61 % de l'activité de départ alors que chez les embryons on ne retrouve que 19 % et la diminution d'activité est donc de 81 %. La méthode de mesure "in vitro", qui utilise des broyats cellulaires ou tissulaires, ne rend pas nécessairement compte de la réaction de réduction du nitrate dans les cellules et les tissus (BRUNETTI et HAGEMAN, 1976). Les composants nécessaires à la réaction enzymatique sont mis en contact alors que dans les cellules, ils peuvent être localisés dans des compartiments cellulaires différents.

Cette méthode représente la capacité de réaction maximale de l'enzyme présente dans les cellules mais la présence de phénols inactivateurs et autres substances telles les protéases, empêche bien souvent la mesure exacte de l'activité de réduction.

Les précautions que l'on peut prendre ne sont pas toujours efficaces et nous avons vu précédemment que la mesure "in vitro" était possible pour les cellules ; mais pour les embryons, le broyage était suivi d'une inactivation très rapide de la nitrate réductase. Cette inactivation peut être attribuée à plusieurs facteurs ; à la libération d'un inactivateur ou à l'oxydation de polyphénols qui semblent être en grande quantité dans les embryons ou les plantules de Carotte.

En effet, en absence de toute protection contre les phénomènes oxydatifs, les extraits brunissent rapidement. Cependant lorsque l'on ajoute des protecteurs, tel le PVP, on obtient des extraits plus clairs, mais chez les embryons, l'activité est toujours nulle et chez les cellules, elle est inhibée. Il existe sans doute un inactivateur chez les embryons qui est extrait en même temps que la nitrate réductase. D'autres substances, tels le dithiothréitol ou la cystéine, protecteurs des groupements sulfhydriles, ont été ajoutés au tampon d'extraction, mais n'ont pas donné de résultats plus concluants.

Nous n'avons pas pu effectuer de mesures "in vitro" chez les embryons, seules des mesures "in vivo" ont été faites.

La purification de la nitrate réductase des embryons somatiques n'étant pas possible, nous avons entrepris de purifier la nitrate réductase des cellules.

Le procédé de purification est plus rapide et plus simple lorsque l'on utilise la chromatographie d'affinité. Mais les résultats espérés n'ont pas été obtenus. Le bleu Séphadex ne convient pas vraiment à la purification de la nitrate réductase de Carotte, puisque une partie de la quantité totale d'enzyme s'accroche par affinité sur le bleu Séphadex sans doute à cause de la concurrence avec les autres enzymes à NADH contenues dans l'extrait brut. Les fractions

éluées sélectivement par le NADH ou le NADPH n'ont que très peu d'activité enzymatique. Cette baisse d'activité est peut-être due à la perte de la NADPH:nitrate réductase qui ne s'accroche pas sur le bleu. Pourtant SOLOMONSON (1975), CAMPBELL (1978) et KUO et Col. (1980) utilisent avec succès cette méthode de purification. La nitrate réductase se lie vraisemblablement au bleu par d'autres liaisons et peut être éluée par du KCl.

Dans notre cas, la chromatographie d'affinité peut servir de première étape à un procédé plus long de purification. L'extrait élué par le KCl M peut être utilisé en chromatographie d'échanges d'ions ou d'adsorption.

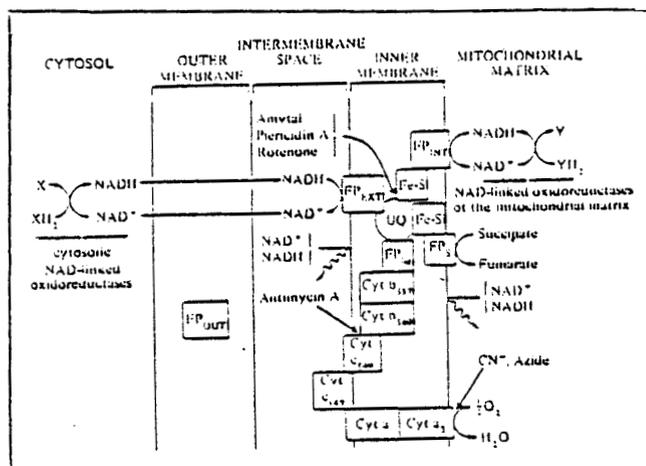
L'intérêt d'un extrait partiellement purifié c'est qu'il peut être utilisé pour la détermination des caractéristiques enzymatiques.

La détermination des valeurs de Km apparents pour les différents substrats et donneurs d'électrons de la nitrate réductase a montré que d'une manière générale, les Km pour le nitrate avec NADH ou NADPH comme donneurs d'électrons sont du même ordre que ceux que l'on peut trouver dans la littérature, soit de 10^{-4} M.

Quant aux Km NADH et Km NADPH, ils sont beaucoup plus élevés que ceux de la littérature. Nous obtenons des Km de l'ordre de 10^{-2} M à 10^{-3} M au lieu de 10^{-5} M chez les autres plantes.

De plus, la représentation de LINEWEAVER et BURK ne conduit pas à l'obtention d'une droite. Les cinétiques sont non-michaéliennes, on obtient des courbes sigmoïdales. D'après ces résultats, la nitrate réductase est plus affine pour le NADPH que pour le NADH.

Schéma 6 : Organisation probable de la chaîne respiratoire de la membrane interne d'une mitochondrie végétale



Les mitochondries végétales diffèrent des mitochondries animales en ce qu'elles possèdent une deuxième NADH déshydrogénase 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 réoxydation 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.

FP ext : "NADH déshydrogénase externe" = flavoprotéine

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

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

 : indique que la membrane est imperméable à cette molécule.

Nous ne pouvons déterminer s'il y a deux enzymes ou une seule qui utilise NADH et NADPH, car les pH optimum d'activité de réduction sont presque semblables, les Km aussi. Néanmoins il semble qu'il n'y ait pas intervention de phosphatases, contrairement à ce que pensaient WELLS et HAGEMAN (1974), puisque l'utilisation d'un mélange d'extraits bruts de Carotte et d'Épinard ne conduit pas une activité NADPH : nitrate réductase plus élevée que la somme des deux activités séparées. L'enzyme d'Épinard n'ayant pas d'activité NADPH:NR. L'activité NADPH : NR est donc vraie, mais on ne sait pas si l'enzyme est bispécifique ou si coexistent deux molécules enzymatiques distinctes présentant des spécificités particulières pour les deux donneurs d'électrons. Nous n'avons pas pu les séparer en chromatographie sur DEAE-cellulose ni en électrophorèse.

B. - L'origine du NADH

L'origine du NADH, qui sert de cofacteur à la nitrate réductase, a souvent été recherchée, mais les résultats sont divergents. Nous avons essayé de déterminer chez la Carotte sauvage, quelle source de NADH servait à la réduction du nitrate mais nous ne pouvons tirer de conclusions définitives de nos résultats.

En faisant agir l'acide malonique sur les cellules et les embryons somatiques de Carotte, nous avons observé une augmentation de l'activité nitrate réductase alors que dans les feuilles de Riz, l'acide malonique inhibe complètement l'activité nitrate réductase (RAMARAO et Col., 1981). Dans ce cas c'est bien le cycle de Krebs qui fournit du NADH à la réduction du nitrate, mais pour la Carotte on ne peut pas expliquer à quoi est due l'activation de la nitrate réductase, sauf si c'est l'activité NADPH qui est mesurée ; dans la mesure "in vivo" de l'activité de réduction tous les cofacteurs présents dans les cellules peuvent être utilisés par l'enzyme.

La roténone et l'antimycine A sont tous deux inhibiteurs du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, mais à des niveaux différents (cf. schéma n° 6) , la roténone agit sur la face

interne de la membrane intramitochondriale et empêche l'oxydation du NADH mitochondrial, tandis que l'antimycine A inhibe la chaîne respiratoire au niveau de la face externe de la membrane intramitochondriale et empêche l'oxydation du NADH mitochondrial mais aussi du NADH cytoplasmique.

Chez les cellules de *Daucus carota*, l'inhibition de l'activité nitrate réductase par la roténone et son activation par l'antimycine A nous laisse à penser que c'est le NADH cytoplasmique qui est utilisé dans la réduction du nitrate.

Ce système fonctionne sans doute à la lumière, car, d'après SAWHNEY et Col. (1978), la chaîne respiratoire est inhibée par la lumière et de ce fait du NADH est disponible.

Par l'intervention de l'iodoacétate, nous avons obtenu des inhibitions et des activations de l'activité de l'enzyme. Ce qui ne nous permet pas de déterminer, si le NADH issu de la glycolyse sert de cofacteur à la réduction du nitrate, mais on peut penser que toutes les sources de NADH sont impliquées dans cette réaction et que quand l'une des voies est bloquée, l'autre intervient.

C. - Modifications de l'activité de la nitrate réductase.

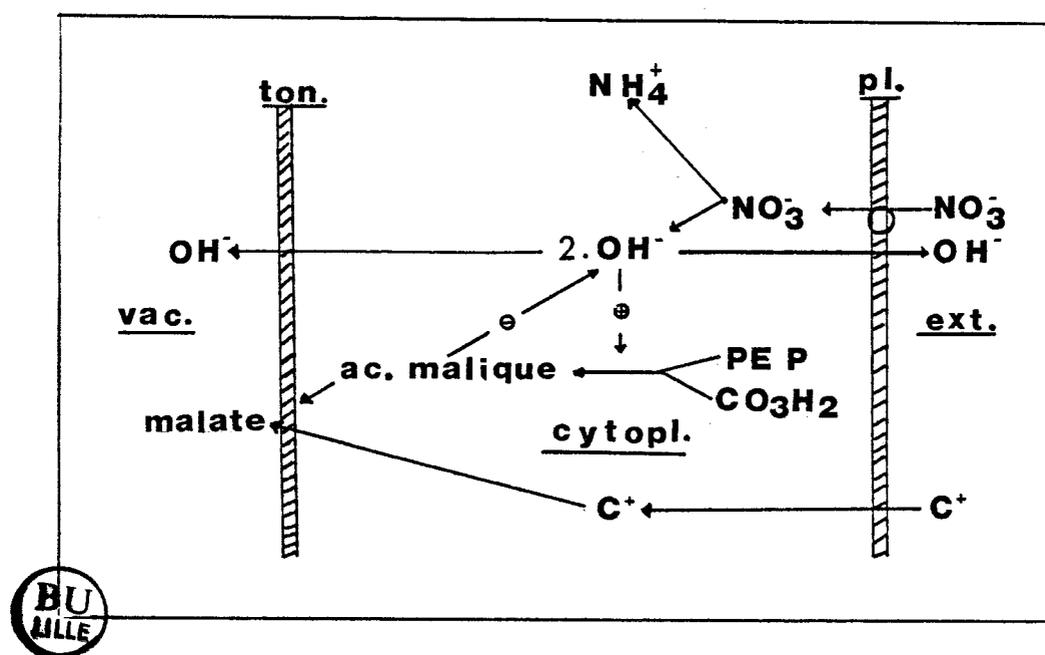
Problème de l'induction

1 - Modifications de l'activité de la nitrate réductase.

La culture "in vitro" de cellules provoque l'apparition d'une activité nitrate réductase plus ou moins élevée, et d'autres activités d'enzymes de la réduction de l'azote.

L'activité nitrate réductase se modifie au cours des cultures de cellules et d'embryons, elle apparaît après une phase de latence dont la durée est variable, elle augmente pendant la phase exponentielle de croissance, puis décroît lorsque la croissance ralentit puis s'arrête. Lorsque la phase de latence est plus longue, l'activité apparaît plus tardivement, mais elle est plus élevée.

Schéma 7 : Régulation du pH cellulaire en cours de l'absorption et de la régulation du NO_3^- d'après RAVEN et SMITH (1976)



pl : plasmalemme ; *ton* : tonoplaste ;
vac : vacuole ; *ext* : milieu extérieur

Par contre, l'emploi de l'ABA provoque une réaction inattendue, les cellules ne se divisent apparemment plus du tout avec une concentration de 10^{-4} M ; on n'observe donc pas de phase exponentielle de croissance, pourtant l'activité nitrate réductase se développe et atteint même des valeurs très élevées. Alors que la croissance est stoppée, l'activité nitrate réductase est accrue de 71 % après 7 jours de culture.

KAMADA et HARADA (1984) qui travaillent aussi chez la Carotte, observent pourtant des résultats inverses ; au cours de leurs cultures de cellules, ils observent d'abord une baisse de l'activité enzymatique puis une augmentation en fin de culture mais ces résultats contradictoires sont sans doute dus à des différences de méthodologie et notamment parce qu'ils procèdent à un ensemencement très faible qui provoque une phase de latence importante d'environ 6-7 jours, alors que nos cultures ont une phase de latence de 2-3 jours.

Le milieu sur lequel sont cultivées les cellules, renferme de l'ammonium et du nitrate. Il apparaît que le système de pH stat biochimique fonctionne (DAVIES, 1973 ; RAVEN et SMITH, 1976), lorsque l'ammonium est absorbé, il s'ensuit une alcalinisation du milieu interne des cellules qui provoque la mise en route du système de pH stat. L'ammonium en excès est éliminé soit par une action de la GDH, soit par le système de pH stat, ou sans doute les deux à la fois. L'alcalinisation provoquée par l'absorption d'ammonium entraîne une activation de la phosphoénolpyruvate carboxylase, qui conduit à la formation d'acide pyruvique qui, par le cycle de Krebs, donne de l'acide malique. C'est l'acide malique qui par association avec l'ammonium, libère $2H^+$ et immobilise l'ammonium (cf schéma n°7).

Chez les embryons somatiques, le pH est beaucoup plus stable tout au long de la culture, il n'y a pas de phénomènes de forte acidification, puis alcalinisation du milieu comme chez les cellules. Le pH est peut être régulé à l'intérieur des embryons dans lesquels il pourrait y avoir des flux de nitrate et d'acide malique entre les différents organes de l'embryon ou de la jeune plantule.

Lorsque les cellules se différencient en embryons somatiques, leur activité enzymatique augmente. La nitrate réductase varie avec les phénomènes de différenciation. C'est très net lorsque les embryons sont séparés en fonction de leur taille. Les cellules isolées ont des activités beaucoup plus faibles que les structures embryonnaires et plus les embryons sont différenciés et de grande taille, plus l'activité augmente. Le même phénomène est observé pendant la rhizogénèse de *Phaseolus vulgaris* (BURZINSKI et Col., 1982). L'activité de réduction augmente au cours de la différenciation des racines.

Chez la Canne à sucre, les cals caulogènes ont une activité de réduction plus élevée que les cals non caulogènes (DWIDEDI et Col., 1984). Il y a donc une relation entre l'activité nitrate réductase et la caulogénèse ou la Rhizogénèse. Cette relation est retrouvée entre l'activité enzymatique et l'embryogénèse des cellules de Carotte.

Des embryons prélevés dans des fioles peuvent être cultivés sur de la gélose renfermant du nitrate de potassium. Quand ces embryons ont évolué en plantules, on peut séparer les différents organes et mesurer l'activité dans chaque partie. On retrouve la plus forte activité nitrate réductase dans les feuilles et les cotylédons ; l'activité disparaît donc, ou n'est plus détectée dans les racines et les hypocotyles. Les feuilles deviennent l'unique lieu de réduction du nitrate. Cette perte d'activité serait due selon WALLACE (1973 ; 1975) à la présence d'une protéine inactivatrice de la nitrate réductase dans les parties matures de la racine.

2 - Problème de l'induction

Le transfert des cellules dans un milieu neuf provoque une élévation du taux d'activité nitrate réductase, on peut penser que l'enzyme est soit synthétisée, soit activée lors de la mise en culture.

L'incorporation dans les cultures, d'inhibiteurs de la transcription et de la traduction tels, la 6-méthyl purine, la cycloheximide et la cordycépine, a donné des résultats qui ne nous permettent pas vraiment de déterminer si l'enzyme est synthétisée "de novo" ou si elle est activée.

La 6-méthyl purine, inhibe la transcription de tous les ARN, si on l'applique dans nos cultures, elle inhibe l'activité nitrate réductase. Seules des méthodes immunochimiques permettraient de savoir si l'enzyme est activée où si elle est synthétisée .

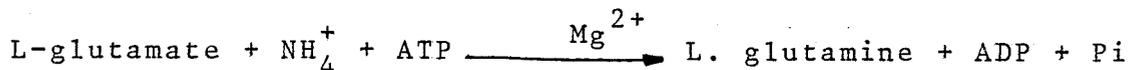
La cycloheximide, inhibitrice de la traduction n'agit que faiblement sur l'activité nitrate réductase. De plus l'aspect des embryons (photo n° 10, p. 91 et 92) nous fait penser que la cycloheximide inhibe peut être la synthèse des protéines embryonnaires décrites par SUNG et OKIMOTO (1980). En effet, en l'absence de ces protéines, les embryons se dédifférencient en cals.

La cordycépine qui active ou inhibe selon que l'on l'incorpore à des moments différents, agit sur la polyadénylation des ARN messagers. D'après la photo 11, p. 91 et 92, les embryons qui ont été soumis à la cordycépine sont plus différenciés. Si la polyadénylation de certains ARN messagers est effectivement bloquée, cela signifie que les protéines qui continuent à être synthétisées au cours de la différenciation ne sont pas traduites d'ARN messagers polyadénylés, alors que la 6-méthyl purine bloque toute différenciation et toute activité enzymatique. Les ARN messagers des protéines embryonnaires décrites par SUNG et OKIMOTO (1980) ne seraient pas polyadénylés , ceux de la nitrate réductase sans doute pas non plus.

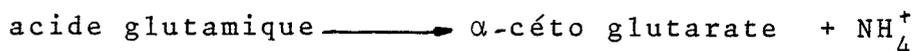
D. - Etude des enzymes assimilatrices de l'ammonium

L'incorporation des composés azotés passe par 3 étapes principales. La première permettant l'assimilation des nitrates est catalysée par la nitrate réductase (E.C.1.6.6.2.), les nitrites formés sont ensuite réduits par la nitrite réductase (E.C.1.7.99.3) en ammoniacque qui peut être incorporé directement dans les molécules organiques.

Cette incorporation, qui constitue la troisième étape, peut être directe, sans passer par les deux premières, quand l'ion ammonium est apporté directement à la plante. Elle est catalysée par la glutamine synthétase (E.C.6.3.1.2) qui effectue la réaction :



Le transfert du groupe aminé peut être ensuite effectué par la glutamate synthase (E.C.1.4.7.1.) . La voie GS-glutamate synthase est considérée à l'heure actuelle comme essentielle pour l'assimilation de l'azote chez les végétaux (MIFLIN et LEA, 1976). Cependant une autre enzyme, la glutamate déshydrogénase (E.C.1.4.1.2.) a été longtemps considérée comme la voie préférentielle de l'assimilation de l'ammoniaque (SIMS et FOLKES, 1964). A l'heure actuelle son rôle est très controversé car des études ont montré que cette voie n'était pas prépondérante chez les végétaux (MIFLIN et LEA, 1986) et qu'elle fonctionne plutôt dans le sens oxydatif :



Après la nitrate réductase, nous avons entrepris l'étude de la GS et de la GDH des cellules et des embryons somatiques de Carotte sauvage.

Les cinétiques d'activités enzymatiques montrent que GS et GDH ont toutes deux une activité assez élevée chez les cellules tout au long de la culture mais cette activité devient très faible quand il s'agit d'embryons somatiques.

Des études effectuées chez d'autres plantes ont montré que la GS n'était pas représentée par une seule protéine mais pas trois formes isofonctionnelles de l'enzyme. Chez le Riz (HIREL, 1980). La première de ces formes a été nommée GS_R , elle est spécifiquement racinaire, les deux autres nommées GS_1 et GS_2 sont des enzymes typiquement foliaires. GS_1 est située dans le cytosol et GS_2 dans les chloroplastes et les étioplastés. Il existe donc dans ce cas des formes cytoplasmiques et une forme chloroplastique.

Comme les cellules de Carotte ne sont pas chlorophylliennes, mais que les embryons le sont, il était nécessaire d'essayer de caractériser la GS dans les deux cultures.

La GS des cellules ne présente qu'une seule forme décelable, qui de par sa position sur l'élutogramme obtenu après chromatographie sur DEAE-cellulose, serait cytoplasmique. Par contre, chez les embryons, on retrouve cette forme cytoplasmique, mais une autre forme est éluee à une autre position sur l'élutogramme, elle est très faible, c'est vraisemblablement la GS chloroplastique.

Chez les végétaux, la GDH peut être représentée par 7 iso-enzymes (NAGEL et HARTMANN, 1980) et on en a même démontré 28 dans le cas du pollen de Luzerne. Ces formes résulteraient de l'association au hasard de 2 ou 3 sous-unités formant une enzyme hexamérique (DE VIENNE, 1983). Chez les cellules de Carotte, on peut démontrer environ 10 isoenzymes par électrophorèse en gel de polyacrylamide, les iso-enzymes sont présentes tout au long de la culture, mais chez les embryons on observe les mêmes isoenzymes, mais l'intensité de la coloration par les sels de tétrazolium est très faible.

CONCLUSION

La nitrate réductase de *Daucus carota L.* est bispécifique pour le donneur d'électrons et correspond à la NAD(P)H: NR, mais nos travaux n'ont pas déterminé si les deux formes sont distinctes ou si c'est la même enzyme qui peut utiliser NADH et NADPH. La présence de substances inhibitrices dans les extraits d'embryons somatiques ne nous a pas permis de faire des mesures "in vitro", ni de procéder à une purification. Par conséquent on ne peut savoir si la nitrate réductase des embryons est la même que celle des cellules.

La purification est possible chez les cellules par des techniques traditionnelles mais aussi par des chromatographies d'affinité ; nous avons obtenu des taux de purification satisfaisants. Cependant, la liaison vraisemblable de la nitrate réductase à des structures membranaires, ne nous a pas permis de montrer la pureté de l'enzyme en électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

L'étude de la nitrate réductase au cours de l'embryogenèse nous a permis de montrer qu'il existe une relation entre l'activité de réduction et le stade de différenciation des embryons. Plus les embryons sont différenciés, plus l'activité nitrate réductase est élevée. De plus, l'action des inhibiteurs de la synthèse protéique nous fait penser que les protéines embryonnaires décrites par SUNG et OKIMOTO (1981) existent.

BIBLIOGRAPHIE

- AMY, N.K. and GARRETT, R.H., 1974. - Purification and characterization of the nitrate reductase from the diatom Thalassiosira pseudonana.
Plant Physiol., 54, 629-637.

- BACKS-HUSEMANN D. and REINERT, J., 1970. - Embryobildung durch isolierte Einzellen aus gewebekulturen von Daucus carota.
Protoplasms, 70, 19-24.

- BANERJEE, S. and GUPTA, S., 1976. - Embryogenesis and differentiation in Nigella sativa leaf callus in vitro.
Physiol. Plant., 38 (2), 115-120.

- BEEVERS, L., FLESHER, D. and HAGEMAN, R.H., 1964. - - Studies on the pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase in higher plants and its relationship to sulfhydryl level.
Biochim. Biophys. Acta, 89, 453-464.

- BLAHOVA, H. and SEGETA, V., 1980. - Nitrate reductase activity in the course of Cucumber leaf ontogenesis.
Biologia plantarum (Praha), 22 (3), 176-182.

- BONNER, J.A., 1965. - Development. In : BONNER, J.A. and VARNER, J.E (eds).
Plant Biochem., 850-856, Acad. Press, New York.

- BOTTI, C. and VASIL, I.K., 1984. - Ontogeny of somatic embryos of Pennisetum americanum. II. In cultured immature inflorescences.
Can. J. Bot., 62, 1629-1635.

- BÖHME, H. J., KOPPERSCHLAGER, G., SCHULZ, J and HOFMANN, E., 1972. - Affinity chromatography of phosphofructokinase using Cibacron blue F 3 G-A.
J. Chromatogr., 69, 209-214.

- BRADFORD, M., 1976 - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem., 72, 248-254.

- BRUNETTI, N. and HAGEMAN, R.H., 1976. - Comparison of in vivo and in vitro assays of nitrate reductase in Wheat (Triticum aestivum L.) seedlings.
Plant Physiol., 58, 583-587.
- BUCZEK, J., 1984. - The occurrence of a nitrate reductase inactivating factor in extracts of Spirodela polyrrhiza.
Acta Soc. Bot. Poloniae, 53, (3) 411-417.
- BURZYNSKI, M., KUBIK-DOBOSZ, G., STOLARCZYK, A., TERYKS, D. and BUCZEK, J., 1982. - Changes in the activities of some nitrogen metabolism enzymes during rooting of Phaseolus vulgaris cuttings.
Acta Physiologia Plantarum, 4 (1-2), 21-29.
- CAMPBELL, J. M. and WRAY, J.L., 1983. - Purification of Barley nitrate reductase and demonstration and nicked subunits.
Phytochem., 22, 2375-2382.
- CAMPBELL, W. H., 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.
Zeitschrift Pflanzenphysiol., 88 (4), 357-361.
- CAMPBELL, W.H. and SMARELLI, J., 1978. - Purification and kinetics of higher plant NADH : nitrate reductase.
Plant Physiol., 61, 611-616.
- CANVIN, D.T. and ATKINS, C.A., 1974. - Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves : effect of light, carbon dioxide and oxygen.
Planta, 116, 207-224.
- CATTOIR-REYNAERTS, A., DEGRYSE, E., VERBRUGGEN, I. and JACOBS, M., 1983. - Selection and characterization of Carrot embryoid cultures resistant to inhibition by lysine plus threonine.
Biochem. Physiol. Pflanzen, 178, 81-90.

- CHIKWEM, J.O. and DOWNEY, R.J., 1982. - Purification and characterization of the respiratory nitrate reductase of Bacillus stearothermophilus.
Anal. Biochem., 126, 74-80.

- DAVIES, D.D., 1973. - Control of and by pH .
Symp. Soc. Exp. Biol., 27, 513-514.

- DAVIS, B. J., 1964. - Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins.
Ann. New York Acad. Sci., 121, 404-427.

- DAVISON, I. R., ANDREWS, M. and STEWART, W.D.P., 1984. - Regulation of growth in Laminaria digitata: use of in vivo nitrate reductase activities as an indicator of nitrogen limitation in field population of Laminaria sp.
Marine Biol., 84, 207-217.

- DAYLEY, F.A., KUO, T. and WARNER, R.L., 1982. - Pyridine nucleotide specificity of Barley nitrate reductase.
Plant Physiol., 69, 1196-1199.

- DE LA ROSA, M.A., DIEZ, J., VEGA, J.M. and LOSADA, M., 1980. - Purification and properties of assimilatory nitrate reductase |NAD(P)H| from Ankistrodesmus braunii.
Eur. J. Biochem., 106, 249-256.

- DE VIENNE, P., 1983. - La glutamate déshydrogénase de Luzerne : aspects cytologiques, structuraux et évolutifs.
Can. J. Genet. Cytol., 25, 146-160.

- DORCHIES, V., 1984. - Activité de la nitrate réductase de Cychorium intybus : étude a différents stades de développement de la plante et dans les tissus cultivés in vitro.
Thèse 3ème cycle. Université Lille I.

- DORION, N., GODIN, B. et BIGOT, C., 1984. - Embryogenèse somatique à partir de cultures issues de protoplastes foliaires de Ranunculus sceleratus.
Can. J. Bot., 62, 2345-2355.

- DOWNEY, R.J., 1971. - Characterization of the reduced nicotinamide adenine nucleotide phosphate nitrate reductase of Aspergillus nidulans.
J. Bacteriol., 105 (3), 759-768.

- DREW, R. L. K., 1979. - The development of Carrot (Daucus carota L.) embryoids (derived from cell suspension culture) into plantlets on a sugar-free basal medium.
Hort. Res., 19, 79-84.

- DUDEL, G., KOHL, J. G., 1974. - Über die verteilung der Nitrate-reduktaseaktivität in wurzel und blatt bei Hordeum vulgare L. und ihre Abhängigkeit vom exogenen nitratangebot.
Arch. Acker und Pflanzenban Bodenkunde (Berlin), 18, 233-242.

- DWIDEDI, V.N., KHAN, B.N. , RAWAL, S.K. and MASCARENHAS, A.F., 1984. - Biochemical aspects of shoot differenciation in Sugarcane callus I. Nitrogen assimilating enzymes.
J. Plant Physiol., 117, 7-15.

- EVANS, H. J. and NASON, A., 1953. - Pyridine nucleotide nitrate reductase from extracts of higher plants.
Plant Physiol., 28, 233-254.

- FERRARI, T.E. and VARNER, J.E., 1971. - Intact tissue assay for nitrate reductase in Barley aleurone layers.
Plant Physiol., 47, 790-794.

- FERRARI, T.E., YODER, O.C. and FILNER, P., 1973. - Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues : evidence for two nitrite pools.
Plant Physiol., 51, 423-431.

- FIDO, R. J. and NOTTON, B. A., 1984. - Spinach nitrate reductase : further purification and removal of "nicked" subunits by affinity chromatography.
Plant Sci. Lett., 37, 87-91.

- FUJIMURA, T. and KOMAMINE, A., 1975. - Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a Carrot cell suspension culture.
Plant Sci. Lett., 5, 359-364.

- FUJIMURA, T. and KOMAMINE, A., 1979. - Synchronisation of somatic embryogenesis in a Carrot cell suspension culture.
Plant Physiol., 64, 162-167.

- FUJIMURA, T. and KOMAMINE, F., 1980. - The serial observation of embryogenesis in a Carrot cell suspension culture.
New Phytol., 86, 213-218.

- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. and OJIMA, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells.
Exp. Cell. Res., 50, 151-158.

- GARRETT, R.H. and NASON, A., 1969. - Further purification and properties of Neurospora nitrate reductase.
J. Biol. Chem. , 244(11), 2870-2882.

- GASPARIKOVA, O., PSENAKOVA, T. and NIZNANSKA, A., 1976. - Influence of various nitrogen sources of the activity of nitrate and nitrite reductases and glutamate deshydrogenase in Zea mays roots.
Biologia, 31, 527-535.

- GUPTA, P.K., KENDURKAR, S.V., KULKARNI, V.M., SHIRGURKAR, M.V. and MASCARENHAS, A.F., 1984. - Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of Coconut (Cocos nucifera L.) in vitro.
Plant Cell. Reports, 3, 322-325.

- HAGEMAN, R.H. and HUCKLESBY, D.P., 1971. - Nitrate reductase from higher plants.
Methods enzymol., 23, 495-522.

- HALPERIN, W., 1966. - Alternative morphogenetic events in cell suspensions.
Amer. J. Bot., 53, 443-453.

- HALPERIN, W. and JENSEN, W.A., 1967. - Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in Carrot cell cultures.
J. Ultrastr., 18, 428-443.

- HALPERIN, W. and WETHERELL, D.F., 1965. - Ammonium requirement for embryogenesis in vitro.
Nature, 205, 529-520.

- HAMANO, T., OJI, Y., MITSUHASHI, Y., MATSUKI, Y. and OKAMOTO, S., 1984. - Purification and characterization of thiol proteinase as a nitrate reductase inactivating factor from leaves of Hordeum distichum L.
Plant Cell. Physiol., 25, 419-427.

- HEAT-PAGLIUSO S., HUFFAKER, R.C. and ALLARD, R.W., 1984. - Inheritance of nitrite reductase and regulation of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamine synthetase isozymes.
Plant Physiol., 76, 353-358.

- HEUER, B. and PLAUT, E., 1978. - Reassessment of the in vivo assay for nitrate reductase in leaves.
Physiol. Plant., 43, 306-312.

- HIPKIN, C.R., AL-BASSAM, B.A. and SYRETT, P.J., 1979. - Pyridine nucleotide specificity and other properties of purified nitrate reductase from Chlorella variegata.
Planta, 144, 137-141.

- HIREL, B., 1980. - Les formes isofonctionnelles de la glutamine synthétase chez le Riz (Oriza sativa L.).
Thèse Docteur de spécialités, Université Nancy I.

- HO, W.J. and VASIL, I.K., 1983. - Somatic embryogenesis in Sugar-cane (Saccharum officinarum L.). 2. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. Protoplasma, 118, 169-180.

- IDA, S. and MIKAMI, B., 1983. - Purification and characterization of assimilatory nitrate reductase from the Cyanobacterium Plectonema boryanum. Plant Cell Physiol., 24(4), 649-658.

- JAWORSKI, E.G., 1971. - Nitrate reductase assay in intact plant tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 1274-1279.

- JESSUP, W. and FOWLER, M.W., 1977. - Inter relationships 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, 71, 71-76.

- JOLLY, S.O., CAMPBELL, W.H., and TOLBERT, N.E., 1976. - NADPH- and NADH- nitrate reductases from Soybean leaves. Arch. Biochem. Biophys., 174, 431-439.

- JONES, L. H., 1974. - Factors influencing embryogenesis in Carrot cultures (Daucus carota L.). Ann. Bot., 38, 1077-1081.

- KAISER, J. J. and LEWIS, O.A.M., 1984. - Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed Helianthus annuus L. Plant Soil, 70, 127-130.

- KAMADA, H. and 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. and HARADA, H., 1984. - Changes in nitrate reductase activity during somatic embryogenesis in Carrot. Biochem. Physiol. Pflanzen, 179, 403-410.

- KAO, K.N. and MICHAYLUK, M.R., 1981. - Embryoid formation in Alfalfa cell suspension cultures from different plants. In vitro, 17(7), 645-648.

- KATO, H., TAKEUCHI, M., 1966. - Embryogenesis from the epidermal cells of Carrot hypocotyl. Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo, 16, 245-254.

- KLEPPER, L., FLESHER, D. and HAGEMAN, R.H., 1971. - Generation of reduced NAD for nitrate reduction in green leaves. Plant Physiol., 48, 580-590.

- KONAR, R.N., THOMAS, E. and STREET, H.E., 1972a. - The diversity of morphogenesis in suspension cultures of Atropa belladonna L. Ann. Bot., 36, 249-258.

- KONAR, R.N., THOMAS, E. and STREET, H.E., 1972b. - Origine and structure of embryoïds arising from epidermal cells of the stem of Ranunculus sceleratus L. J. Cell. Sci., 11, 77-93.

- KUO, T., KLEINHOF, A. and WARNER, R.L., 1980. - Purification and partial characterization of nitrate reductase from Barley leaves. Plant Sci. Lett., 17, 371-381.

- KUO, T.M., SOMERS, D.A., KLEINHOF, A. and WARNER, R.L., 1982. - NADH -nitrate reductase in barley. Identification and amino acid composition of subunit protein. Biochim. Biophys. Acta, 708, 75-81.

- LEE, R.B., 1980. - Sources of reductant for nitrate assimilation in non photosynthetic tissue (a review). Plant Cell. Environ., 3, 65-90.

- LOOMIS, W.D. and BATAILLE, J., 1966. - Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochem., 5, 423-438.

- LOSADA, M., GUERRERO, M.G. and 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, 30-63.

- LOWE, K.H., TAYLOR, D.B., RYAN, P. and PATERSON, K.E., 1985. - Plant regeneration in a organogenesis and embryogenesis in the Maize in bred lines B73. Plant Sci., 41, 125-132.

- Mac HUGHEN, A. and SWARTZ, M., 1984. - Embryo formation in cell cultures of the legume Cyamopsis tetragonoloba (Guar). J. Plant Physiol., 117, 163-167.

- Mac WILLIAM, A.A., SMITH, S.M. and STREET, H.E., 1974. - The origin and development of embryoïds in suspension cultures of Carrot (Daucus carota). Ann. Bot., 38, 243-250.

- MIFLIN, B.J. and LEA, P.J., 1976. - The pathof ammonia assimilation in the plants kingdom. TIBS May , 103-106. -

- MURASHIGE, T. and SKOOG, F., 1962. - A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 473-497.

- NAGEL, M. and HARTMANN, T., 1980. - Glutamate deshydrogenase from Medicago sativa L. : purification and comparative kinetic studies of the organ specific multiple forms. Z. Naturforsch, 35c, 406-415.

- NASON , A. and EVANS, H.J., 1953. - Triphosphopyridine nucleotide-nitrate reductase in Neurospora. J. Biol. Chem., 202, 655-673.

- NELSON, R.S., STREIT, L. and 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.

- NOTTON, B.A., FIDO, R.J. and HEWITT, E.J., 1977. - The presence of functional haem in a higher plant nitrate reductase. *Plant. Sci. Lett.*, 8, 165-170.

- NOVAK, F.J. and KONECNA, D., 1982. - Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of Alfalfa (Medicago sativa L.) *Z. Pflanzenphysiol.*, 105, 279-284.

- OJI, Y., HAMANO, T., RYOMA, Y., MIKI, Y., WAKIUCHI, N. and OKAMOTO, S., 1985. - Purification and characterization of NADH-nitrate reductase from leaves of 2-row Barley, and its activity as affected by some metabolites. *J. Plant Physiol.*, 119, 247-256.

- OJI, Y., MIKI, Y. and OKAMOTO, S., 1982. - Extraction and affinity purification of NADH : nitrate reductase from Barley (Hordeum distichum L.) roots. *Plant Cell Physiol.*, 23(6), 1025-1031.

- O'NEAL, D. and JOY, K.W., 1973. - Glutamine synthetase of Pea leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, 159, 113-122.

- OUCHTERLONY, O., 1949. - Antigen antibody reaction in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 26, 507-517.

- PAN, S. and NASON, A., 1978. - Purification and characterization of homogeneous assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase from Neurospora crassa. *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 297-313.

- PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I. and BELFRAGE, G., 1975. - Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionating. *Nature*, 258, 598-599.

- RADIN, J.W., 1975. - Differential regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of Cotton plants.
Plant Physiol., 55, 178-182.

- RAGHAVAN, V. and TORREY, J.G., 1964. - Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the Orchid, Cattleya.
Am. J. Bot., 51, 264-274.

- RAMARAO, C.S., SRINIVASAN, and NAIK; M.S., 1982. - Origin of reductant for reduction of nitrate and nitrite in Rice and Wheat leaves in vivo.
New Phytol., 87, 517-525.

- RANGAN, T.S. and VASIL, I.K., 1983. - Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of Panicum miliaceum L. and Panicum miliare Lamk.
Z. Pflanzenphysiol., 109, 49-53.

- RAVEN, J.A. and SMITH, F.A., 1976. - Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation.
New Phytol., 76, 515-431.

- REDINBAUGH, M.G. and 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.

- REDINBAUDH, M.G. and CAMPBELL W.H., 1983. - Purification of squash NADH : nitrate reductase by zinc chelate affinity chromatography.
Plant Physiol., 71, 205-207.

- REED, A.J. and CANVIN, D.T., 1982. - Light and dark controls of nitrate reductase in Wheat (Triticum aestivum L.) protoplast.
Plant Physiol., 69, 508-513.

- REINERT, J., 1958. - Morphogenese und ihre kontrolle an gewebe-
kuluren aus Karotten
Natur wissenenschaften, 45, 344-345.

- REINERT, J., 1959. - Über die kontrolle der morphogenese und die
induction von adventiveembryonen an gewebekuluren aus Karotten .
Planta, 88, 318-333.

- REINERT, J., TAZAWA, M. and SEMENOFF, S., 1967. - Nitrogen
compounds as factors of embryogenesis in vitro.
Nature, 216, 1215-1216.

- RENOSTO, F., ORNITZ, D.M., PETERSON, D. and SEGEL, I.H., 1981. -
Nitrate reductase from Penicillium chrysogenum. Purification
and kinetic mecanism.
J. Biol. Chem., 256 (16), 8616-8625.

- ROSE, D. and MARTIN, S.M., 1974. - Parameters for growth measure-
ment in suspension cultures of plant cells.
Can. J. Bot., 2, 903-912.

- ROUSTAN, J.L., NEUBURGER, M. and FOURCY, A., 1974. - Nitrate
reductase of Maize leaves. Some properties.
Physiol. Veg., 12, 527-544.

- RUBOS, A.C., 1985. - Isolation and culture of single cells from
Carrot embryos.
Plant Sci., 38, 107-113.

- SAWHNEY, S.K., NAIK, M.S. and NICHOLAS, D.J.D., 1978. - Regulation
of nitrate reduction by light, ATP and mitochondrial respira-
tion in Wheat leaves.
Nature, 272 (5654), 647-648.

- SAWHNEY, S.K., NICHOLAS, D.J.D. and NAIK, M.S., 1979. - Accumulation of
Succinate in Wheat leaves during anaerobic nitrate reduction in
the dark.
Indian J. Biochem. Biophys., 16 (1), 37-38.

- SCHLOEMER, R.H. and GARRETT, R.H., 1973. - Partial purification of the NADH-nitrate reductase complex from Chlorella pyrenoidosa. Plant Physiol., 51, 591-593.

- SEKI-CHIBA, S. and ISHIMOTO, M., 1977. - Studies on nitrate reductase of Clostridium perfringens. J. Biochem., 82, 1663-1671.

- SHEN, T.C., FUNKHOUSER, E.A. and GUERRERO, M.F., 1976. - NADH- and NAD(P)H-nitrate reductase in Rice seedlings. Plant Physiol., 58, 292-294.

- SHERRARD, J.H. and DALLING, M.J., 1979. - In vitro stability of nitrate reductase from Wheat leaves. I. Stability of highly purified enzyme and its component activities. Plant Physiol., 63, 346-353.

- SHERRARD, J.H., KENNEDY, J.A. and DALLING, M.J., 1979. - In vitro stability of nitrate reductase from Wheat leaves. II. Isolation of factors from crude extracts which affect stability of highly purified nitrate reductase. Plant Physiol., 64, 439-444.

- SIMMONS, S.R. and MOSS, D.N., 1978. - Nitrate reductase as a factor affecting N assimilation during the grain filling period in spring wheat. Crop Sci., 18, 584-586.

- SIMS, A.P. and FOLKES, B.F., 1964. - A kinetic study of the assimilation of ¹⁵N ammonia and the synthesis of amino acids in an exponentially growing culture of Candida utilis. Proc. Roy. Soc. Bot., 159, 479-502.

- SNAPP, S., SOMERS, D.A., WARNER, R.L. and KLEINHOF, A., 1984. - Immunological comparisons of higher plants nitrate reductase. Plant Sci. Lett., 36, 13-18.

- SOLOMONSON, L.P., 1975. - Purification of NADH-nitrate reductase by affinity chromatography.
Plant Physiol., 56, 853-855.

- SOMERS, D.A., KUO, T., KLEINHOF, A. and WARNER, L., 1982. - Barley nitrate reductase contains a functional cytochrome b557.
Plant Sci. Lett., 24, 261-265.

- STEWARD, F.C., MAPES, M.O., KENT, A.E. and HOLSTEIN, R.D., 1964. - Biochemical and morphogenetic studies with cells yield new evidence on their metabolism and totipotency.
Science, 143, 20-27.

- STEWARD, F.C., MAPES, M.O. and MEARS, K., 1958. - Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells.
Am. J. Bot., 45, (10) 653-704.

- SUNG, Z.R. and OKIMOTO, R., 1981. - Embryonic proteins in somatic embryos of Carrot.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 3683-3687.

- SUZICH, J.A., RANJEVA, R., HASEGAWA, P.M. and HERMANN, K.M., 1984. - Regulation of the shikimate pathway of Carrot cells in suspension culture.
Plant Physiol., 75, 369-371.

- THOMAS, M.R. and SCOTT, K.J., 1985. - Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature embryos and immature inflorescences of Hordeum vulgare.
J. Plant Physiol., 221, 159-169.

- TISSERAT, B., ESAN, E.B. and MURASHIGE T., 1979. - Somatic embryogenesis in Angiosperms.
Hortic. Rev., 1, 1-78.

- TORELLO, W.A., SYMINGTON, A.G. and RUFNER, R., 1984. - Callus initiation plant regeneration and evidence of somatic embryogenesis in red Fescue.
Crop. Sci., 24, 1037-1040.

- TULECKE, W. and Mac GRANAHAN, G., 1985. - Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of Walnut, Juglans regia L.
Plant Sci., 40, 57-63.

- VAISHNAV, P.P., BHATT, K., SINGH, Y.P. and CHINYOY, J.J., 1978. - Nitrate reductase activity in relation to dwarfism in Sorghum bicolor (L.) Moench
Aust. J. Plant Physiol., 5, 39-43.

- VASIL, I.K., 1985. - Somatic embryogenesis and its consequences in the gramineae from tissue cultures in forestry and agriculture.
Ed. R.R. HENKE., K.W., HUGHES, M.P., Constantin and Hollaender A., (Plenum publishing corporation) 31-47.

- VASIL, V. and VASIL, I.K. 1982. - The ontogeny of somatic embryos of Pennisetum americanum (L.) K. Schum. I. in cultured immature embryos.
Bot. Gaz, 143(4), 454-465.

- WALLACE, W., 1973. - A nitrate reductase inactivating enzyme from the Maize root.
Plant Physiol., 52, 197-201.

- WALLACE, W., 1975. - A re-evaluation of the nitrate reductase content of the Maize roots.
Plant Physiol., 55, 774-777.

- WELLS, G.N. and HAGEMAN, R.H., 1974. - Specificity for nicotinamide adenine dinucleotide by nitrate reductase from leaves.
Plant Physiol., 56, 853-855.

- WETHERELL, D.F. and DOUGALL, D.K., 1976. - Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild Carrot tissue.
Physiol. Plant., 37, 97-103.

- WHITE, P.R., 1943. - A hand book of plant tissue culture.
Ronald press Co., New York, 227.

- WOO, K.C., JOKINEN, M. and 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, 433-436.

- WRAY, J.L. and KIRK, D.W., 1981. - Inhibition of NADH-nitrate reductase degradation in Barley leaf extracts by leupeptin.
Plant Sci. Lett., 23, 207-213.

- YAMAHA, T., OHIRA, L., 1976. - Nitrate reductase inactivating factor from Rice cells in suspension cultures.
Plant Cell Physiol., 17, 633-641.

- YONEYAMA, T., 1981. - ^{15}N studies on the in vivo assay of nitrate reductase in leaves : occurrence of under-estimation of the activity due to dark assimilation of nitrate and nitrite.
Plant Cell Physiol., 22, 1507-1520.

RESUME

La nitrate réductase extraite des cellules de Carotte sauvage cultivées en suspension, présente une bispécificité vis à vis du donneur d'électrons, elle peut utiliser NADH et NADPH et les constantes d'affinité sont du même ordre de grandeur, avec cependant une plus grande affinité pour le NADPH ($K_m = 3,8.10^{-3}M$) que pour le NADH ($K_m = 1,5.10^{-2}M$). L'étude de l'origine du NADH nous fait penser qu'elle est multiple ; il peut provenir de la glycolyse ou du cycle de Krebs.

La purification de la nitrate réductase par chromatographie d'affinité sur bleu Séphadex nous a fourni une préparation enzymatique purifiée 756 fois mais avec un rendement en activité très faible.

L'étude de cette enzyme au cours de l'évolution des cellules en embryons somatiques, a montré que l'augmentation de l'activité nitrate réductase était liée au phénomène d'embryogenèse somatique. L'induction par du nitrate de potassium chez des plantules de Carotte issues d'embryons somatiques permet de localiser la nitrate réductase dans les parties chlorophylliennes de la plantule : les cotylédons et les premières feuilles.

L'action d'inhibiteurs de la synthèse protéique sur les embryons somatiques a montré des réponses différentes vis à vis des différents inhibiteurs : la 6-méthyl purine inhibe complètement l'activité enzymatique et la croissance des embryons ; la cordycépine, inversement, active croissance et embryogenèse ; avec la cycloheximide, des formes de dédifférenciation sont observées.

MOTS CLES :

- Daucus carota L.
- nitrate réductase
- métabolisme de l'azote
- embryogenèse somatique
- suspensions cellulaires
- réduction des nitrates

