

50376
1988
157

50376
1988
157

N° d'ordre : 260

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES

par

Abdelali CHRAIBI



REGULATION DE LA NITRATE REDUCTASE DANS DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE CHICOREE DE BRUXELLES *(Cichorium intybus L. var. Witloof)*

Soutenue le 14 Septembre 1988 devant la Commission d'Examen

M. R. BOURIQUET
Mlle M.L. CHAMPIGNY

Professeur
Directeur de recherches,
CNRS - ORSAY

Université de Lille I
Université de Paris Sud

Président

M. S. RAMBOUR
M. A. GOJON

Maître de conférences
Chargé de recherches

Université de Lille I
INRA-Montpellier

Rapporteur
Rapporteur
Examineur

A mes parents, ma fiancée
mes frères et soeurs.

Je n'ai pas à vous dédier le fruit de mon travail,
il vous appartient, car sans votre aide et votre soutien
je ne serais pas là aujourd'hui.

AVANT PROPOS

Le travail qui a fait l'objet de ce mémoire a été réalisé au laboratoire de physiologie végétale de l'Université de Lille Flandres Artois.

Je voudrais remercier ici, Monsieur le Professeur BOURIQUET d'avoir permis la réalisation de ce travail et d'avoir accepté la présidence du jury d'examen.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur RAMBOUR, il m'a continuellement aidé, conseillé et encouragé. Sa contribution à la réalisation de ce travail fait qu'il lui appartient autant qu'à moi.

Mes remerciements vont aussi à Mademoiselle CHAMPIGNY qui a accepté de lire ce mémoire et qui siège à ce jury de thèse en qualité de rapporteur.

Monsieur GOJON m'a fait bénéficier de ses compétences dans le domaine de l'assimilation du nitrate au cours de deux séjours que j'ai effectués dans le laboratoire de physiologie et biochimie végétales à l'I.N.R.A de Montpellier. Je suis très heureux qu'il soit présent à ce jury d'examen.

Je suis également reconnaissant à Madame DUBOIS qui a réalisé les coupes histologiques et les photographies qui illustrent ce travail et à Monsieur DUBOIS qui m'a fait bénéficier de ses compétences en matière de culture des cellules végétales.

Je voudrais enfin remercier le corps enseignant, le personnel technique et de service du laboratoire pour l'aide qu'ils m'ont apportée et tout particulièrement Madame JOVENIN pour le soin qu'elle a apporté à la réalisation matérielle de ce travail, mais aussi pour sa gentillesse et pour sa serviabilité

ABREVIATIONS

ABA	: acide abscissique
ADH	: alcool déshydrogénase
ADN	: acide désoxyribonucleique
ADP	: adénosine diphosphate
AG ₃	: acide gibbérellique
AIA	: acide indole-3-acétique
AMP	: adénosine monophosphate
ANA	: acide naphtalène acétique
ARN	: acide ribonucleique
ATP	: adénosine triphosphate
C.L.H.P	: chromatographie liquide à haute pression
2,4D	: acide 2,4 dichlorophénoxyacétique
DEAE	: diéthylaminoéthyl
DO	: densité optique
é	: électron
EDTA	: acide éthylène diamino tetra acétique
FAD	: flavine adénine dinucléotide
Kin	: kinétine
Km	: constante de Michaélis
MF	: matière fraîche
min	: minute
MS	: matière sèche
NAD ⁺ -NADH ⁺	: formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine
NADP ⁺ -NADPH ⁺	: formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine phosphate
NR	: nitrate réductase
NiR	: nitrite réductase
PEG	: polyéthylène glycol
Pi	: phosphate
PVP	: polyvinylpirrolidone
rpm	: révolutions par minute
SAB	: sérum albumine bovine
TCA	: acide trichloracétique

TABLE DES MATIERES

	page
INTRODUCTION	6
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	8
I-INTRODUCTION	9
II-STRUCTURE DE LA NITRATE REDUCTASE	10
1-Le molybdène	10
2-Nombre et nature des sous unités	12
III-ORIGINE DU POUVOIR REDUCTEUR	14
1-Dans les tissus chlorophylliens	14
2-Dans les systèmes non chlorophylliens	15
IV-REGULATION DE L'ASSIMILATION DU NITRATE	17
1-Quantité d'enzyme active	18
2-Disponibilité du NADH	18
3-Disponibilité du nitrate	19
V-MESURES DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE	19
1-Mesure <i>in vitro</i>	20
2-Mesure <i>in vivo</i>	20
3-Mesure <i>in situ</i>	21
VI-EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA NITRATE REDUCTASE	21
1-L'extraction	21
2-Purification de la nitrate réductase	22
VII-NITRATE REDUCTASE ET DIFFERENCIATION.ROLE DES HORMONES VEGETALES	24

MATERIEL ET METHODES	27
I-ORIGINE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE L'ENDIVE	28
1-Préparation du materiel végétal	28
2-Composition du milieu de culture	28
3-Conditions de culture des souches organogène et non organogène	29
II-METHODES DE MESURE DES ACTIVITES NITRATE REDUCTASE	30
1-Methode <i>in vivo</i>	30
2-Methode <i>in vitro</i>	30
2.1-Extraction de l'enzyme	30
2.2-Mesure de l'activité NADH:NR	31
2.3-Mesure de l'activité MVH:NR (activité terminale)	31
III-PURIFICATION DE L'ENZYME	32
IV-ANALYSES IMMUNOLOGIQUES	32
1-Obtention d'anticorps polyclonaux dirigés contre la nitrate reductase de l'endive	32
2-Immunodiffusion selon OUCHTERLONY(1949)	33
3-Immunoélectrophorèse (GRABAR et WILLIAMS,1953)	33
V-DOSAGE DES PROTEINES	33
1-Methode de LOWRY	33
2-Methode de BRADFORD modifiée	34
VI-DOSAGE DU NITRATE DANS LE MILIEU DE CULTURE ET DANS LES CELLULES	34
VII-DOSAGE DE L'AMMONIUM DANS LE MILIEU ET DANS LES CELLULES	35
VIII-EXTRACTION ET DOSAGE DES GLUCIDES	35
1-Des cellules	35

2-Du milieu de culture	35
3-Analyses par C.L.H.P	37
4-Etalonnage	37
IX-SEPARATION ET DOSAGE DES FRACTIONS AZOTEES	37
1-Séparation des fractions azotées soluble ou insoluble	37
2-Séparation des fractions:azote réduit soluble et nitrate	38
3-Dosage des fractions azotées	38
3.1-Nitrate	38
3.2-Azote réduit	38
3.3-Azote total	39
3.4-Dosage isotopique du ¹⁵ N	39
X-MESURE DE LA CHARGE ENERGETIQUE	39
1-Extraction des nucléotides	39
2-Dosage des nucléotides	40
RESULTATS	41
I-ETUDE DE LA MESURE DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE MESUREE <i>IN VIVO</i>	42
II-ESSAIS D'EXTRACTION DE LA NITRATE REDUCTASE D'ENDIVE	46
1-Dans la racine mature	47
2-Dans la suspension cellulaire	48
III-PURIFICATION DE L'ENZYME	54
IV-ORIGINE DU POUVOIR REDUCTEUR DE LA NITRATE REDUCTASE D'ENDIVE	57
1-Affinité de la nitrate réductase des cellules d'endive pour les nucléotides pyridiniques	58

2-Action des inhibiteurs du métabolisme énergétique sur l'activité nitrate réductase des cellules d'endive	60
V-COMPORTEMENT DES CELLULES D'ENDIVE AU COURS DE LA CROISSANCE	63
1-Croissance des cellules	65
1.1-Phase de latence	65
1.2-Phase de croissance exponentielle	65
1.3-Phase stationnaire	65
2-Activité nitrate réductase	67
3-Teneurs en nitrate et en ammonium	67
3.1-Dans le milieu de culture	67
3.2-Dans les cellules	69
4-Teneurs en glucides intra et extracellulaires	69
4.1-Analyse des glucides solubles présents dans le milieu	69
4.2-Analyse des glucides intracellulaires	71
5-Conclusion	71
VI-ACTION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE	72
1-Sur la croissance	74
2-Sur l'activité nitrate réductase	74
3-Sur l'évolution de la teneur des glucides intra et extracellulaires	77
4-Conclusion	77
VII-EVOLUTION DE LA CHARGE ENERGETIQUE DES CELLULES D'ENDIVE AU COURS DE LA CROISSANCE-ACTION DE L'ABA	78
1-Sans ABA dans le milieu de culture	80
2-En présence d'ABA dans le milieu de culture	80
3-Conclusion	81

VIII-ACTION DE L'ABA SUR L'ABSORPTION ET LA REDUCTION REELLES DU NITRATE	82
IX-EVOLUTION DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE ET DE LA RHIZOGENESE AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE A11	87
	92
DISCUSSION	93
I-ETUDE DE LA MESURE DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE	93
1-Methode <i>in vivo</i>	94
2-Methode <i>in vitro</i>	
II-PURIFICATION DE LA NITRATE REDUCTASE DES CELLULES D'ENDIVE ET CARACTERISTIQUES DE L'ENZYME	95 96
III-ORIGINE DU POUVOIR REDUCTEUR	98
IV-CROISSANCE ET ACTIVITE NITRATE REDUCTASE	
V-ACTION DE L'ACIDE ABCSISSIQUE SUR LA CROISSANCE ET SUR L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE DES CELLULES D'ENDIVE	102 104
VI-ACTIVITE NITRATE REDUCTASE ET DIFFERENCIATION RHIZOGENE	
	107
CONCLUSIONS	
BIBLIOGRAPHIE	109

INTRODUCTION

Alors que les régulations du métabolisme carboné végétal sont maintenant bien connues, celles du métabolisme de l'azote le sont beaucoup moins.

Chez les végétaux supérieurs qui utilisent le nitrate comme source azotée, la nitrate réductase (NR) est une enzyme clé qui régule apparemment toute la chaîne de l'assimilation de l'azote (HEWITT; 1975, GUERRERO et al. 1981).

Cependant, la compréhension des mécanismes de régulation de la nitrate réductase s'est singulièrement compliquée avec la découverte de plusieurs formes enzymatiques. Alors qu'il est généralement admis que la nitrate réductase est inductible par son substrat, on a trouvé, du moins chez le Soja des NADH : nitrate réductases inductibles à côté de NADH : NR constitutives et de formes qui utilisent aussi bien le NADPH que le NADH (STREIT et al. 1987)

Les facteurs qui régulent la NADH : NR qui est la forme qui a été la plus étudiée sont très divers : lumière, azote réduit, métabolisme du carbone.

Chez la Chicorée de Bruxelles, l'activité NR est essentiellement localisée dans les racines jeunes des plantules ou dans les racines néoformées par des explants racinaires cultivés *in vitro* ou par des racines tubérisées mises en forçage.(DORCHIES et RAMBOUR, 1983-1985).

Lorsque la racine acquiert une fonction de mise en réserve de l'inuline et tubérise, l'activité nitrate réductase est localisée dans les feuilles vertes (DORCHIES et RAMBOUR, 1983).

La question qui se posait alors était de savoir si la NR ne pouvait pas être un marqueur enzymatique de la différenciation rhizogène.

L'inconvénient des systèmes expérimentaux utilisés jusqu'alors dans le laboratoire (explants tissulaires d'origines très diverses) était l'hétérogénéité cellulaire. Il est donc impossible d'évaluer la proportion des cellules impliquées dans le processus de différenciation. Dans ces conditions, il est

difficile de relier les modifications biochimiques observées au phénomène étudié. La recherche d'un matériel "plus homogène" comprenant un taux élevé de cellules qui participent à la différenciation était donc souhaitable.

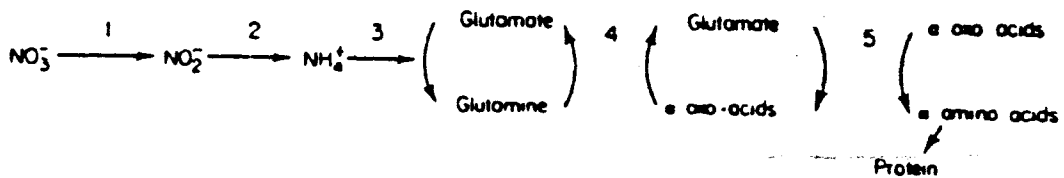
Des suspensions cellulaires de Chicorée de Bruxelles ont été récemment obtenues dans le laboratoire (DUBOIS et al., 1988). Certaines souches ont conservé leurs potentialités organogènes alors que d'autres les ont perdues.

Nous avons donc suivi l'évolution de l'activité NR dans ces suspensions cellulaires afin d'étudier les modifications de l'activité et des caractéristiques enzymatiques au cours d'un processus de différenciation rhizogène..

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I - INTRODUCTION

La plupart des végétaux utilisent l'azote minéral combiné sous forme d'ions nitrate ou d'ammonium, le nitrate absorbé par un végétal peut être assimilé par une voie enzymatique commune aux parties aériennes et aux racines (HAGEMAN et al., 1979 ; BEEVERS et HAGEMAN, 1980 ; FEMTEM et al., 1983) (Figure 1).



1. nitrate reductase (NR); 2. nitrite reductase; 3. glutamine synthetase (GS); 4. glutamic: 2-oxoglutarate amino transferase (GOGAT); 5, transaminase.

Figure 1 La voie d'assimilation du nitrate (d'après Hageman 1979).

La différence majeure entre ces deux organes concerne la localisation de la glutamine synthétase (GS). Cette dernière, localisée principalement dans les chloroplastes des parties aériennes (ROBIN, 1983), se retrouve essentiellement dans le cytoplasme des cellules racinaires (SUZUKI et al., 1981 ; OAKS et HIREL, 1985). Les autres enzymes, nitrite réductase (NiR) et glutamate synthase (GOGAT) sont chloroplastiques dans les parties aériennes, et associées aux proplastides dans les racines (BEEVERS et HAGEMAN, 1980). Quant à la nitrate réductase (NR), bien que la plupart des observations actuelles s'accordent à la situer dans le cytoplasme (LOSADA et al., 1981), mais elle a été récemment localisée dans les chloroplastes de l'Épinard par des études immuno-cytologiques (KAMACHI et al., 1987).

La NR qui catalyse la première étape de la chaîne, est souvent considérée comme l'enzyme clé de l'assimilation du nitrate. En effet, de nombreux arguments font de la réduction du nitrate en nitrite l'étape limitante de toute la voie assimilatrice (BEEVERS et HAGEMAN, 1980 ; NAIK et al., 1982). L'activité nitrate réductase est la plus faible comparée à celles des autres enzymes de la chaîne.

L'affinité de la nitrate réductase pour son substrat est relativement élevée. Le contrôle de l'assimilation du nitrate par la première étape a une signification physiologique (HAGEMAN, 1979) : il permet d'éviter l'accumulation de nitrite et d'ammonium, toxiques pour le végétal, et favorise le stockage du nitrate, "osmoticum" essentiel pour la plante (CHAILLOU et al., 1986).

II - STRUCTURE DE LA NITRATE REDUCTASE

1 - LE MOLYBDENE

L'obtention chez *Aspergillus nidulans* de mutants, appelés cnx^- qui n'ont ni activité NR, ni xanthine oxydase a amené PATEMAN (1964) à proposer l'existence d'un cofacteur molybdique commun aux deux enzymes.

A la suite de nombreux travaux, il a été conclu à l'existence d'un cofacteur molybdique universel commun à une série d'enzymes tant animales que végétales et qui catalysent des réactions très différentes.

En 1954 et 1955, NICHOLAS et NASON découvrent que le molybdène a un rôle dans le transport des électrons du NADH au NO_3^- .

Des travaux récents ont montré que le cofacteur est constitué d'une ptérine phosphorylée (JOHNSON et RAJAGOPALAN, 1982 ; JOHNSON et al., 1984) associée au molybdène (Figure 2) ; il est transférable au mutant nit 1 de

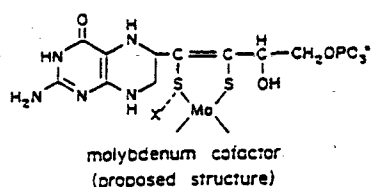
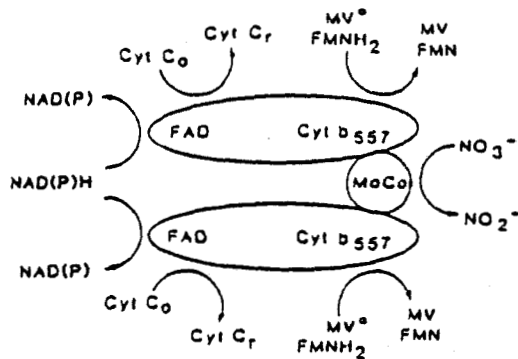
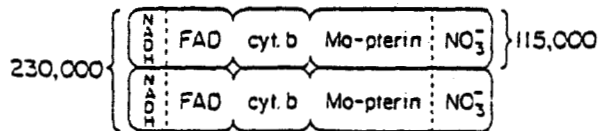


Figure 2 : Structure probable de la forme active du cofacteur molybdique (JOHNSON et RAJAGOPALAN, 1982).

Neurospora (mutant dépourvu d'activités NR et xanthine oxydase) qui retrouve alors une activité NR qui ne dépend que de l'apport de Mo et de molybdoptérine (KRAMER et al., 1984).



La nitrate réductase de *Neurospora crassa* serait un homodimère où les deux sous-unités possèdent en commun un atome de Mo (PAN et NASON, 1978). Ce modèle pourrait s'appliquer aux nitrate réductases des végétaux supérieurs : chaque sous-unité aurait une masse moléculaire d'environ 100000 daltons, mais on ne sait pas si chaque mole d'enzyme possède un ou deux atomes de Mo (a).



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

Le cofacteur sert de support au Mo mais contribue aussi au maintien de la stabilité de la NR (NASON et al., 1970). Chez *Neurospora* il maintiendrait la structure dimérique de l'enzyme (PAN et NASON, 1978).

2 - NOMBRE ET NATURE DES SOUS UNITES

Chez les plantes supérieures, la masse moléculaire de la NR varie selon les espèces étudiées de 160 000 à 500 000. Tous les travaux s'accordent à lui attribuer une structure multimérique mais selon les espèces, le nombre et la nature de ses unités varient de 2 à 8.

Chez *Neurospora* la NR possède deux sous-unités identiques (homodimère) (PAN et NASON, 1978). La même structure a été également attribuée à l'enzyme de *Cucurbita maxima* (REDINBAUGH et CAMPBELL, 1985) (encart ci-contre).

Bien que de nombreux modèles aient été proposés, on s'accorde actuellement à penser que les nitrate réductases des végétaux supérieurs sont constituées de dimères ; chaque sous-unité ayant une structure et une fonction identiques.

Cependant, les progrès réalisés dans le domaine de l'extraction et de la purification enzymatique (découverte de protecteurs de la structure protéique, chromatographie d'affinité) ont permis l'obtention de préparations très pures de la molécule et par voie de conséquence des anticorps spécifiques de l'enzyme. L'utilisation des méthodes immunochimiques a alors permis de comparer les nitrate réductases de différentes espèces. Toutes ces enzymes qui présentent les mêmes propriétés catalytiques proviennent sans doute d'une molécule ancestrale dont la structure s'est diversifiée par la suite (SMARELLI et CAMPBELL, 1981), alors que le site catalytique qui n'a pas subi d'évolution, est intégralement conservé (SNAPP et al., 1984).

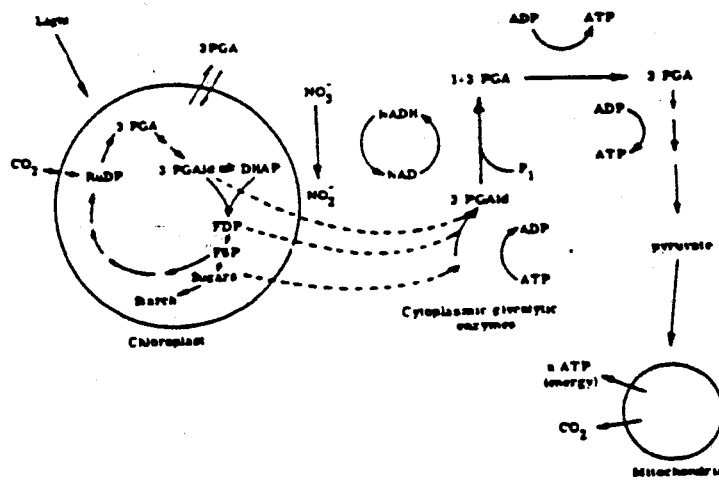


Figure 3 : Relation entre la photosynthèse, la glycolyse et la réduction du nitrate. Le NADH formé est utilisé dans le cytoplasme pour la réduction du nitrate et pour d'autres réactions (KLEPPER *et al*, 1971).

III - ORIGINE DU POUVOIR REDUCTEUR

1 - DANS LES TISSUS CHLOROPHYLLIENS

Dans les tissus verts, le donneur d'électrons est rarement le NADPH. Il est en effet généralement admis que le réducteur du NO_3^- est le NADH, dont la concentration moyenne (20 à 200 μM) est largement suffisante pour saturer le site de liaison du coenzyme (K_m NADH : 2 à 8 μM) (LEE, 1980).

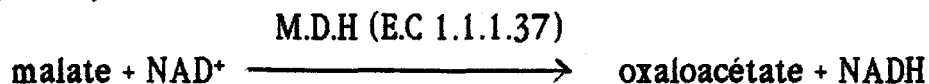
Cependant, une nitrate réductase spécifique du NADPH (EC.1.6.6.3.) a été décrite chez les Ascomycètes *Aspergillus nidulans* et *Neurospora crassa* (PAN et NASON, 1978). Une autre forme (E.C. 1.6.6.2.) capable d'utiliser aussi bien le NADH que le NADPH a été caractérisée chez *Ankistrodesmus braunii* (DIEZ et al., 1977), ainsi que chez certains végétaux supérieurs tels que le Soja (JOLLY et al., 1976, LAHAV et al., 1976), le Mais (WALLACE, 1973 ; CAMPBELL, 1978 ; REDINBAUGH et CAMPBELL, 1981), le Riz (SHEN, 1972 ; SHEN et al., 1976), l'Orge (DAILEY et al., 1982 b) et la Carotte (RAMBAUD et RAMBOUR, 1988).

S'il est établi que la réduction du nitrate a lieu dans le cytoplasme et que le NADH cytoplasmique est utilisé par la NR comme source d'électrons (CANVIN et WOO, 1979), l'origine initiale de ce pouvoir réducteur reste controversée ; deux types de composés carbonés sont susceptibles de jouer ce rôle : les oses-phosphates et les acides carboxyliques.

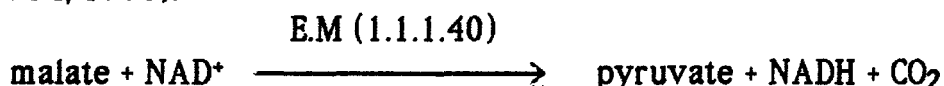
Les oses-phosphates sont oxydés au cours de la glycolyse et assurent en particulier au niveau de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Figure 3), une synthèse de NADH qui peut être disponible pour la nitrate réductase (KLEPPER et al., 1971 ; MANN et al., 1978). Dans les parties aériennes et à la lumière, le chloroplaste est le siège d'un transfert d'électrons qui aboutit à la réduction du NADP^+ , celui-ci permet la réduction du CO_2 en trioses phosphates qui traversent librement le chloroplaste. Dans le cytoplasme ils sont repris par la glycolyse et génèrent du NADH (KLEPPER et al., 1971). Dans ce cas, la réduction du nitrate serait donc indirectement dépendante de la photosynthèse (Figure 3).

Le métabolisme des acides organiques et surtout celui du malate est également capable de provoquer une réduction du NAD^+ (LEE, 1980). Deux voies différentes ont été proposées. La première fait intervenir l'oxydation du

malate par la malate déshydrogénase cytoplasmique (NEYRA et HAGEMAN, 1976 ; LEE, 1980).



La seconde voie met en jeu l'enzyme malique, isoforme mitochondriale (située dans l'espace intermembranaire) (HIRAI, 1978 ; LEE, 1980 ; NAIK et NICHOLAS, 1984, 1986).

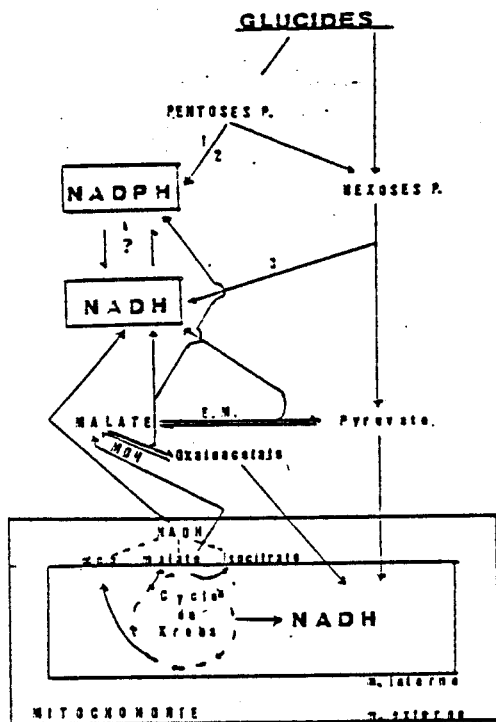


La fourniture du malate à la cellule peut être assurée soit par la synthèse dans le cycle de Krebs, soit par carboxylation du phosphoénolpyruvate puis réduction de l'oxaloacétate produit (NAIK et NICHOLAS, 1986), soit enfin par importation à partir des parties aériennes (BEN ZIONI *et al.*, 1971) ou par remobilisation d'acide malique stocké dans la vacuole (ROBIN, 1983).

2 - DANS LES SYSTEMES NON CHLOROPHYLLIENS

Dans les systèmes non chlorophylliens le NADPH peut éventuellement jouer ce rôle de donneur d'électrons. Il est concevable que la voie des pentoses phosphates intervienne, d'autant plus que son activité est accrue lors de l'assimilation du nitrate. Il a été effectivement montré (SARKISSIAN et FOWLER, 1974 ; JESSUP et FOWLER, 1977) que les activités glucose 6 phosphate et gluconate 6 P-déshydrogénases peuvent subvenir aux besoins en réducteurs de l'ensemble de la chaîne d'assimilation du NO_3^- . Mais comme ces enzymes sont situées dans les proplastés, il est plus vraisemblable qu'elles fournissent du NADPH aux réactions catalysées par la NiR et la GOGAT (LEE, 1980).

La glycolyse est l'une des voies essentielles capable de pourvoir aux besoins en réducteurs. L'intervention de cette voie a été prouvée par des expériences menées à l'aide de disques foliaires maintenus à l'obscurité et auxquels sont fournis des intermédiaires de la voie glycolytique. Le fructose 1-6 P, le glycéraldéhyde ou le dihydroxyacétone (NEYRA et HAGEMAN, 1978 ; MANN *et al.*, 1978) augmentent l'activité nitrate réductase alors que le 3 phosphoglycérate ou le pyruvate qui sont des intermédiaires postérieurs à la phase oxydative n'ont pas d'action (KLEPPER *et al.*, 1971 ; MANN *et al.*, 1978).



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

Figure 4 : Origines du potentiel réducteur nécessaire à la réduction du nitrate dans les tissus non chlorophylliens (RAMBOUR, 1986, d'après LEE, 1980).

La voie d'oxydation du malate peut aussi intervenir à l'obscurité et dans les organes non chlorophylliens. En effet, la déshydrogénation du malate en oxaloacétate et sa décarboxylation en pyruvate produisent des nucléotides pyridiniques réduits, mais il a été souvent difficile d'estimer l'importance du malate comme source de réducteurs utilisables dans l'assimilation du nitrate, dans les organes non photosynthétiques d'une plante entière.

Par ailleurs, les mitochondries contenant les enzymes oxydatives du cycle de Krebs représentent un pouvoir réducteur très important. En présence d'oxygène, elles produisent assez d'équivalents H^+ pour réduire les nucléotides pyridiniques (LEE, 1980), or les membranes mitochondriales sont peu perméables à ces derniers. Mais le NADH pourrait éventuellement être indirectement transféré dans le cytoplasme par une navette de l'acide malique. Cependant, l'emploi d'inhibiteurs métaboliques ou d'agents de découplage modifiant les transferts d'électrons dans la mitochondrie, n'a pas apporté des preuves convaincantes de l'intervention du NADH mitochondrial dans l'assimilation de l'azote nitrique (LEE, 1980).

En conclusion, il semble que ce ne soit pas un seul système qui fournisse le pouvoir réducteur nécessaire, 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 phospho-déshydrogénase qui sont deux enzymes largement présentes dans le cytoplasme et dont chacune possède une activité suffisante pour couvrir les besoins en nucléotides réduits de la NR (Figure 4).

IV - REGULATION DE L'ASSIMILATION DU NITRATE

Puisque l'assimilation du nitrate est tributaire du fonctionnement de la NR, c'est au niveau de cette première étape qu'il faut chercher logiquement les facteurs de régulation de la synthèse d'azote réduit par la plante.

D'après les lois de la cinétique enzymatique, la réaction de réduction du nitrate en nitrite peut être limitée par trois facteurs : la disponibilité des deux substrats NO_3^- et NADH et la quantité de nitrate réductase active.

1 - QUANTITE D'ENZYME ACTIVE

Cette quantité peut être appréciée par la mesure *in vitro* de l'activité NR. Or, l'activité NR *in vitro* des tissus semble être toujours largement supérieure à leur assimilation véritable. On a donc conclu que dans les conditions physiologiques normales, ce n'est pas la quantité d'enzyme qui fait défaut pour entretenir la réduction du nitrate (BRUNETTI et HAGEMAN, 1976 ; RADIN, 1978 ; BEEVERS et HAGEMAN, 1980 ; NAIK et al., 1982 ; WALLACE, 1986).

Le contrôle de la synthèse, de l'expression et de la dégradation de l'enzyme, bien que considérablement étudié (BEEVERS et HAGEMAN, 1980 ; GUERRERO et al., 1981) interviendrait donc peu dans la régulation de la nutrition azotée d'un végétal.

Cette conclusion doit néanmoins être nuancée lors de l'inactivation de l'enzyme *in situ* par divers inhibiteurs (HAGEMAN, 1979 ; GUERRERO et al., 1981). Dans ce cas, l'extraction de l'enzyme et son incubation en présence de NO_3^- saturant pourrait lever cette inactivation et conduire à surestimer par la mesure *in vitro* la quantité d'enzyme réellement active dans le tissu.

2 - DISPONIBILITE DU NADH

La régulation de la réduction du nitrate par la fourniture du pouvoir réducteur est très délicate à appréhender puisque c'est la concentration du NADH au site de l'enzyme qui va conditionner son alimentation en électrons alors qu'il n'existe pas de moyen de mesurer ou d'agir avec certitude sur cette concentration.

Une première approche du problème a consisté à estimer la concentration globale du NADH intracellulaire (LEE, 1980). Celle-ci est de l'ordre de 20 à 200 μM , concentration suffisante pour saturer le site de liaison du coenzyme puisque le K_m , NADH est de 2 à 8 μM environ. Le NADH ne serait donc pas limitant. Cependant, cette interprétation ne tient pas compte de la compartimentation cellulaire du NADH. Le calcul de l'activité de synthèse du NADH par la glycolyse racinaire montre que cette voie métabolique produit de 20 à 40 fois plus de NADH qu'il n'est nécessaire à la réduction du NO_3^- (STEPAN-SARKISSIAN et FOWLER, 1978 ; LEE, 1980).

Le problème a été surtout étudié dans les racines (RADIN et al., 1978 ; DEANE-DRUMOND, 1979 ; HANISCH TEN-CATE et BRETELER, 1981) et dans les

feuilles maintenues à l'obscurité (ASLAM et al., 1979 ; ASLAM et HUFFAKER, 1984). Dans les feuilles soumises à la lumière, la production de glucides par la photosynthèse permet le maintien de l'activité nitrate réductase (ASLAM et HUFFACKER, 1984). Cependant, la compréhension de la relation glucides-activité nitrate réductase est compliquée par le fait que les sucres ou les acides organiques modifient l'absorption du nitrate (BEN ZIONI et al., 1971 ; TEN-CATE et BRETELER, 1981) et sa compartimentation (ASLAM et OAKS, 1975). Le contrôle de la réduction du nitrate pourrait alors dépendre plutôt de la disponibilité en nitrate (LEE, 1980; SOUALMI et al., 1985) que celle du NADH.

Le seul cas, où il est bien établi que les composés énergétiques limitent la réduction du nitrate est celui des parties aériennes du Maïs et de l'Orge maintenues à l'obscurité (ASLAM et al., 1979 ; ASLAM et HUFFAKER, 1984). Dans ce cas, la compétition entre nitrate réductase et chaîne respiratoire pour l'oxydation du NADH cyto-plasmique est particulièrement intense.

3 - DISPONIBILITE DU NITRATE

Le nitrate substrat de la nitrate réductase est évidemment nécessaire à l'activité nitrate réductase, alors qu'il n'existe pas de relation entre activité et teneur en nitrate. Cependant, plusieurs arguments expérimentaux suggèrent que c'est la disponibilité du nitrate lui même qui joue le rôle limitant de sa réduction (BEEVERS et HAGEMAN, 1980 ; GUERRERO et al., 1981 ; NAIK et al., 1982 ; ROBIN, 1983). En plus, il a été montré que c'est le flux de NO_3^- qui régule l'activité nitrate réductase (HEIMER et FILNER, 1971 ; SHANER et BOYER, 1976 ; REED et al., 1980; SOUALMI et al., 1985)

En effet, il a été mis en évidence une étroite dépendance de la réduction du nitrate dans les parties aériennes vis à vis du flux ascendant de l'anion en provenance des racines (UDAYAKUMAR et al., 1981 ; NELSON-SCHREIBER et SCHWEITZER, 1986). Comme la translocation du nitrate apparaît directement liée à l'absorption à partir du milieu (Mc KOWN et al., 1981), il semble logique de constater qu'en fin de compte, c'est l'intensité de cette absorption qui conditionne l'assimilation par la plante (CHANTAROTWONG et al., 1976).

V - MESURES DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE

L'assimilation du nitrate par un végétal se réalisait classiquement par le dosage de l'azote réduit accumulé (RADIN et al., 1975 ; BRUNETTI et HAGEMAN, 1976 ; NAIK et al., 1982). Cependant, cette technique peu précise ne permet pas d'estimer les variations de cette assimilation, ni de la localiser.

Puisque la nitrate réductase catalyse l'étape limitante de la voie d'assimilation, la vitesse de réduction du nitrate est alors égale à celle d'accumulation d'azote réduit (NAIK et al., 1982). C'est pourquoi de nombreuses recherches ont essayé de développer une méthode de mesure de l'activité NR qui permette d'évaluer la vitesse réelle de réduction du nitrate dans le tissu étudié. Ainsi les trois techniques principales ont été décrites, il s'agit des méthodes *in vitro*, *in vivo* et *in situ*.

1 - MESURE *IN VITRO*

Le principe de la mesure d'activité NR *in vitro* consiste à incuber une partie aliquote d'un extrait enzymatique en présence des substrats de l'enzyme (NO_3^- et donneur d' e^-) en teneurs saturantes, et de mesurer la vitesse de production du nitrite. Les conditions n'étant pas limitantes, cette vitesse exprime donc l'activité maximale de la NR, qui est proportionnelle à la quantité d'enzyme active présente dans l'extrait. La mesure *in vitro* permet donc d'apprécier la capacité potentielle d'un tissu à assimiler le nitrate (NAIK et al., 1982). Mais cette capacité n'est pas entièrement exploitée par la plante.

En effet, si l'activité nitrate réductase *in vitro* peut être reliée à la quantité d'enzyme active dans un tissu (SOMERS et al., 1983); elle semble surestimer l'assimilation véritable du NO_3^- (NAIK et al., 1982 ; ROBIN, 1983 ; WALLACE, 1986).

2 - MESURE *IN VIVO*

Contrairement à la méthode précédente, la mesure de l'activité NR *in vivo* utilise du matériel vivant et elle a été mise au point par JAWORSKI (1971). Dans son principe elle consiste à incuber le fragment végétal dans un milieu liquide en présence de nitrate à l'obscurité et en anoxie et à mesurer la vitesse d'apparition du nitrite. Le nitrite formé est dosé dans le milieu d'incubation où il diffuse à partir du tissu (FERRARI et al., 1973). Pour faciliter cette diffusion, divers alcools ou perméabilisants sont ajoutés au tampon d'incubation (RADIN, 1975, 1978 ; RED et CANVIN, 1982 ; WALLACE, 1986).

Les résultats obtenus par la méthode *in vivo* ne reflètent pas l'assimilation véritable du nitrate. L'activité nitrate réductase *in vivo* conduit soit à une sous-estimation (REED et HAGEMAN, 1980 ; GRAY et GRESSWELL, 1983, 1984) soit à une surestimation (RADIN, 1977 ; NAIK et al., 1982) de l'assimilation véritable.

3 - MESURE *IN SITU*

Afin d'éliminer les inconvénients de la méthode de mesure *in vivo*, l'évaluation de la réduction du nitrate se fait en évitant l'incubation dans un milieu liquide ainsi que l'apport de nitrate exogène (JONES et SHEARD, 1977 ; ROBIN, 1983). Elle n'évite cependant pas l'anaérobiose. Cette méthode qui semble limiter la décompartimentation artificielle du nitrate due à l'incubation en milieu liquide (MILLS et LIPS, 1984) aboutit à l'estimation d'activités inférieures à celles obtenues avec la méthode *in vivo* (JONES et SHEARD, 1978).

Les premiers résultats obtenus avec cette méthode en milieu gazeux ont permis d'estimer la réduction réelle du nitrate à l'air et à la lumière (ROBIN et al., 1983 ; PRAKASH et al., 1984).

VI- EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA NITRATE REDUCTASE

1 - L'EXTRACTION

L'extraction de la nitrate réductase des tissus ou cellules végétales présente de nombreuses difficultés puisqu'elle se fait par un broyage. Celui-ci libère des composés phénoliques qui inhibent l'activité enzymatique. L'utilisation du polyvinyl pyrrolidone insoluble (PVP) (LOOMIS et BATAILLE, 1966 ; REDINBAUGH et CAMPBELL, 1983) qui adsorbe les composés phénoliques permet d'obtenir des préparations enzymatiques actives. Le broyage des tissus a pour autre conséquence de provoquer des oxydations cellulaires qui sont limitées par l'apport d'antioxydants au tampon d'extraction. Les antioxydants peuvent être : la cystéine (CAMPBELL et SMARELLI, 1978 ; REDINBAUGH et al., 1981), le dithiotreitol (PAN et al., 1978 ; KUO et al., 1980), le B mercaptoéthanol (ROUSTAN et al., 1974) ou la cystéine (CAMPBELL et SMARELLI, 1978 ; REDINBAUGH et al., 1981). Généralement la cystéine est ajoutée au tampon d'extraction pour empêcher l'oxydation des groupements thiols de la NR. Elle n'agit pas sur l'extractibilité de l'enzyme mais sur l'activité enzymatique elle même (OJI, 1982);

L'addition de protéines comme la serum albumine ou la caséine dans le milieu d'extraction, protège l'activité nitrate réductase de la dégradation par les enzymes protéolytiques. En effet, la caséine et la SAB servent de substrats

à diverses protéases (JONES et MHUIMHNEACHAIN, 1985). La caséine a été utilisée chez le Blé, l'Orge (SHERRAD et al., 1979 (YAMAYA et OHIRA, 1976) et *Spirodella polyrrhiza* (BUCZEK, 1984).

Chez *Helianthus annuus* (KAISER *et al.*, 1984), l'addition de caséine au tampon d'extraction augmente la stabilité de la NR.

La leupeptine, inhibiteur spécifique des thiols protéinases, stabilise la NR des extraits de feuilles d'Orge (WRAY et KIRK, 1981). La leupeptine annule l'activité de la thiol protéinase de l'Orge (HAMANO *et al.*, 1984) qui catalyse la protéolyse de la NR (OJI *et al.*, 1985).

D'autres produits sont ajoutés au tampon d'extraction et surtout des stabilisateurs de l'enzyme tel que le FAD, le molybdène ou l'EDTA. Le FAD empêche la dénaturation thermique de la NR (JONES et MHUIMHNEACHAIN, 1985) et semble stabiliser la conformation du site actif de l'enzyme. L'EDTA est ajouté dans quasiment tous les tampons d'extraction. Il inhiberait le système NADH oxydant contaminant, c'est aussi un inhibiteur des métalloprotéases.

La nature du tampon d'extraction varie selon les auteurs. Le tampon le plus souvent employé est le tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, dont le pH peut varier de 7,5 à 8,2 (CAMPBELL *et al.*, 1983 ; NELSON *et al.*, 1984 ; KAISER, 1984 ; FIDO *et al.*, 1984 ; BUCZEK, 1984), soit du tampon Tris HCl (KUO *et al.*, 1980 ; SOMERS *et al.*, 1982 ; CHIKWEN *et al.*, 1982 ; IDA *et al.*, 1983). OJI (1985) extrait l'enzyme 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 REDUCTASE

Les premières purifications de la NR 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 a abouti à des préparations enzymatiques faiblement purifiées.

De nouvelles méthodes telles que la gel filtration, la chromatographie sur DEAE-cellulose ou les chromatographies sur gel d'hydroxyapatite ont été utilisées, mais la purification de l'enzyme n'a été que partielle et les rendements faibles sans doute à cause de la nature labile de l'enzyme (BEEVERS *et al.*, 1964 ; JOLLY *et al.*, 1976).

Cependant, GARRETT et NASON (1969) en combinant ces différentes techniques, précipitations par l'acide citrique et le sulfate d'ammonium, puis chromatographie sur DEAE-cellulose, hydroxyapatite et gel-filtration sur Sephadex G200, réussissent à purifier 500 fois l'enzyme de *Neurospora*

L'étude des caractéristiques de la NR a donc été retardée par les difficultés à obtenir l'enzyme homogène. De l'absence d'une méthode rapide de purification résultait donc la perte d'activité enzymatique.

L'apparition de la chromatographie d'affinité a permis la purification d'enzymes utilisant le NADH comme la phosphofructokinase, la lactate déshydrogénase et la malate déshydrogénase en utilisant le bleu dextran Sepharose. La nitrate réductase étant aussi une enzyme à NADH, SOLOMONSON (1975) a réussi sa purification 930 fois en une seule étape et avec un rendement d'activité de 60 % chez la Chlorelle. L'enzyme 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 chromatographie d'affinité a été largement utilisée par la suite et les nitrate réductases d'autres organismes ont été purifiées à homogénéité ou partiellement (CAMPBELL, 1978; NOTTON et al., 1977 ; REDINBAUGH et al., 1983 ; FIDO et al., 1984 ; OJI et al., 1985 ; POULLE, 1979 ; RAMBAUD, 1986 ; RAMBOUR, 1986).

La purification par chromatographie d'affinité a été ensuite utilisée en combinaison avec d'autres techniques plus conventionnelles (CAMPBELL, 1978). Ainsi pour OJI (1985), cette méthode de chromatographie a été l'étape la plus efficace d'un long procédé de purification comprenant : chromatographie sur hydroxyapatite et phenyl Sepharose, gel filtration puis HPLC comme dernière étape. Le bleu Sepharose permet de multiplier par 500 l'activité spécifique.

La chromatographie d'affinité sur 5'AMP Sepharose a été utilisée par FIDO et NOTTON (1984) comme dernière étape de purification, l'enzyme éluée avec un gradient de NADH, a été purifiée 3431 fois. Elle permet d'obtenir des protéines enzymatiques dont la structure est intégralement conservée.

VII - NITRATE REDUCTASE ET DIFFERENCIATION. ROLE DES HORMONES VEGETALES

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 al., 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 al., 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 al., 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 (DAVIDSON et al., 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, ainsi que dans les feuilles de Concombres et leurs méristèmes (BLAHOVA et al. 1980).

Les relations activité nitrate réductase et différenciation organogène n'ont pas souvent été étudiées. La formation des racines, chez *Phaseolus vulgaris* est accompagnée de changements d'activités enzymatiques du métabolisme de l'azote (BURZINSKI et al., 1982). Les activités nitrate réductase, nitrite réductase et glutamate déshydrogénase sont augmentées à la formation des racines, alors que l'activité glutamine synthétase 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 (DWIVEDI et al., 1984).

KAMADA et HARADA (1984) ont étudié les variations de l'activité nitrate réductase pendant l'embryogenèse somatique de la Carotte sauvage. Ils ont montré que la présence simultanée de nitrate et d'une grande quantité d'alanine dans le milieu de culture stimule la prolifération cellulaire et initie l'embryogenèse somatique.

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

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

Les gibbérellines ne semblent pas modifier l'activité de la nitrate réductase et sont incapables d'induire l'enzyme dans les couches à aleurone de l'Orge (FERRARI et VARNER, 1971).

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

Mais les cas les plus nombreux d'augmentation de l'activité nitrate réductase sont dûs à l'application de cytokinines, seules ou en association avec d'autres hormones telles les gibbérellines (ROTH-BEJERANO et LIPS, 1970 ; KENDE et al., 1971 ; DILWORTH et KENDE, 1974 ; KNYPL, 1979 ; TENCATE et BRETELER, 1982). Curieusement la kinétine permet d'accroître l'activité d'embryons d'*Agrostemma githago* en absence de nitrate (KENDE et SHEN, 1972). Par ailleurs, la stimulation de la nitrate réductase par la kinétine est inhibée chez le Mais par la 6-méthylpurine et la cycloheximide ; ceci laisse supposer que l'hormone provoque une synthèse de *nov*o de l'enzyme (RAO et al., 1984). Dans ce même matériel, l'action de la kinétine est accrue par la lumière rouge mais les deux facteurs semblent agir indépendamment et ne sont pas liés au phytochrome (RAO et al., 1984).

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

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

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

MATERIEL ET METHODES

I - ORIGINE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE L'ENDIVE

1 - PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL

Cichorium intybus L. (var. Witloof) encore appelée Chicorée de Bruxelles est une plante bisannuelle qui produit une racine tubérisée en fin de première année.

Deux suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* L. (var. Witloof) ont été établies à partir de colonies tissulaires issues de la prolifération de petits explantats racinaires (DUBOIS, 1988).

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

La lignée B22 qui est très homogène et dont la croissance est rapide (temps de doublement : 26 h) a perdu les potentialités organogènes des tissus d'origine. Par contre, la lignée A11, plus hétérogène et à croissance lente (temps de doublement : 10 jours) a conservé la capacité de produire des bourgeons et des racines.

2 - COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE

Le milieu de base de la suspension cellulaire de *Cichorium intybus* est constitué par la solution de MURASHIGE et SKOOG (1962).

- Macroéléments minéraux	mg/l	- microéléments minéraux	mg/l
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	Fer-EDTA (Merck)	9,72
NH ₄ NO ₃	1 650	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	10,60
KNO ₃	1 900	KI	0,83
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
KH ₂ PO ₄	170	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025
		CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025
		H ₃ BO ₃	6,20
		MnSO ₄ . H ₂ O	16,90

- Vitamines	mg/l		
Pyridoxine	0,5	- Substances de croissance	
Acide nicotinique	0,5	ANA	1,8 mg/l
Vitamine B ₁	0,1	Kinétine	0,02 mg/l
Glycocolle	2,0	2,4-D	0,02 mg/l
Inositol	100		
- Saccharose	20 000		
- Glutamine	500		

3 - CONDITIONS DE CULTURE DES SOUCHES ORGANOGÈNE ET NON ORGANOGÈNE

Les fioles de culture sont placées inclinées à 40° sur des agitateurs rotatifs tournant à la vitesse de 70 rpm.

Tous les huit jours, les cellules de la souche non organogène sont filtrées sélectivement sur des tamis en inox de vide de maille de taille décroissante (1 mm, 50 µm). Les cellules sont ensuite lavées par de l'eau sucrée (20 g/l de saccharose) stérile. Trois à quatre grammes de cellules sont transférés dans des milieux neufs qui ont été autoclavés à 120° C pendant 20 min.

La suspension organogène ayant une croissance lente, le repiquage des cals et des cellules se fait tous les 40 jours, pour séparer cals et cellules, les tamis utilisés ont un vide de maille de 2 mm et 125 µm.

Les fioles de culture sont alors entreposées dans une pièce dont la température est maintenue à 25° C, ces fioles reçoivent une intensité d'éclairement de 1,5 Wm⁻² émise en permanence par des tubes fluorescents (De Luxe Cool White).

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

II - METHODES DE MESURE DES ACTIVITES NITRATE REDUCTASE

1 - METHODE *IN VIVO*

Les cellules d'endive en culture depuis deux, trois ou quatre jours sont filtrées sous vide ; la mesure de l'activité enzymatique *in vivo* consiste à doser le nitrite pendant l'incubation des cellules maintenues en conditions anaérobies et à l'obscurité (FERRARI et VARNER, 1971 ; JAWORSKI, 1971). 80 mg de cellules sont placés dans 2 ml de tampon d'incubation contenant :

- 5 volumes de KNO_3 , 0,1 M
- 3 volumes de Tampon Pi : $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 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 30 secondes . Le tube est bouché ensuite et placé dans un bain-marie thermostaté à 28° C et maintenu à l'obscurité.

Après 20 minutes, le nitrite formé est révélé par l'addition de 1 ml de sulfanilamide à 0,2% dans une solution aqueuse d'HCl 3N et de 1 ml de chlorhydrate de N (1 naphthyl-éthylène) diamine en solution aqueuse à 0,15%.

Les cellules sont filtrées sur "Miracloth" (Calbiochem) et le surnageant est prélevé pour la lecture de la densité optique à 540 nm. L'activité enzymatique est exprimée en umoles de NO_2^- formé par heure et par gramme de matière fraîche ($\mu\text{mole NO}_2^- \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$ MF).

2 - METHODE *IN VITRO*

2.1. Extraction de l'enzyme

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 renfermant :

- de la flavine adenine dinucléotide (FAD) 10 μM
- de la leupeptine 10 μM
- de l'acide éthylène diamine tetra-acétique (EDTA) 3 mM
- du KNO_3 0,1 M
- du Polyvinylpyrrolidone (Polyclar AT insoluble) à 5 % puis elles sont broyées à l'aide d'un broyeur Ultraturax pendant 90 sec, 60 sec et 30 sec (à

demi vitesse). Le broyat est ensuite centrifugé pendant 20 min à 27000 g (Sorvall rotor SS 34), le surnageant recueilli constitue l'extrait protéique brut. Toutes ces opérations d'extraction de l'enzyme sont effectuées à une température voisine de 4° C.

2.2. Mesure de l'activité NADH-NR

- 100 µl d'extrait brut obtenu sont ajoutés au milieu d'incubation formé par
- 1 ml de tampon phosphate 0,05 M pH 7,5 - FAD 10 µM - EDTA 3mM
 - 100 µl de KNO₃ 0,1 M
 - 200 µl NADH(1mM)

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 de diazotation des nitrites.

Le NADH peut interférer avec la lecture du nitrite (NICHOLAS et HEWITT, 1964), aussi 100 µl d'alcool déshydrogénase (ADH) 2 mg/ml et 100 µl d'acétaldéhyde (5,6 ml/100 ml H₂O) sont ajoutés 1 min. avant les réactifs du nitrite.

En effet l'ADH catalyse la réaction :



réaction très rapide qui utilise le NADH restant

2.3. Mesure de l'activité M.VH-NR : activité NR terminale

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

Dans un tube à essai sont introduits :

- 1 ml de tampon Pi 50 mM, FAD 10 µM, EDTA 3 mM pH 7,5
- 0,1 ml KNO₃ 0,1 M
- 0,1 ml d'extrait enzymatique
- 0,1 ml de méthyl viologène (2,5 mg/ml d'H₂O)
- 0,1 ml d'une solution de dithionite de Na et de bicarbonate de Na (40 mg + 40 mg)/5 ml H₂O.

Le mélange prend la couleur bleue, le méthyl viologène est sous forme réduite.

L'incubation se fait pendant 15 min. dans un bain marie à 28 ° C et maintenu à l'obscurité. Avant la révélation du nitrite, les tubes sont

vigoureusement agités pour obtenir la forme oxydée du méthyl viologène (incolore). Puis le nitrite est dosé selon la méthode habituelle.

III - PURIFICATION DE LA NITRATE REDUCTASE

L'extraction de l'enzyme aboutit à l'obtention d'un extrait brut qui constitue l'extrait enzymatique global, il est alors procédé à un fractionnement grossier des macromolécules de cet extrait par le sulfate d'ammonium. Lorsque la concentration de celui-ci atteint 45 % de sa saturation la NR est précipitée. Cette fraction protéique est dissoute dans du tampon Pi 10 mM pH 7,5, elle est ensuite agitée pendant 60 min. et à 4° C avec une suspension de bleu Sephadex préparée selon la méthode de BOHME *et al.* (1972). Le tout est ensuite filtré et le gel recueilli est introduit dans une colonne de 20 cm de long et 2 cm de diamètre, puis lavé par du tampon jusqu'à ce que l'absorbance lue à 280 nm atteigne zéro.

La NR est alors éluee par du NADH (150 μ M), l'éluat présentant une activité NR est concentré contre du Polyéthylène glycol (PEG 6000) à 40 % pendant 2 à 3 heures. Cette fraction présentant une activité NR est déposée au sommet d'une colonne contenant un gel d'hydroxyapatite et la NR est éluee lorsque la molarité en phosphate du tampon d'élution atteint 100 mM. La NR purifiée est alors stockée à -20° C, elle servira à l'immunisation des lapins afin d'obtenir des anticorps polyclonaux spécifiques de la NR d'endive.

IV - ANALYSES IMMUNOLOGIQUES

1 - OBTENTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX DIRIGES CONTRE LA NR DE L'ENDIVE

Une série de 4 injections sous cutanées, sont effectuées à une semaine d'intervalle chez des lapins (variété : géant de Flandres). Chaque fraction contient 0,12 mg de protéine enzymatique émulsifiée par l'adjuvant complet de Freund.

10 jours après la dernière injection le lapin est saigné ; le sérum recueilli est utilisé avec ou sans purification ultérieure.

2 - Immunodiffusion selon OUCHTERLONY (1949)

Une plaque d'agarose sèche prête à l'emploi (Sebia) est trempée pendant 1 heure dans de l'eau distillée, puis dans une solution de tampon veronal HCl 15 mM pH 8,6 pendant 15 min., la plaque imbibée d'eau présente 6 puits périphériques autour d'un puits central, l'immunsérum est généralement déposé au centre, les différentes solutions d'antigène à la périphérie.

Les plaques sont ensuite maintenues pendant 24 heures dans une chambre humide, puis lavées pendant plusieurs heures par une solution de NaCl 0,9 %.

L'agar est ensuite amené à siccité totale, les protéines sont colorées par une solution de bleu de Coomassie.

3-Immunoélectrophorèse (GRABAR et WILLIAMS, 1953)

Une plaque d'agarose sèche (Sebia) est mise dans l'eau distillée pendant une heure puis dans du tampon véronal pendant 15 min.. Cette plaque présente un puits et une gouttière.

Environ 0,01 ml d'une solution d'antigène sont déposés dans le puits, on procède alors à une électrophorèse à 4° C sous un voltage de 6 V par cm (36 V pendant 90 à 120 min.). Après migration des protéines, la gouttière est emplie d'immunsérum qui diffuse pendant 24 heures dans une chambre humide. Les plaques sont ensuite lavées par du NaCl à 0,9% puis séchées. Les protéines sont révélées par le bleu de Coomassie.

V - DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines sont dosées selon la méthode de LOWRY *et al.* (1951) dans les extraits totaux ou par la méthode de BRADFORD modifiée (1976) (Biorad).

1 - METHODE DE LOWRY

L'extraction est réalisée sur 50 mg d'échantillon préalablement lyophilisé et broyé ou sur 1 g de matériel frais. Le matériel végétal est agité dans 10 ml d'acide trichloracétique à 10 % et abandonné à 4° C pendant une

nuit. Après centrifugation le culot (fraction acidoprécipitable) est remis en suspension dans 10 ml d'éthanol à 80 %, saturé en acétate de sodium, pendant 10 min.. Après une nouvelle centrifugation, il est remis en suspension dans de l'éthanol absolu puis centrifugé de nouveau.

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

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

2 - METHODE DE BRADFORD MODIFIEE

Dans les extraits partiellement purifiés, les protéines sont dosées par la méthode de BRADFORD (1976) modifiée (micro et macromethodes de Biorad).

VI - DOSAGE DU NITRATE DANS LE MILIEU DE CULTURE ET DANS LES CELLULES

Le nitrate du milieu est dosé par la méthode YOUNG (1973) qui consiste en une réduction quantitative du nitrate en nitrite par la poudre de Zinc métallique.

Les cellules isolées du milieu de culture et filtrées sur entonnoir de Büchner sont lyophilisées et 200 mg de matériel sont broyés, mis en suspension dans 6 ml d'eau distillée bouillante pendant 15 min. On prélève 3 ml de la solution obtenue et on ajoute 6 ml de NH₄OH 2,2 N et 90 mg de poudre de zinc. Après une agitation vigoureuse d'environ 3 min., le zinc est décanté et 3 prélèvements de 2 ml sont effectués afin de doser le nitrite formé, selon la méthode habituelle de dosage de NO₂⁻ à 540 nm.

VII - DOSAGE DE L'AMMONIUM DANS LE MILIEU DE CULTURE ET DANS LES CELLULES

Le milieu de culture étant dilué au 40ème, l'ammonium est dosé colorimétriquement à l'aide du réactif de Nessler à 420 nm.

Des cellules, l'ammonium est extrait de la même manière que le nitrate, le dosage se fait par la méthode colorimétrique à l'aide du réactif de Nessler à 420 nm.

VIII- EXTRACTION ET DOSAGE DES GLUCIDES

1 - DES CELLULES

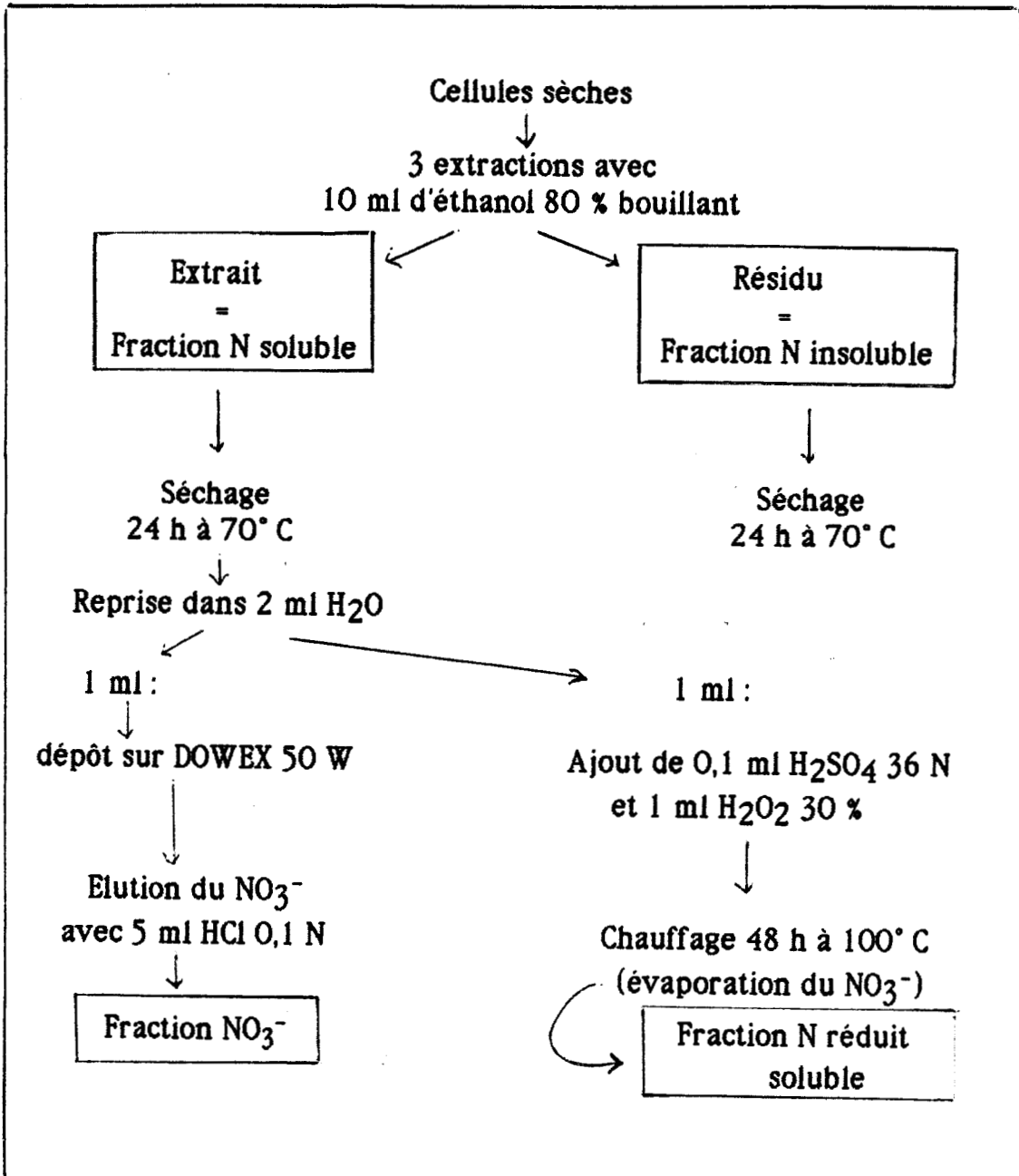
La technique d'extraction des glucides intratissulaires que nous avons utilisée s'inspire de celle mise au point par FIALA et JOLIVET,(1980). Un échantillon de 1 g de cellules congelées est mis en suspension dans 10 ml d'eau bouillante pendant 15min. L'extrait aqueux est recueilli après filtration, le résidu cellulaire est remis dans 10 ml d'éthanol à 80 % et à 70° C pendant 8 min. Les extraits alcooliques et aqueux sont rassemblés, le mélange est laissé une nuit à -18° C, un précipité se forme, il est isolé de l'extrait par une centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes.

Le surnageant constitue la fraction des glucides alcool-solubles (glucose, fructose, saccharose) et des glucides hydrosolubles (polyfructosanes).

Après évaporation, le résidu sec est repris dans 5 ml d'eau distillée. La solution conservée au froid (4° C) sera filtrée sur membrane Millipore (0,45 µm) avant analyse par C.L.H.P.

2 - DU MILIEU DE CULTURE

Le milieu de culture étant riche en éléments minéraux, 2 ml de la solution nutritive sont déposés au sommet d'une colonne DOWEX 50 (H⁺). Les cations sont retenus, les sucres sont récupérés dans les 5 premiers ml de l'effluent (H₂O). L'analyse des sucres se fait après filtration de l'effluent sur membrane Millipore (0,45 µm).



3 - ANALYSES PAR C.L.H.P.

Les glucides du milieu ou intracellulaires sont analysés par C.H.L.P. (chromatographie liquide à haute pression). L'appareil utilisé (SHIMADZU, modèle LC-GA) est équipé d'un détecteur réfractométrique différentiel KNAUER (type 198) et d'une colonne (6,5 x 300 mm) de microgel d'échange d'ions (Water Sugar pack 1). l'élution se fait à 85° C avec de l'eau distillée à un débit de 0,5 ml. min. l⁻¹.

4 - ETALONNAGE

La solution d'étalonnage de la colonne comprend de l'inuline, du saccharose, du glucose et du fructose, tous à une concentration de 2 mg. ml⁻¹.

Le chromatogramme du mélange étalon permet de séparer quatre pics bien individualisés selon l'ordre d'élution suivant : inuline, saccharose, glucose et fructose.

IX- SEPARATION DES FRACTIONS AZOTEES

La détermination de l'azote total et des fractions de l'azote combiné est effectuée selon la méthode utilisée dans le laboratoire de Physiologie et biochimie végétales de Montpellier (INRA).

Elle peut être schématisée de la façon suivante : (encart ci-contre).

1 - SEPARATION DES FRACTIONS AZOTEES SOLUBLE OU INSOLUBLE

Le matériel végétal lyophilisé est soumis à trois extractions consécutives de 10 min chacune avec 10 ml d'éthanol 80 % bouillant. Le résidu d'extraction contenant la fraction azote insoluble (essentiellement protéique) est ensuite séché pendant 2 heures à 70° C. Les 30 ml d'extrait alcoolique, contenant la fraction azote soluble (principalement acides aminés + nitrate) sont également évaporés à 70° C puis le résidu est repris dans 2 ml d'eau distillée.

2 - SEPARATION DES FRACTIONS : AZOTE REDUIT SOLUBLE ET NITRATE

Le nitrate contenu dans la fraction azotée soluble est séparé de l'azote réduit (acides aminés). Un ml de la fraction azote soluble est déposé sur une résine échangeuse d'ions DOWEX 50W (H⁺), le nitrate est ensuite élué par 5 ml d' HCl 0,1 N ; et ainsi séparé des acides aminés qui restent fixés sur la résine.

La fraction azote réduit soluble est obtenue en éliminant le nitrate de la fraction azote soluble selon la méthode décrite par PACE et al. (1982). A 1 ml de la fraction azotée soluble, sont ajoutés 1 ml de H₂O₂ (30 %) et 0,1 ml de H₂SO₄ 36 N. Le mélange est ensuite chauffé pendant 48 heures à une température voisine de 100° C, ce qui provoque l'évaporation du nitrate présent.

3 - DOSAGES DES FRACTIONS AZOTEES

3.1 - Nitrate

Le nitrate des cellules est dosé sur du matériel lyophilisé. Il est extrait par 10 ml d' HCl 0,1 N pendant 24 heures à 4° C, puis dosé colorimétriquement à l'aide d'une chaîne automatique comportant une colonne réductrice de cadmium (HENRICKSEN et SEMEROLSEN, 1970).

La teneur est exprimée en µmoles NO₃⁻ par gramme de matière fraîche.

3-2 - AZOTE REDUIT

La teneur en azote réduit total des cellules est déterminée par dosage de l'ammonium obtenu après minéralisation des fractions d'azote réduit soluble et insoluble par la méthode de Kjeldahl.

La minéralisation s'effectue en présence de 2 ml de H₂SO₄ 36 N, de 150 mg (environ) de catalyseur de minéralisation contenant du sulfate de cuivre, du sulfate de potassium et du sélénium (20-80-5), ce mélange est chauffé progressivement jusqu'à 350° C pendant 4 heures.

L'ammonium produit est piégé dans 2 ml de HCl 0,1 N après diffusion dans des cellules de Conway (FIEDLER et PROSKCH, 1975). La variabilité des résultats fournis par cette technique impose trois répétitions pour chaque échantillon. Une aliquote de la solution chlorhydrique est utilisée pour

déterminer colorimétriquement la teneur en ammonium (Nessler). La partie restante sert au dosage isotopique du ^{15}N .

3-3 - AZOTE TOTAL

La teneur en azote total des cellules est déterminée par dosage de l'ammonium obtenu après la minéralisation selon Kjeldahl Olsen (GUIRAUD, 1977) de l'azote total des cellules (réduit et non réduit).

3-4 - DOSAGE ISOTOPIQUE DU ^{15}N

La méthode qui a été utilisée est la spectrométrie d'émission moléculaire. Comme toutes les techniques employées pour le dosage du ^{15}N , elle permet la détection de l'azote moléculaire N_2 .

La première étape du dosage isotopique du ^{15}N nécessite donc la transformation de l'azote de l'échantillon (minéral ou organique) en N_2 . Cette transformation (FIEDLER et PROKSCH, 1975 ; GUIRAUD, 1984) est réalisée par la méthode de Dumas qui par combustion sèche en présence de cuivre et d'oxyde de cuivre permet l'obtention d'azote N_2 à partir de l'azote combiné minéral ou organique de l'échantillon utilisé.

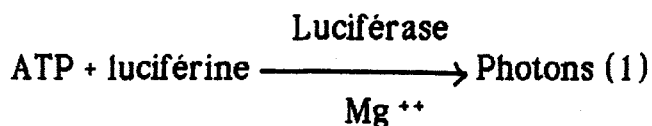
X-MESURE DE LA CHARGE ENERGETIQUE

1- EXTRACTION DES NUCLEOTIDES

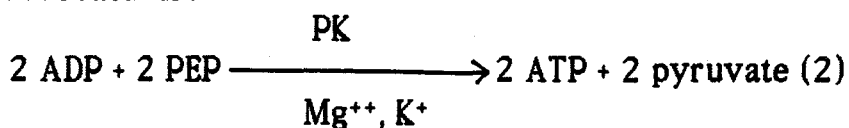
L'extraction se fait selon la méthode de RAYMOND et PRADET, (1980). Les cellules sont filtrées sur un entonnoir de Büchner. Elles sont pesées et immédiatement congelées par de l'azote liquide. Après lyophilisation elles sont conservées à -20°C . Sur 1 gramme de poudre on verse 20 ml d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique (P/V) (TCA) froide. Les tubes sont alors transférés dans de la glace pendant 45 min. afin de permettre l'extraction des nucléotides. Le contenu des tubes est centrifugé à 17300 g pendant 25 min. (centrifugeuse Sorval rotor SS34) à 4°C . Du surnageant on prélève 3 aliquotes de 5 ml, auxquelles on ajoute 35 ml d'éther éthylique froid. Après une agitation de 1 min, on laisse séjourner les tubes à 4°C pendant 15 min. La phase étherée est alors prélevée, elle contient le TCA. La phase aqueuse, qui contient les nucléotides, est traitée de nouveau 2 fois par l'éther. Les extraits aqueux sont amenés à pH 5 à l'aide de soude 0,2 N. Puis les extraits sont conservés à -20°C .

2- DOSAGE DES NUCLEOTIDES

Le dosage de l' ATP au pico ATP biophotomètre (JOBIN et YVON)(PRADET,1967, modifié par SAGLIO *et al.*1979) se fait en présence de luciferine (FLE-50 Sigma) selon la réaction :

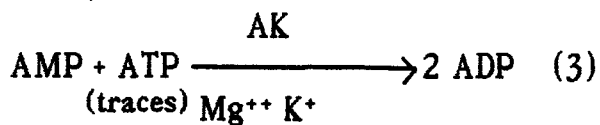


L'ADP est transformé en ATP par la pyruvate kinase (PK) (Sigma P 1506) selon la réaction :



PEP : Phosphoenol pyruvate

Enfin, l'AMP donne de l'ATP selon les 2 réactions suivantes :



AK = adenyate kinase (= Myokinase Sigma M 3003)

l'ADP donne ensuite de l'ATP selon la réaction 2.

RESULTATS

tampon phosphate 0,1 M	Composition du milieu d'incubation		Activité NR $\mu\text{moles NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$	Activité NR en % par rapport au témoin	NO_2^- p.moles/gMF
	KNO_3 0,1 M	propanol			
* 3 V	5 V	0,1 V	2,50	100	98
3 V	5 V	0,05 V	1,68	67	86
3 V	5 V	0	0,62	25	93
8 V	0	0,1 V	1,34	54	82
8 V	0	0	0,17	07	74

* Témoin

Tableau 1 : Mesure *in vitro* de l'activité nitrate réductase des cellules B22 en présence ou en absence de propanol et de KNO_3 . Le nitrite a été dosé dans les cellules après l'incubation.

Chapitre I

**ETUDE DE LA MESURE DE L'ACTIVITE
NITRATE REDUCTASE MESUREE *IN VIVO***

ETUDE DE LA MESURE DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE MESUREE *IN VIVO*

La méthode de JAWORSKI (1971) prévoit l'introduction de nitrate qui sert de substrat à l'enzyme et la présence de propanol qui en modifiant les perméabilités cellulaires favorise en particulier l'influx de NO_3^- et l'efflux de NO_2^- . Cependant, cette méthode a été critiquée pour deux raisons essentielles :

- 1) L'apport du nitrate exogène peut provoquer une augmentation de l'activité NR qui sera donc supérieure à l'activité réelle (*in situ*).
- 2) L'apport de propanol accentue ce phénomène et modifie les compartimentations cellulaires du nitrate. L'activité mesurée n'est donc pas une activité réelle *in situ*. Nous avons donc voulu voir si l'activité NR mesurée *in vivo* était modifiée par des apports de nitrate exogène et par l'introduction de taux variables de propanol, (Tableau 1).

La condition témoin est celle qui correspond à la méthode de JAWORSKI (1971) ; le milieu d'incubation contient 1,25 % de propanol. Après un barbotage d'azote pendant 30 secondes, le tube est mis à l'obscurité et à 27° C pour 20 minutes. L'activité NR est alors de 2,5 $\mu\text{moles NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$ (Tableau 1).

En absence de nitrate et de propanol, condition qui se rapproche de la méthode *in situ* décrite par ROBIN (1983), l'activité nitrate réductase n'est que de 0,2 $\mu\text{mole NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$. L'addition de propanol (1,25 %) permet une activité NR qui atteint 54 % de l'activité témoin, lorsque le taux en propanol est réduit de moitié dans le milieu d'incubation (0,6 %), l'activité NR mesurée est alors de 1,70 $\mu\text{moles NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$ (33 % de l'activité témoin).

En absence d'alcool et en présence de nitrate (62,5 mM), les cellules d'endive ne manifestent qu'une faible activité qui correspond à la formation de 0,62 $\mu\text{mole NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$, soit 25 % de l'activité NR mesurée en condition témoin. Ces résultats montrent que le propanol agirait en modifiant la compartimentation cellulaire du nitrate, sa présence dans le milieu d'incubation favorise apparemment une remobilisation du nitrate interne. L'activité de réduction de la NR utilise aussi bien le nitrate interne qu'externe.

Comme le nitrite formé est révélé dans le milieu d'incubation, nous nous sommes demandé si en absence de propanol, le nitrite qui serait formé pendant la réduction du nitrate ne pouvait pas s'accumuler dans les cellules sans pouvoir traverser la membrane cellulaire. Nous avons donc procédé à l'extraction du nitrite de cellules qui ont été incubées : l'extraction se fait pendant 10 minutes à l'eau chaude (70° C); le nitrite est dosé colorimétriquement et les résultats obtenus montrent que quelle que soit la composition du milieu d'incubation, le taux du nitrite dans les cellules est à la fois très faible et ne varie pas d'une condition expérimentale à l'autre. Par conséquent la faiblesse de l'activité NR mesurée en absence de propanol n'est pas due à une rétention du nitrite par la cellule. L'activité NR mesurée par la méthode *in vivo* est effectivement surestimée.

En absence et de propanol et de nitrate dans le milieu d'incubation, l'activité mesurée est une activité que nous pouvons qualifier d'*in situ*. L'enzyme réduit alors le nitrate "endogène" dont elle dispose. L'addition de propanol à des taux de 1,25 % et 0,6 % permet une activité NR plus élevée. Si on admet que l'addition du propanol se manifeste par l'augmentation ou par une modification de la perméabilité membranaire, il faut admettre l'existence d'une compartimentation du nitrate dans la cellule. L'addition de propanol entraîne donc bien une modification de la répartition du nitrate qui devient alors disponible pour la réduction.

L'addition de propanol provoque une augmentation de l'activité NR supérieure à celle obtenue par l'adjonction de nitrate seul. On peut donc penser que la présence de propanol dans le milieu d'incubation permet d'abord une remobilisation du nitrate interne qui dans les conditions physiologiques normales n'est pas ou pas entièrement accessible à la réduction.

Chapitre II

ESSAIS D'EXTRACTION DE LA NITRATE REDUCTASE D'ENDIVE

- 1 - DANS LA RACINE MATURE**
- 2 - DANS LA SUSPENSION CELLULAIRE**

ESSAIS D'EXTRACTION DE LA NITRATE REDUCTASE D'ENDIVE

1 - DANS LA RACINE MATURE

Dans un premier temps, du tampon phosphate 50 mM à pH 7,5 a été utilisé à raison de 3 ml par gramme de matière fraîche, l'activité NR mesurée *in vitro* n'est pas décelable.

Pour protéger et stabiliser l'enzyme, le changement de pH du tampon d'extraction et l'addition de substances telles que le FAD (10 μ M), la leupeptine (10 μ M), la caséine (3 %), le polyvinylpyrrolidone (PVP) insoluble (polyclar AT) (5 %) se sont révélés sans effet.

Lors du broyage des tissus, les extraits cellulaires prennent rapidement une coloration brune, l'enzyme peut être inactivée par des produits d'oxydation de composés phénoliques. On sait en effet que les quinones peuvent contracter des liaisons covalentes avec les protéines et inactiver les enzymes.

L'addition du PVP insoluble (Polyclar AT) (5 %) qui possède des propriétés antioxydantes et inhibe l'oxydation de composés phénoliques dans le tampon d'extraction n'a pas permis la révélation de l'activité NR mesurée *in vitro* pourtant, DORCHIES (1984) a pu détecter l'activité NR mesurée *in vitro* à partir des racines secondaires d'endive en utilisant le PVP insoluble. Il semble alors que c'est la teneur importante en composés phénoliques et leur libération après le broyage des tissus qui empêchent l'apparition de l'activité enzymatique.

Plusieurs modifications ont été effectuées pour améliorer le tampon d'extraction ; addition de B mercaptoethanol (10mM), de dithiotreitol (3 mM), de la glutamine (0,1 M) pourtant l'activité NR mesurée *in vitro* n'a jamais été décelée (Tableau 2).

	PVP 5% (P/V) %	Mercaptoethanol 10 mM	Dithiotreitol 3 mM	Glutamine 0,1 M
Activité NADH-NR en μ moles NO ₂ -h-1g-1MF	0	0	0	0

Le tampon d'extraction utilisé est :
tampon phosphate 100 mM, pH 7,5, FAD 10 μ M, leupeptine 10 μ M.

Tableau 2 : Essais d'extraction de la nitrate réductase de la racine mûre d'endive en présence de PVP insoluble, de mercaptoethanol, de dithiotreitol, ou de glutamine dans le tampon d'extraction.

L'instabilité de l'enzyme nitrate réductase peut être également due au fait que le broyage des tissus libère des protéases qui se trouveraient normalement dans des compartiments cellulaires distincts des sites de réduction du nitrate. On sait en effet que l'activité protéasique des tissus de végétaux supérieurs est essentiellement due à des protéases dont le maximum d'activité se situe à des pH neutres ou acides. Ainsi, le tampon d'extraction a été amené à un pH basique ; 8,4 et additionné de leupeptine (10 μ M) inhibiteur de protéases à cystéine, de la caséine 3 % qui constitue un substrat pour les protéases et qui exercerait une action antioxydante des composés phénoliques. L'utilisation de ce tampon d'extraction: tampon phosphate $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$, 50 mM, pH 8,4 ; leupeptine 10 μ M ; FAD 10 μ M ; caséine 3 % ; EDTA 1 mM n'a pas permis la révélation de l'activité nitrate réductase mesurée *in vitro*

Lors du broyage des tissus, l'oxydation des composés phénoliques peut aussi aboutir à la surréduction de l'enzyme qui n'est active que sous sa forme oxydée. Le ferricyanure de potassium est capable de réactiver des enzymes réduites chez les algues, son utilisation à 0,3 mM dans l'extrait enzymatique n'a donné aucun résultat.

Ainsi les essais de purification de l'enzyme ont échoué par l'impossibilité de stabiliser la nitrate réductase dans les racines matures.

2 - DANS LA SUSPENSION CELLULAIRE D'ENDIVE

Comme la suspension cellulaire d'endive semble moins riche en composés phénoliques que les racines, nous avons tenté d'en extraire la nitrate réductase.

Nous avons d'abord utilisé un tampon d'extraction contenant du FAD qui semble stabiliser la conformation du site actif de l'enzyme et qui empêche la dénaturation thermique de la nitrate réductase (JONES et MHUIMHNEACHAIN, 1984) ; tampon phosphate $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}/\text{PO}_4\text{KH}_2$ 0,1 M ; pH 8,4, FAD 10 μ M. Lors du broyage des cellules, l'extrait cellulaire brunit rapidement et l'activité NR mesurée *in vitro* n'est pas décelable, sans doute à cause de l'oxydation des composés phénoliques.

Le PVP insoluble (Polyclar AT) possède des propriétés antioxydantes et inhibe par conséquent l'oxydation des composés phénoliques (KLEPPER et HAGEMAN, 1969). Le tableau 3 montre que son utilisation lors de l'extraction

	EDTA en mM				
	0	1	3	5	10
Activité NR $\mu\text{moles NO}_2\text{-g}^{-1}\text{MF.h}^{-1}$	1,53	195,	2,55	2,30	1,89

Le tampon d'extraction utilisé est :
 Tampon Pi 20 mM ; pH 8,4 ; FAD 10 μM ;
 Leupeptine 10 μM ; SAB 3 % + EDTA

Tableau 6 : Influence de la teneur en EDTA du tampon d'extraction sur l'activité NR mesurée *in vitro*

	Composition du tampon d'extraction Tampon Pi 20 mM ; pH 8,4 ; FAD 10 μM ; leupeptine 10 μM KNO_3 0,1 M ; EDTA 3 mM +				
	Caséine 3 %	SAB 3 %	PVP (AT) 5 %	TPCK 1 mM	TLCK 1
Activité NR $\mu\text{moles NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$	1,50	2,68	3,21	0	0,53

Tableau 7 : Comparaison de l'effet de la SAB (3 %), du PVP (5 %), de la caséine (3 %), du TPCK (1 mM) et du TLCK (1 mM) sur l'activité NR mesurée *in vitro*

de l'enzyme préserve l'activité NR et que son effet augmente avec sa teneur dans le tampon d'extraction. A 5 % dans le tampon d'extraction, l'activité NR correspond à la formation de $2,90 \mu\text{moles NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$.

	PVP Insoluble en % (P/V)			
	0	1	3	5
Activité NR $\mu\text{moles NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$.	0	1,30	2,02	2,90

Le tampon d'extraction utilisé est :
 Tampon Pi 20 mM ; pH 8,4 ; FAD 10 μM ;
 Leupeptine 10 μM + PVP insoluble

Tableau 3 : Influence du taux du Polyclar AT dans le tampon d'extraction sur l'activité nitrate réductase mesurée *in vitro*.

La sérum albumine bovine (SAB) qui sert souvent de substrat aux protéases est aussi connue pour son rôle de protection de l'enzyme contre l'action de composés phénoliques (ROBIN, 1979 ; SHERRARD et DALLING, 1978 ; SCHRADER et al., 1974). Ainsi le tableau 5 montre qu'aucune activité NR ne peut être mesurée en absence de SAB (2 %). Des concentrations croissantes de SAB dans le tampon d'extraction permettent d'obtenir une activité NR accrue (Tableau 4).

Composition du tampon d'extraction	Activité NR * $\mu\text{moles NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF.h}^{-1}$			
	0	NADH en mM		
		0,65	1,3	2,6
Tampon Pi 20 mM, pH 8,4 FAD 10 μM , Leupeptine 10 μM	0	0	0	0
Tampon Pi 20 mM, pH 8,4 FAD 10 μM , SAB 2 %	0	0,63	0,67	0,70
Tampon Pi 20 μM , pH 8,4 FAD 10 μM , Leupeptine 10 μM , SAB 2 %	0	0,86	1,05	1,18

* L'activité NR est mesurée à pH 7,5

Tableau 4 : Influence de la composition du tampon d'extraction et de la teneur en NADH du milieu d'incubation sur l'activité NR mesurée *in vitro*

Le donneur d'électrons étant le NADH, nous avons mesuré l'activité NR en présence de différentes concentrations de NADH dans le milieu d'incubation (Tableau 5). On peut constater que l'activité la plus élevée est obtenue en utilisant le NADH à la concentration de 2,6 mM au delà de laquelle, il inhibe la nitrate réductase, sans doute par saturation du site NADH.

L'instabilité et l'inactivation de l'enzyme NR peuvent également être dues au fait que le broyage des cellules libère des protéases qui se trouveraient dans des compartiments cellulaires distincts des sites de réduction du nitrate.

Nous avons également utilisé la leupeptine, inhibiteur spécifique des thiol-protéinases (WRAY et KIRK, 1981) qui catalysent la protéolyse de la NR.

A 10 μ M dans le tampon d'extraction, la leupeptine augmente l'activité nitrate réductase des cellules d'endive de 70 % (Tableau 5).

	SAB en % (P/V)			
	0	1	2	3
Activité NR μ moles $\text{NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$	0	0,86	1,18	1,70

Le tampon d'extraction utilisé est :
 Tampon Pi 20 mM ; pH 8,4 ; FAD 10 μ M ;
 Leupeptine 10 μ M ; + SAB

Tableau 5 : Influence du taux de la SAB dans le tampon d'extraction sur l'activité nitrate réductase mesurée *in vitro*

L'EDTA est aussi ajouté au tampon d'extraction, il contribuerait à l'inhibition de NADH oxydases qui pourraient contaminer le milieu d'incubation et il possède également des propriétés inhibitrices des métalloprotéases. Les résultats portés sur le tableau 6 montrent que l'activité NR la plus élevée est obtenue en utilisant l'EDTA à 3 mM dans le tampon d'extraction.

Le remplacement de la SAB par des inhibiteurs de protéases du genre chymotrypsine comme la Tosyl 1-L phenylalanine chloromethyl keton (TPCK) à 1 mM et la N-Tosyl-L-lysinchloromethyl-keton hydrochlorid (TLCK) 1 mM ne protège pas efficacement l'enzyme (Tableau 7).

Si des protéases interviennent vraiment dans la dégradation de l'enzyme, elles ne sont pas du type chymotrypsine (Tableau 7).

La caséine comme la SAB, sert de substrat à diverses protéases et ainsi protège l'activité NR (ROBIN, 1979 ; SHERRARD et DALLING, 1978 ; SCHRADER et al., 1974). Lorsque la SAB est remplacée par la caséine 3 % dans le tampon d'extraction l'activité NR est réduite de 45 % alors que le PVP insoluble (Polyclar AT) l'augmente de 20 % (Tableau 7).

D'après ces résultats, les activités enzymatiques les plus élevées sont obtenues en utilisant des substances qui possèdent des propriétés antioxydantes et qui inhibent l'oxydation des composés phénoliques comme le PVP (5 %) et la SAB (3 %).

Dans la suspension cellulaire d'endive, la disparition de l'activité NR mesurée *in vitro* est donc due plus à l'oxydation des composés phénoliques qu'à la protéolyse.

Enfin le nitrate semble protéger le site actif de la nitrate réductase. Des mesures d'activité enzymatique ont été effectuées en présence de diverses concentrations de KNO_3 . La présence du nitrate dans le tampon d'extraction augmente l'activité NR mesurée *in vitro* (Tableau 8). La plus forte activité est obtenue en employant le nitrate à la concentration de 0,1 M, au delà, la NR est inhibée sans doute parce que le substrat sature l'enzyme.

	KNO_3 en M			
	0	0,05	0,10	0,20
Activité NR $\mu\text{moles NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$	2,62	3,14	4,22	1,08

Le tampon d'extraction utilisé est :
 Tampon Pi 20 mM ; pH 8,4 ; FAD 10 μM ;
 Leupeptine 10 μM ; SAB 3 % ; EDTA 3 mM + KNO_3

Tableau 8 : Influence de la teneur en KNO_3 du tampon d'extraction sur l'activité NR mesurée *in vitro*

Ces résultats ont donc permis d'établir un tampon d'extraction qui préserve le plus d'activité nitrate réductase, sa composition est la suivante :

- tampon phosphate $\text{PO}_4\text{KH}_2/\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ 20 mM, pH 8,4
- FAD 10 μM
- Leupeptine 10 μM
- EDTA 3 mM
- KNO_3 0,1 M
- PVP insoluble (Polyclar AT) 5 % ou SAB 3 %.

Chapitre III

PURIFICATION DE L'ENZYME

	Activité NADH-NR	Activité spécifique	Taux de purification
Extrait brut	4,16	0,00056	1,00
Précipitation protéique au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 50 %	2,89	0,0018	3,21
Bleu Sephadex élution:NADH 150 μM	0,90	0,1320	236,00
Ultrogel élution:Pi 100 mM	0,22	0,2444	436,00

Tableau 9 : Purification de la nitrate réductase des cellules d'endive par chromatographie sur Bleu Séphadex suivie par une chromatographie sur gel d'hydroxyapatite

L'activité NADH-NR est exprimée en $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ M.F.}$
 L'activité spécifique est le rapport de l'activité enzymatique à la quantité de protéines, elle est exprimée en $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ protéines.

Purification de l'enzyme

Nous avons essayé différentes méthodes de purification dont les meilleurs taux ont été obtenus par la méthode de chromatographie d'affinité sur bleu Séphadex (cf. Matériel et Méthodes) suivie d'une chromatographie d'adsorption sur gel hydroxyapatite. Les résultats sont reportés dans le tableau n° 9.

La nitrate réductase ainsi que toutes les enzymes à NADH sont mises au contact du gel et se lient par leur site NADH au ligand (bleu Cibacron) qui est fixé sur la colonne (Séphadex G 200).

Néanmoins des molécules de la nitrate réductase se lient puisque l'élution par du tampon contenant du NADH (150 μM) permet l'obtention d'un pic de protéines qui présente une activité NR correspondant à la formation de 0,6 $\mu\text{mole NO}_2^-$ par heure et par gramme de matière fraîche. Cette fraction contient 4,46 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de protéines et se trouve purifiée 236 fois comparée à l'extrait brut. Cette fraction est concentrée contre du PEG 6000 ou bien contre du saccharose, elle est ensuite déposée au sommet d'une colonne contenant un gel d'hydroxyapatite et la nitrate réductase est éluée lorsque la molarité en phosphate du tampon atteint 100 mM. L'éluat présente une activité NR qui correspond à la formation de 0,16 $\mu\text{mole de NO}_2^-$ par heure et par gramme de matière fraîche et une teneur en protéines de 0,9 $\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$. L'enzyme se trouve donc purifiée 436 fois par rapport à l'extrait brut (tableau 9).

Ce taux de purification étant faible, nous avons essayé de purifier la nitrate réductase des cellules d'endive en une seule étape par immuno-adsorption sur une colonne de Séphadex CNB4 (Sigma) couplé à des immunoglobulines anti NR de l'Épinard. La nitrate réductase des cellules d'endive est effectivement reconnue par les anticorps hétérologues et fixée sur la colonne. Divers moyens d'élution ont été essayés: eau distillée, KNO_3 , MgCl_2 à différentes concentrations. Aucun n'a permis de récupérer l'enzyme qui reste fixée sur le gel. En effet, le prélèvement d'une partie du gel et son incubation montre l'existence d'une activité NR, ce qui veut dire que l'enzyme est toujours fixée dans la colonne.

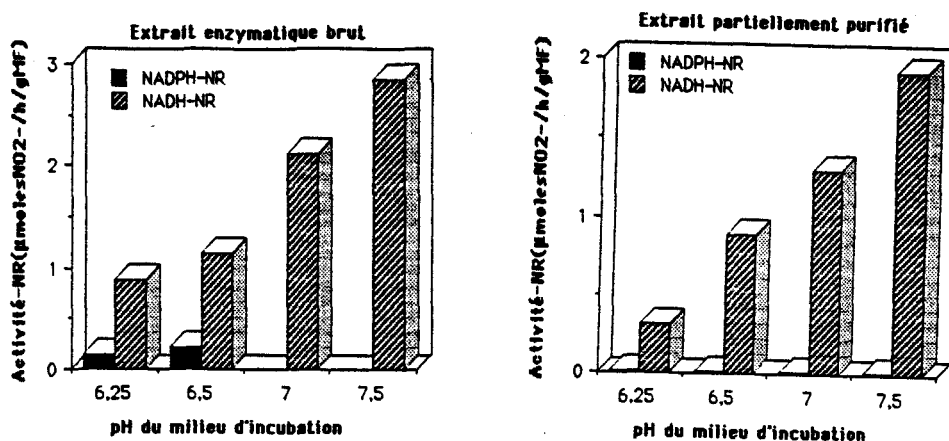
Chapitre IV

ORIGINE DU POUVOIR REDUCTEUR DE LA NITRATE REDUCTASE DE L'ENDIVE

- 1 - Affinité de la nitrate réductase des cellules d'endive pour les nucléotides pyridiniques**
- 2 - Action des inhibiteurs du métabolisme énergétique sur l'activité nitrate réductase des cellules d'endive.**

1 - AFFINITE DE LA NITRATE REDUCTASE DES CELLULES D'ENDIVE POUR LES NUCLEOTIDES PYRIDINIQUES ET LE NITRATE

La nitrate réductase des végétaux supérieurs est active en présence de donneurs d'électrons dont la nature peut varier (NADH_2 , NADPH_2 , FADH_2 , MVH_2). La nitrate réductase des cellules B₂₂ présente une activité NADH:NR (figure 1). En présence de NADPH une activité NR est détectée au pH 6,5 dans un extrait enzymatique brut. Dans un extrait partiellement purifié par chromatographie sur DEAE-cellulose, présentant une activité NADH:NR , quel que soit le pH du milieu réactionnel, aucune activité NADPH-NR n'a été détectée (figure 2).

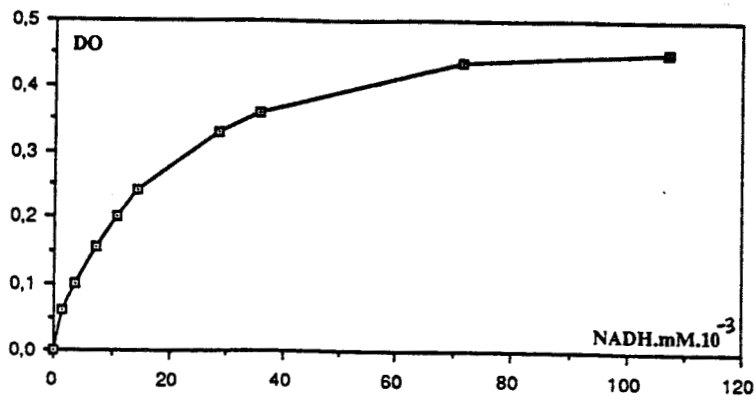


Figures 1 - 2 : Activité nitrate réductase de cellules d'endive de 3 jours, en fonction de la nature du donneur d'électrons et du pH d'incubation.

Nous avons alors mesuré l'affinité de l'enzyme pour le NADH et pour le nitrate en présence de NADH .

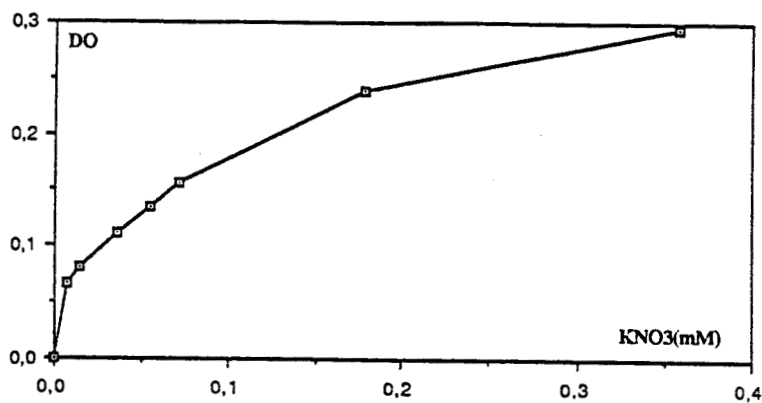
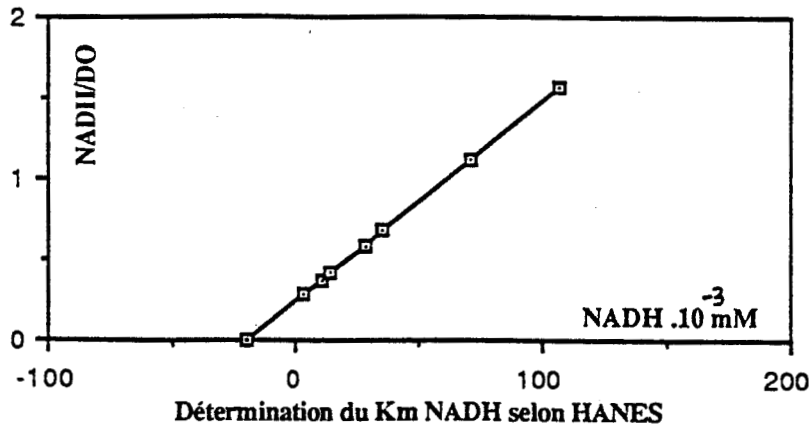
Nous avons utilisé des extraits de cellules de trois jours. La nitrate réductase a été partiellement purifiée par une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose puis précipitée par du sulfate d'ammonium à 50 % de sa saturation ce qui permet la conservation de l'extrait purifié à -20°C

Les figures 3 et 4 montrent que les vitesses de réaction en fonction des concentrations de NADH et de KNO_3 correspondent à une cinétique du type



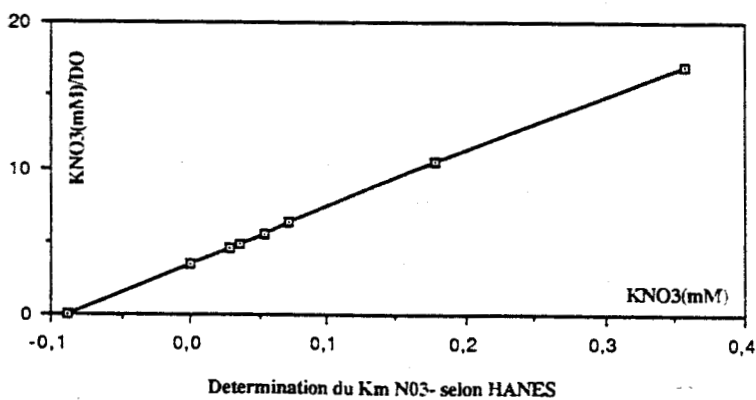
Mesure *in vitro* de l'activité nitrate réductase en fonction de la concentration en NADH, à partir d'extraits chromatographiés sur DEAE-celulose.

Figure 3 :



Mesure *in vitro* de l'activité nitrate réductase en fonction de la concentration en KNO₃, à partir d'extraits chromatographiés sur DEAE-celulose.

Figure 4 :



michaelien. Les constantes d'affinité ont été déterminées selon les représentations de LINEWEAVER et BURK $1/V - f(1/S)$ et de HANES $S/V - f(S)$

Les valeurs des constantes d'affinité pour le NADH sont respectivement $2,2 \cdot 10^{-5}$ M et $2 \cdot 10^{-5}$ M, pour le NO_3^- : $89 \cdot 10^{-6}$ M et $88 \cdot 10^{-6}$ M. Ces deux représentations ne sont que des variantes de la même équation de base $V = V.S / S + K_m$, et pourtant c'est la méthode de HANES qui est considérée donner le tracé le plus précis. Nous adopterons donc les valeurs suivantes :

$K_m \text{ NADH} = 2 \cdot 10^{-5}$ M et $K_m \text{ NO}_3^- = 0,88 \cdot 10^{-4}$ M.

Ces valeurs sont en accord avec la plupart des valeurs trouvées dans la littérature.

2 - ACTION DES INHIBITEURS DU METABOLISME ENERGETIQUE SUR L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE DES CELLULES D'ENDIVE

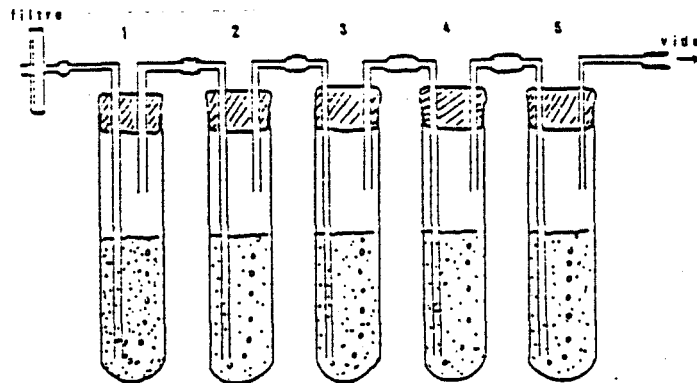
Le NADH est nécessaire à la réduction du nitrate dans les cellules d'endive. Pour étudier son origine, nous avons essayé d'incorporer des inhibiteurs métaboliques qui affectent soit des enzymes de la glycolyse ou du cycle de Krebs, soit le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire (CANVIN et WOO, 1979).

En effet, l'introduction de ces différents inhibiteurs dans le milieu d'incubation de cellules de Silène n'a aucune incidence sur l'activité NR mesurée *in vivo*. Pour que leur action soit effective, il faut mettre en place un dispositif qui permet la préincubation des cellules avant l'incubation proprement dite en vue de la mesure de l'activité enzymatique (RAMBOUR, 1986).

Des cellules cultivées pendant trois jours sont filtrées puis prélevées à un moment où leur activité nitrate réductase est élevée. Après les avoir pesées (1g) elles sont introduites dans des tubes renfermant :

- du tampon phosphate 0,1 M (3 V)
- du KNO_3 0,1 M (5 V)
- de l'éthanol (0,4 V)
- l'inhibiteur (1 mM).

Le volume final est de 20 ml.



Schema n°1:

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 μm) et circule grâce à une légère dépression créée à l'aide d'une trompe à vide.

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

	Activité NR $\mu\text{moles NO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$	% d'activité par rapport au Témoin	* NO_3^- $\mu\text{g/gMF}$
Témoin avant barbotage à l'air	4,3	-	360
Témoin apres barbotage à l'air	4	100	351
Roténone 1 mM	1,6	40	346
Antimycine A 1 mM	4,8	120	351
Iodoacétate 1 mM	1,8	45	432
Acide malonique 1 mM	3,72	93	372

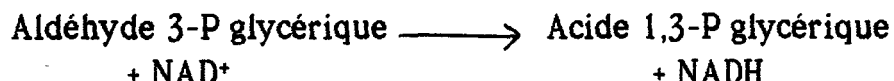
* NO_3^- intracellulaire

Tableau 10 : Action de la roténone, de l'antimycine A, de l'iodoacétate ou de l'acide malonique sur l'activité nitrate réductase de cellules d'endive B22 de 3 jours. L'activité NR est mesurée *in viva*

L'éthanol a pour rôle d'augmenter la pénétration des substances inhibitrices dans les cellules. La préincubation des cellules se déroule pendant deux heures environ, à température ambiante et sous un léger courant d'air stérile (schéma ci-contre). Après le barbotage, les cellules sont prélevées, lavées, filtrées puis pesées pour mesurer l'activité NR *in viva*

Les inhibiteurs utilisés sont :

-L'iodoacétate: il inhibe la glycéraldéhyde 3-P déshydrogénase qui catalyse la réaction:



Cette enzyme est tétramérique. Chaque sous-unité possède un NAD⁺ fortement lié, ce qui constitue une exception parmi les NAD oxydo-réductases. L'iodoacétate qui réagit avec les groupements sulfhydriles de l'enzyme bloque son fonctionnement et empêche la formation de NADH.

- Le malonate inhibiteur de la succinodéshydrogénase.

- La roténone et l'antimycine A qui sont deux inhibiteurs du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire mais qui agissent à des niveaux différents .

Les résultats obtenus montrent que la roténone, l'iodoacétate et le malonate inhibent respectivement l'activité nitrate réductase des cellules d'endive de 60 %, de 55 % et de 7 % alors que l'antimycine A l'augmente de 20 % (Tableau 10).

Les inhibitions dues à la roténone et à l'iodoacétate sont du même ordre de grandeur. L'antimycine A empêche le transfert d'électrons entre le cytochrome b et c (2ème site de conservation de l'énergie). L'inhibition de la phosphorylation oxydative permet une économie de NADH et provoque donc une augmentation de l'activité NR. Par conséquent le NADH utilisé par les cellules d'endive a vraisemblablement une double origine : cytoplasmique et mitochondriale.

Chapitre V

COMPORTEMENT DES CELLULES D'ENDIVE AU COURS DE LA CROISSANCE

- 1 - Croissance des cellules**
 - 1.1. - Phase de latence**
 - 1.2. - Phase de croissance exponentielle**
 - 1.3. - Phase stationnaire**

- 2 - Activité nitrate réductase**

- 3 - Teneurs en nitrate et en ammonium**
 - 3.1. - Dans le milieu de culture**
 - 3.2. - Dans les cellules**

- 4- Teneurs des glucides intra et extracellulaires**
 - 4.1. - Analyse des glucides solubles présents dans le milieu**
 - 4.2. - Analyse des glucides intracellulaires**

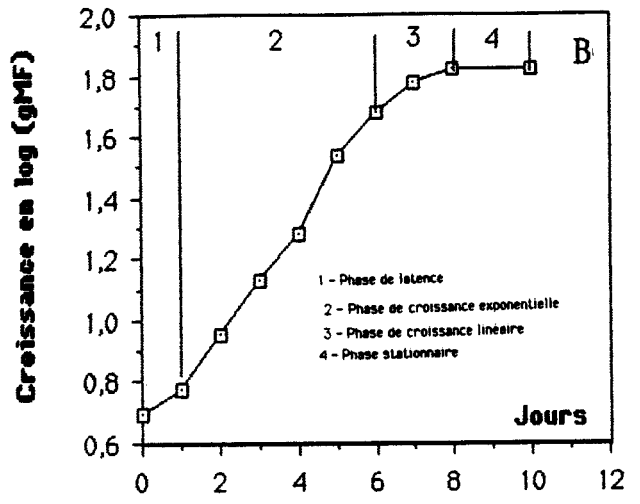
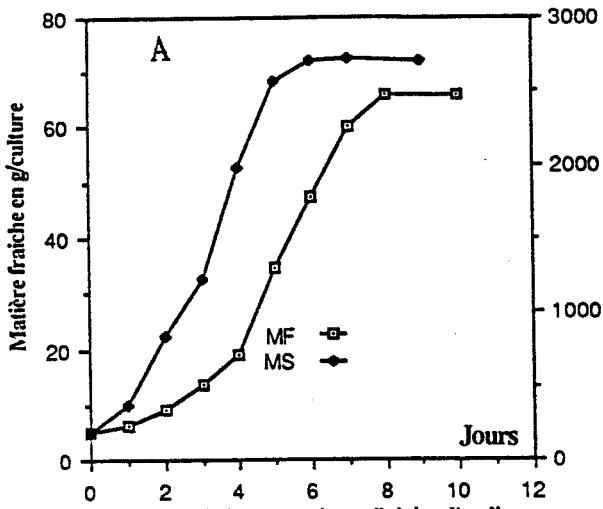


Figure 5 : Croissance de la suspension cellulaire d'endive

Etapes de la croissance des cellules d'endive

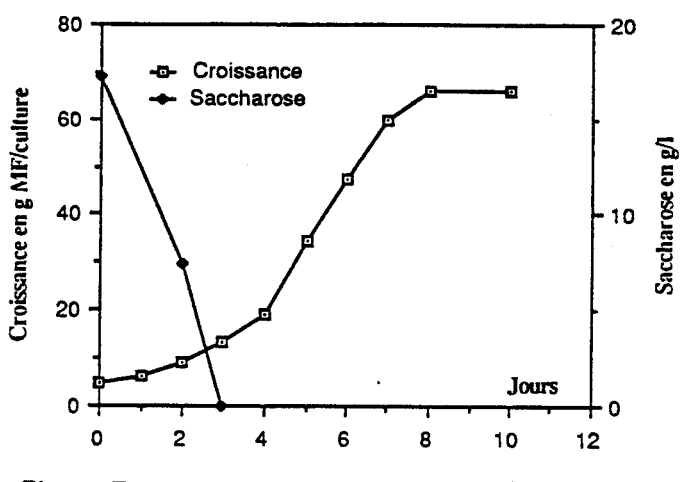
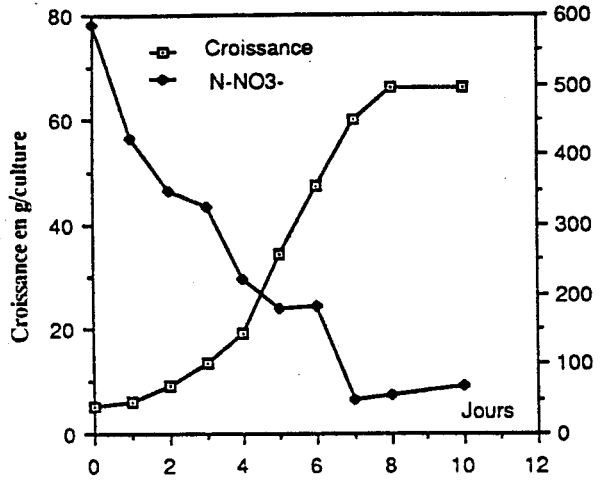


Figure 6 : Evolution de la teneur en N-NO3- dans le milieu au cours de la croissance

Figure 7 : Evolution de la teneur en saccharose du milieu au cours de la croissance

Comportement des cellules d'endive au cours de la croissance

Le milieu de culture des cellules d'endive renferme 39,3 mmoles d'azote nitrique et 20,6 mmoles d'azote ammoniacal par litre, ce milieu est enrichi d'une autre source d'azote ; la glutamine à 500 mg.l⁻¹ soit 6,8 mmoles l⁻¹ d'azote organique.

1 - CROISSANCE DES CELLULES

Les cellules prélevées en phase stationnaire (5 g d'inoculum), sont mises en culture dans un milieu neuf. La courbe de croissance présente les phases habituelles de la croissance (Figure 5 A et B).

1.1. - Phase de latence

Dès la mise en culture, la croissance cellulaire est entamée et n'est décelable qu'assez tardivement, le poids de la matière fraîche ne dépasse pas 6 grammes au bout de 24 heures de culture, ce qui caractérise bien une phase de latence

1.2. - Phases de croissance exponentielle et linéaire

Ces phases sont surtout marquées par une croissance cellulaire rapide. Au septième jour de culture, le poids de la matière fraîche atteint 60 g soit 12 fois la masse à l'ensemencement, le temps de dédoublement est de 32 heures. La matière sèche à 2700 mg présente un facteur de multiplication égal à 15.

Ces phases de croissance sont aussi marquées par la disparition de l'ion nitrique et des sucres du milieu, et leur utilisation par les cellules en voie de croissance (Figures 6 et 7).

1.3. - Phase stationnaire

Cette phase est caractérisée par le fléchissement puis l'arrêt de la croissance (66 g de MF au 8^{ème} et au 10^{ème} jours), événements qui coïncident avec l'épuisement des sucres du milieu et avec l'arrêt d'absorption du nitrate.

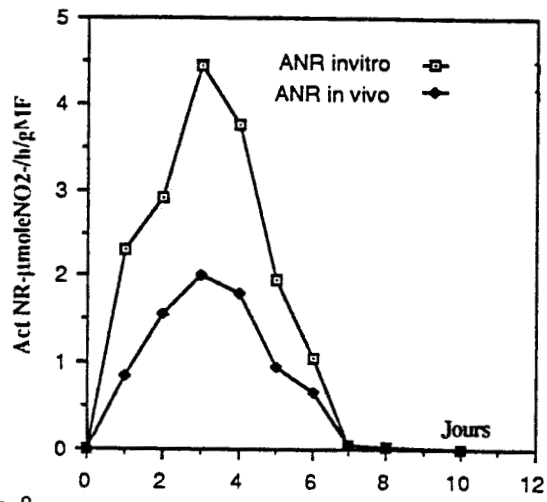


Figure 8 : Evolution de l'activité NR au cours de la croissance

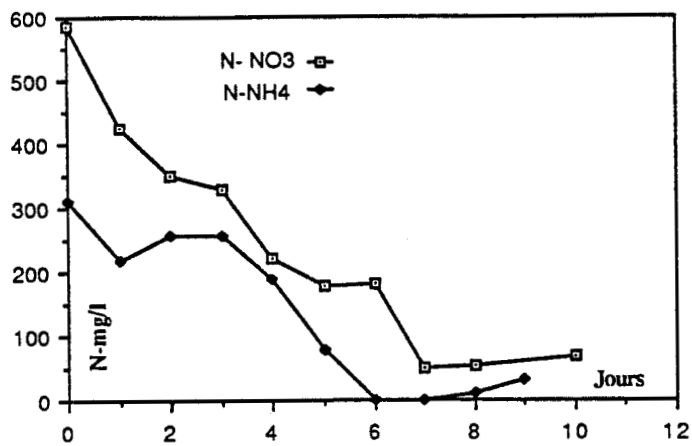


Figure 9 : Evolution de la teneur en azote nitrique et ammoniacal du milieu

2 - ACTIVITE NITRATE REDUCTASE

L'activité nitrate réductase nulle dans les cellules prélevées en phase stationnaire est détectable au bout de six heures de culture, elle augmente ensuite rapidement pour atteindre son maximum au troisième jour ($4,4 \mu\text{moles NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$, activité mesurée *in vitro* et $2 \mu\text{moles NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$, activité mesurée *in vivo*). Elle décline ensuite pour n'être plus mesurable à partir du septième jour de culture, au moment de l'entrée des cellules en phase stationnaire. La figure n°8 montre que les profils d'activité nitrate réductase sont identiques, mais l'activité mesurée *in vitro* est deux fois plus importante que l'activité mesurée *in vivo*.

Des essais de double diffusion selon OUCHTERLONY (1949) ont été effectués à l'aide de deux immunserums anti NR des cellules d'endive. L'un des serums provoque des réactions de précipitation avec des extraits bruts de cellules prélevées après 2., 3., 4 ou 6 jours de culture et qui présentent une activité NR, mais aucune réaction de précipitation n'a été observée avec des extraits de cellules ne présentant pas d'activité de réduction du nitrate. Il y a donc reconnaissance d'un matériel antigénique qui suit l'évolution de l'activité nitrate réductase.

Le second immunserum ne provoque pas de réaction de précipitation mais lorsqu'il est mélangé à des parties aliquotes d'extraits enzymatiques provenant de cellules présentant une activité de réduction du nitrate, il permet une inhibition de l'activité NR *in vitro* par immunoadsorption alors que le premier serum ne le permet pas.

Ces résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence la spécificité de ces serums, leur emploi ultérieur a donc été abandonné.

3- TENEURS EN NITRATE ET EN AMMONIUM

3.1. - Dans le milieu de culture

La disparition du nitrate du milieu de culture s'effectue très rapidement (90 % en sept jours) jusqu'au septième jour où les cellules ne présentent plus d'activité nitrate réductase.

Quant à l'ammonium, sa disparition est lente jusqu'à épuisement total au sixième jour puis l'ion réapparaît dans le milieu pendant la phase stationnaire de la croissance cellulaire (Figure 9).

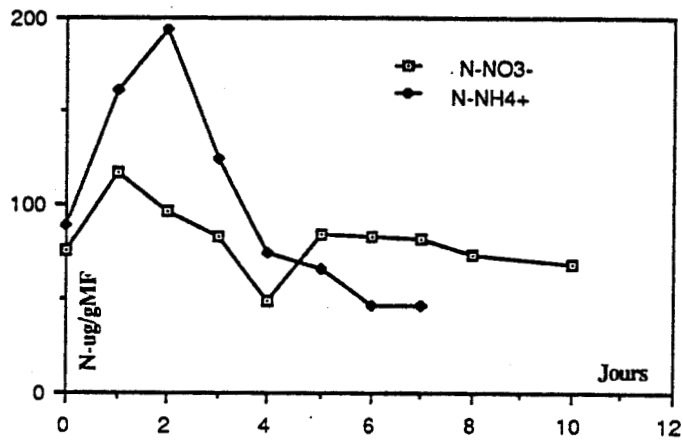


Figure 10 : Teneurs en NH_4^+ et en NO_3^- de cellules d'endive cultivées en présence de NH_4NO_3

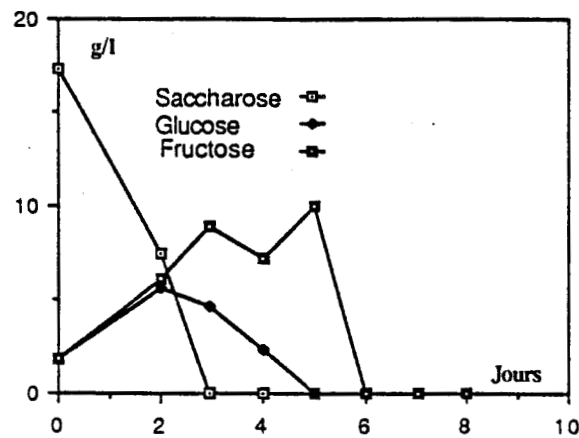


Figure 11 : Evolution de la teneur des glucides solubles dans le milieu de culture au cours de la croissance cellulaire

Jour de culture	Saccharose (g/l)		Glucose + fructose (g/l)	
	dans le milieu	Quantité disparue du milieu	Dans le milieu	Quantité apparue dans le milieu
0	17,3		3,6	
2	7,5	9,8	10,8	7,2
3	0	7,5	14,5	3,7
4	0		9,5	

Tableau 11 : Teneur des glucides solubles dans le milieu de culture

3.2. - Dans les cellules

Avant leur mise en culture, les cellules d'endive prélevées en phase stationnaire contenaient déjà de l'azote nitrique ($76 \mu\text{g.N g}^{-1} \text{MF}$) (Figure 10). Sa teneur augmente rapidement après la mise en culture et atteint un maximum après 24 heures de culture ($117 \mu\text{g.N g}^{-1} \text{MF}$). Elle diminue ensuite au moment où la nitrate réductase est la plus active pendant le cycle de culture. Au 5^{ème} jour, les cellules accumulent le nitrate dont la teneur reste constante jusqu' à la fin de la culture ($73,5 \mu\text{g N g}^{-1} \text{MF}$ au 8^{ème} jour) au moment où l'activité NR n'est plus mesurable.

Dans les cellules et au cours des quatre premiers jours de culture, la teneur en ammonium varie de la même façon que celle du nitrate. A l'ensemencement, les cellules renferment $89 \mu\text{g}$ d'azote ammoniacal par gramme de matière fraîche. Après deux jours de culture, la teneur des cellules en azote ammoniacal atteint $195 \mu\text{g g}^{-1} \text{MF}$, elle diminue ensuite au cours de la croissance cellulaire pour atteindre le taux de $46 \mu\text{g N g}^{-1} \text{MF}$ en fin de culture.

4 - TENEURS DES GLUCIDES INTRA ET EXTRACELLULAIRES

Comme source de carbone, le milieu de culture renferme du saccharose à la concentration de 20 g l^{-1} dont une partie (12,5 %) est hydrolysée en glucose et en fructose au cours de l'autoclavage.

4.1. - Analyse des glucides solubles présents dans le milieu

Dès le début de la culture, la concentration du saccharose diminue rapidement (57 % au 2^{ème} jour) et s'annule au bout de trois jours de culture. En même temps, des sucres réducteurs (glucose et fructose) apparaissent dans le milieu (Figure 11).

Le tableau n° 11 montre que la quantité du saccharose disparue dans le milieu de culture est toujours supérieure à la somme des quantités de fructose et de glucose apparues pendant pendant un ou deux jours de culture.

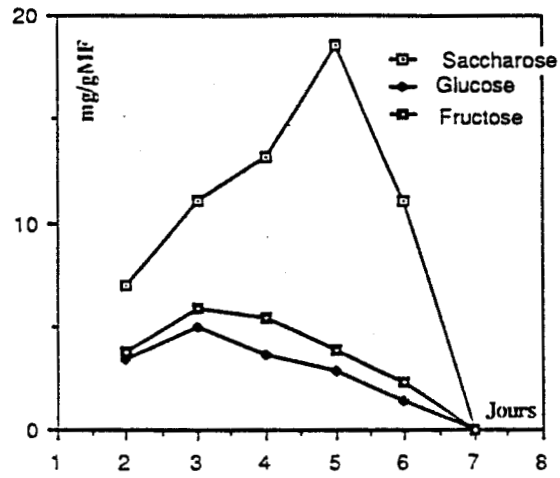


Figure 12 : Teneur des glucides intracellulaires au cours de la croissance

Le saccharose du milieu serait donc hydrolysé en glucose et en fructose que les cellules absorberaient préférentiellement au saccharose.

4. 2 - Analyses des glucides intracellulaires

Les résultats reportés sur la figure 12 montrent que pendant leur culture, les cellules d'endive renferment plus de saccharose que de sucres réducteurs. Le saccharose s'accumule dans les cellules dès le début de culture, sa teneur augmente rapidement, elle culmine au cinquième jour (17,5 mg g⁻¹ MF) et diminue rapidement pour s'annuler au septième jour. Les teneurs de glucose et de fructose intracellulaires présentent un maximum au troisième jour de culture (4,9 et 5,9 mg g⁻¹ MF) au moment où l'activité nitrate réductase des cellules est maximale.

L'étude de l'évolution de la teneur en glucides solubles intracellulaires plaide en faveur d'une synthèse du saccharose à partir du fructose et du glucose, réaction catalysée par une enzyme intracellulaire sans doute une saccharose synthétase ou une invertase alcaline.

5 - CONCLUSION

Les mesures des teneurs en azote nitrique et ammoniacal ainsi que les mesures d'activité nitrate réductase plaident en faveur d'une induction de l'enzyme par son substrat puisque l'apparition de l'activité après la mise en culture (contact avec NO₃⁻) exige toujours une certaine phase de latence. Cette activité est ensuite très élevée juste au début de la phase de croissance exponentielle. En effet, il nous semble logique que la synthèse des protéines nécessaires à la croissance soit précédée ou accompagnée de la réduction du nitrate. Cette activité de réduction est maximale au moment où le taux des sucres réducteurs est le plus important dans les cellules. En effet, le métabolisme glucidique par la voie de la glycolyse permet la formation du NADH qui constitue la principale source du pouvoir réducteur de la nitrate réductase des cellules d'endive.

Chapitre VI

ACTION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE

(ABA)

- 1 - Sur la croissance**
- 2 - Sur l'activité nitrate réductase**
- 3 - Sur l'évolution de la teneur des glucides extra et intracellulaires**
- 4 - Conclusion**

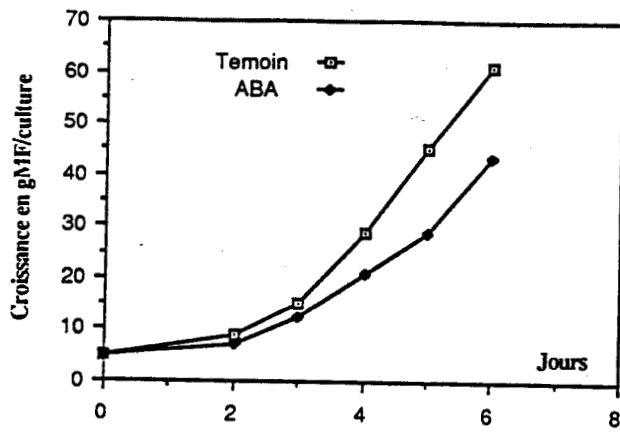


Figure 13 : Influence de l'ABA sur la croissance cellulaire

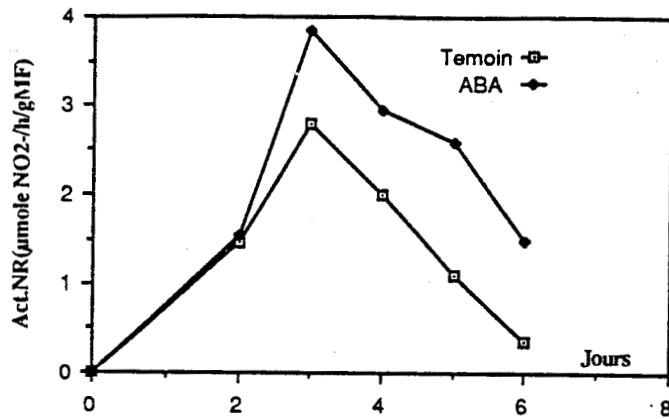


Figure 14 : Action de l'ABA sur l'activité nitrate réductase mesurée in vivo

ACTION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE

Des observations fortuites ont montré que le ralentissement de la croissance des suspensions cellulaires de Silène et de Carotte, s'accompagnait d'une augmentation de l'activité nitrate réductase (RAMBOUR, 1986 ; RAMBAUD, 1986). Nous avons donc suivi le comportement de la suspension cellulaire d'endive lorsque le milieu de culture renferme l'ABA, hormone retardatrice de la croissance.

1 - SUR LA CROISSANCE

Lorsque les cellules d'endive sont mises en culture en présence d'ABA à 10^{-4} M dans le milieu, aucun effet de l'hormone sur la croissance cellulaire n'est détectable au bout de 24 heures de culture. A partir du deuxième jour, l'acide abscissique provoque 30 % d'inhibition de la croissance. Cette inhibition se poursuit pendant la phase de croissance exponentielle et atteint 35 % pendant les quatrième et cinquième jours de culture. A la fin de la culture, la croissance finale de la suspension est réduite de 28 % (figure 13).

2 - SUR L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE

Pendant les deux premiers jours de culture, les cellules traitées par l'ABA présentent la même activité nitrate réductase *in vivo* que les cellules témoins. A partir du troisième jour, dans les cellules cultivées en présence d'ABA, l'activité nitrate réductase est plus importante et plus étalée dans le temps que dans les cellules témoins.

A trois jours de culture, l'ABA provoque une augmentation de 35 % de l'activité nitrate réductase, cette augmentation atteint 135 % au cinquième jour. Après une semaine de culture en présence d'ABA, l'enzyme est encore active ($1,1 \mu\text{mole NO}_2^- \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1} \text{ MF}$) alors que dans les cellules cultivées sur un milieu dépourvu d'acide abscissique, l'activité nitrate réductase n'est pas mesurable (figure 14).

Activités nitrate réductase <i>in vitro</i>			
	NADH:NR	MV:NR	Cytochrome c réductase
Témoin	4,68	5,68	1,36
ABA	6,70	6,43	2,20
ABA/Témoin	1,43	1,13	1,62
* Témoin (KCN 70 μ M)	0,53	0,47	0,33
ABA (KCN 70 μ M)	1,96	1,48	1,60
ABA/ Témoin	3,70	3,15	4,84
** Témoin (KCN 7 μ M)	1,15	1,76	
ABA (KCN 7 μ M)	2,00	2,45	
ABA/ Témoin	1,74	1,40	

* Le cyanure de potassium est ajouté à l'incubation.

** La mesure de l'activité enzymatique est précédée par une préincubation de l'extrait en présence de KCN pendant 90 minutes à 4° C.

Tableau 12 : Mesure *in vitro* des activités NADH:NR, MV:NR et cytochrome c réductase des cellules B₂₂ cultivées en présence ou en absence d'ABA (10^{-4} M). Action du KCN.
Les activités enzymatiques sont mesurées en μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF.

Des mesures *in vitro* de l'activité NR ont également été effectuées avec des extraits bruts obtenus à partir de cellules témoins et à partir de cellules cultivées en présence d'ABA. Les résultats obtenus montrent que les activités NADH:NR, MV:NR et cytochrome c réductase des cellules traitées sont respectivement 1,43; 1,13 et 1,62 fois plus importantes que celles des cellules témoins (tableau 12).

L'ABA provoque donc une augmentation de l'activité NR *in vitro*. Le problème est de savoir si cet effet est dû à une modification de la structure de la NR parce que une disponibilité plus importante en NADH stabilise la structure de l'enzyme ou à une modification du "turnover" de la protéine enzymatique.

Afin de déterminer si l'ABA pouvait intervenir sur la potentialité catalytique de l'enzyme, nous avons fait agir le KCN sur un extrait enzymatique *in vitro*. Les cyanures en réduisant vraisemblablement le Mo, provoquent en effet une inhibition de la NR qui peut être levée du moins chez la Chlorelle par, l'addition de ferricyanure. (LOSADA et al.: 1981)

Lorsque l'enzyme des cellules témoins est mise en incubation pendant 15 minutes en présence de KCN (70 μ M), les activités NADH:NR, MV:NR et cytochrome c réductase sont respectivement 8,8; 12 et 4 fois plus faibles. Lorsque les cellules sont traitées par l'ABA, l'action du KCN est amortie et les activités NADH:NR; MV:NR et cytochrome c réductase ne sont que 3,4; 4,3 et 1,4 fois plus faibles.

Des essais de levées de l'inhibition par l'addition de ferricyanure de potassium à 3 mM sont inefficaces.

Le KCN est ajouté à l'enzyme maintenue à 4°C pendant 90 minutes. Puis une partie aliquote est prélevée et utilisée pour mesurer l'activité NR. Les cellules qui ont été traitées par l'ABA possèdent encore des activités NADH et MV:NR supérieures à celles des cellules témoins.

Les activités sont également accrues dans les cellules témoins qui ont été préincubées avec du KCN. Cette augmentation est peut être due au fait que la concentration en KCN pendant les 15 minutes d'incubation n'est que de 7 μ M.

3 - SUR L'EVOLUTION DE LA TENEUR DES GLUCIDES EXTRA ET INTRACELLULAIRES

Lors de la culture des cellules d'endive dans un milieu habituel, nous avons vu que le saccharose disparaissait rapidement du milieu et qu'il est hydrolysé en glucose et en fructose avant d'être absorbé par les cellules.

En présence d'ABA, l'hydrolyse du saccharose est ralentie, il ne disparaît complètement du milieu qu'au bout de cinq jours de culture (figure 15). Dans ces conditions, la teneur des cellules en saccharose diminue (- 35% au 3ème jour et - 76 % au 5ème jour). Par contre, leur taux en sucres réducteurs (fructose + glucose) est beaucoup plus élevé qu'en absence d'ABA (+ 49 % au 3ème jour et + 105 % au 5ème jour) (Figure 16).

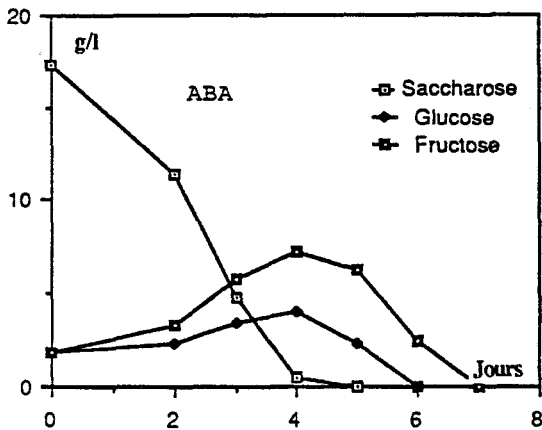


Figure 15 : Evolution de la teneur de glucides solubles dans le milieu de culture en présence d'ABA

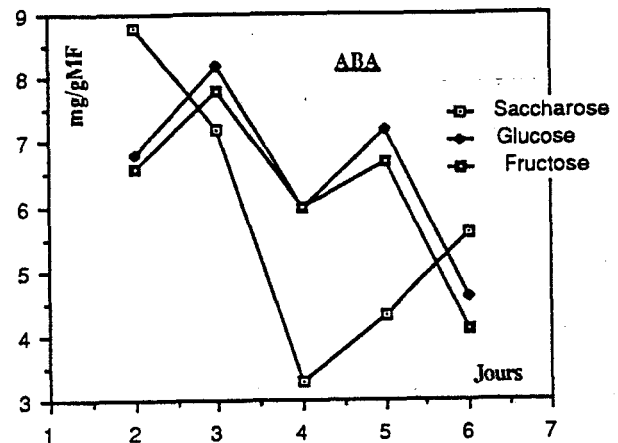


Figure 16 : Teneur des glucides intracellulaires en présence d'ABA dans le milieu de culture

4 - CONCLUSION

A des doses élevées (10^{-4} M), l'acide abscissique ralentit la croissance cellulaire et provoque une réduction de 28 % de la biomasse de la suspension. L'activité nitrate réductase est augmentée.

L'analyse des glucides intra et extracellulaires montre que l'effet de l'ABA n'apparaît qu'après deux jours de culture et ce n'est qu'ensuite que le métabolisme glucidique est modifié. L'ABA ralentit l'hydrolyse du saccharose en inhibant sans doute les invertases acides extracellulaires ou pariétales. L'analyse de la teneur en saccharose des cellules montre qu'il est métabolisé différemment en présence d'ABA. En effet, dans les cellules témoins du saccharose s'accumule, alors que dans les cellules traitées par l'ABA il disparaît progressivement à partir du 2ème jour.

L'action de l'ABA pourrait donc s'exercer au niveau d'une saccharose synthétase ou d'une invertase alcaline intracellulaire.

Chapitre VII

EVOLUTION DE LA CHARGE ENERGETIQUE DES CELLULES D'ENDIVE AU COURS DE LA CROISSANCE

- 1 - Sans ABA dans le milieu de culture**
- 2 - En présence d'ABA dans le milieu de culture**
- 3 - Conclusion**

Durée de la culture en jours	Conditions de culture	en nmoles/gMF				
		ATP	ADP	AMP	Somme P *	C.E. **
2	Témoin	156,07	31,87	20,58	344,00	0,825
	ABA	106,69	23,73	17,25	237,12	0,803
3	Témoin	147,07	19,72	14,46	313,86	0,865
	ABA	136,52	29,13	5,64	302,18	0,882
4	Témoin	105,86	29,44	12,79	241,16	0,814
	ABA	155,01	23,44	13,55	333,47	0,868
5	Témoin	128,00	21,68	8,80	277,65	0,880
	ABA	132,95	27,89	10,71	293,80	0,856
6	Témoin	96,05	15,94	7,34	208,05	0,871
	ABA	85,46	17,55	7,48	188,47	0,854
7	Témoin	-	-	-	-	-
	ABA	98,68	23,56	7,38	220,92	0,850

Tableau 13 : Evolution des teneurs en nucléotides adenylysés et de la charge énergétique des cellules d'endive cultivées en présence ou en absence d'ABA ($10^{-4}M$).

* Somme des liaisons P-P

** charge énergétique = $\frac{(ATP) + 0,5 (ADP)}{(ATP) + (ADP) + AMP}$

EVOLUTION DE LA CHARGE ENERGETIQUE DES CELLULES D'ENDIVE AU COURS DE LA CROISSANCE. ACTION DE L'ABA

La nitrate réductase n'est active qu'en présence de donneurs d'électrons dont la formation dans la cellule utilise les molécules énergétiques. Comme la nitrate réductase des suspensions cellulaires de l'endive est une enzyme à NADH, nous avons voulu savoir si l'accroissement de l'activité nitrate réductase en présence d'ABA ne pouvait pas s'expliquer par une disponibilité accrue de la cellule en nucléotide réduit. Comme la mesure directe du NADH dans un milieu cellulaire est délicate à réaliser nous avons voulu suivre l'évolution de la charge énergétique de cellules cultivées en présence ou en absence d'ABA. Nous avons donc procédé à l'extraction et au dosage des nucléotides adénylés suivants dans les cellules au cours de la croissance : l'ATP, l'ADP et l'AMP. Le rapport $(ATP) + 0,5 (ADP) / (ATP) + (ADP) + (AMP)$ représente la charge énergétique des cellules (ATKINSON, 1968).

1 - SANS ABA DANS LE MILIEU DE CULTURE

Les résultats (Tableau 13) montrent qu'au cours de la croissance cellulaire, la teneur en ATP intracellulaire ainsi que la somme des liaisons énergétiques (P-P) présentent un maximum au 2^{ème} jour de culture (156 nmoles/g MF et 344 nmoles de liaisons P-P). Elles déclinent ensuite régulièrement au cours de la croissance alors que la charge énergétique des cellules reste constante pendant toute la durée de la culture, cette charge a une valeur de l'ordre de 0,85 et traduit donc une activité métabolique importante même en début de la phase stationnaire.

2 - EN PRESENCE D'ABA DANS LE MILIEU DE CULTURE

Le dosage des nucléotides adénylés dans les cellules montre que la teneur en ATP ainsi que la somme des liaisons P-P riches en énergie augmentent progressivement mais moins rapidement que dans la culture témoin et n'atteignent alors leur maximum qu'au quatrième jour (155 nmoles g⁻¹ MF et 335 nmoles de liaisons P-P), c'est à dire deux jours plus tard (Tableau 13). Au sixième jour, la teneur de l'ATP atteint la valeur de 85,5 nmoles g⁻¹ MF, la somme de liaisons P-P est de 188 nmoles.

Là encore, la charge énergétique ne varie pas au cours de la croissance cellulaire, sa valeur (0,84) est identique à celle des cellules cultivées sans ABA.

3 - CONCLUSION

L'évolution de la teneur en ATP des cellules en culture semble être parallèle à l'utilisation des glucides du milieu de culture. Nous avons vu qu'en présence d'ABA les cellules accumulent le glucose et le fructose. Par conséquent, leur métabolisme est ralenti d'où la diminution de la teneur des cellules en ATP. En effet, la formation de l'ATP a lieu dans le cytoplasme lors de la glycolyse et dans la mitochondrie par la phosphorylation oxydative, elle nécessite donc l'apport de glucose ou de fructose.

Chapitre VIII

**ACTION DE L'ABA SUR L'ABSORPTION ET
LA REDUCTION REELLES DU NITRATE**

ACTION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE SUR L'ABSORPTION ET LA REDUCTION REELLES DU NITRATE

Nous avons vu qu'en présence d'ABA dans le milieu de culture, le ralentissement de la croissance cellulaire est accompagné d'une élévation de l'activité NR mesurée par la méthode *in vivo* ou par la méthode *in vitro* ce qui nous a toujours frappé dans la mesure où il nous semblait logique que la réduction du nitrate accompagnât la synthèse des protéines nécessaires à la croissance. Afin de mieux comprendre le mode d'action de l'hormone et parallèlement à l'évolution des sucres dans les cellules et dans le milieu de culture, nous avons procédé à la mesure de la réduction réelle du NO_3^- dans des cellules témoins et dans des cellules dont la croissance était inhibée. Une approche méthodologique originale, mise au point au laboratoire de physiologie et biochimie végétales à l'INRA de Montpellier (GOJON, 1987) faisant appel à des marquages ^{15}N , a été utilisée.

Pendant les deux premiers jours de culture, les cellules sont cultivées dans leur milieu habituel qui contient 550 mg d'azote nitrique (39,3 mM) et 290 mg d'azote ammoniacal par litre (20,7 mM). Pendant le troisième et le quatrième jour, les cellules sont transférées dans un milieu neuf dans lequel l'azote ammoniacal a été remplacé par la même quantité d'azote nitrique. Seul l'azote nitrique a été marqué avec un excès de 10%, ce qui signifie que la quantité de ^{15}N est égale au rapport $(^{15}\text{NO}_3^-) + (^{14}\text{NO}_3^-) / 10$. Nous avons réalisé trois marquages au cours des quatre premiers jours de culture. Le premier marquage a duré 48 heures, les deux suivants ont duré 24 heures chacun.

Au terme de chaque marquage nous avons mesuré l'activité NR par la méthode *in vivo* la croissance cellulaire, la teneur en ^{15}N total, en ^{15}N réduit total et en ^{15}N nitrique accumulé dans les cellules.

Dans la culture témoin (sans ABA dans le milieu) et au cours des deux premiers jours de culture où le milieu contient de l'azote ammoniacal, les cellules d'endive ont absorbé 29,3 μmoles ^{15}N total par gramme de matière fraîche, ensuite et pendant les troisième et quatrième jours de culture lorsque le milieu est dépourvu d'ammonium, les cellules ont absorbé respectivement 26,5 et 27,7 μmoles ^{15}N total par gramme de matière fraîche et par jour.

Période de culture	0 → 2 jours *		2ème → 3ème jour **		3ème → 4ème jour **	
	Témoin	ABA	Témoin	ABA	Témoin	ABA
¹⁵N dans les cellules en $\mu\text{moles g}^{-1}\text{MF}$						
¹⁵N total (absorption)	29,35	25,15	26,53	22,53	27,70	24,30
ABA/Témoins	0,85		0,85		0,88	
¹⁵N réduit	21,20	17,80	19,70	14,50	20,30	16,20
ABA/Témoin	0,88		0,73		0,80	
Taux d'assimilation du nitrate absorbé :						
¹⁵N réduit $\times 100$	72,00	71,00	74,00	64,00	73,00	67,00
¹⁵N total						
¹⁵N accumulé ($^{15}\text{N-NO}_3^-$)	8,92	7,00	7,10	9,00	11,20	12,70
ABA/Témoin	0,78		1,27		1,14	
¹⁵N absorbé_e (^{15}N réduit + ^{15}N accumulé)	30,12	24,80	26,80	23,50	31,50	28,90
ABA/Témoin	0,86		0,87		0,92	

Tableau 14 : Bilan de l'utilisation du nitrate par les cellules d'endive cultivées en présence, en absence d'ABA (10^{-4}M) dans le milieu de culture)

* Le milieu de culture contient N-NH_4^+ et N-NO_3^-

** Le milieu est dépourvu de N-NH_4^+

Dans ces conditions, le taux d'assimilation du nitrate absorbé est de 72 % au cours des deux premiers jours, de 74 % pendant le troisième jour et de 73 % pendant le quatrième jour de culture (Tableau 14).

Pendant les deux premiers jours de culture et en présence d'ABA dans le milieu, les cellules d'endive ont absorbé 25,15 $\mu\text{moles } ^{15}\text{N}$ total par gramme de matière fraîche et dont 71 % ont été assimilées. Ensuite et pendant le troisième jour, la teneur des cellules en ^{15}N total est de 22,5 μmoles par gramme de matière fraîche dont 64 % sont assimilées. Au cours du quatrième jour de culture, les cellules ont absorbé 24,3 $\mu\text{moles } ^{15}\text{N}$ total par gramme de matière fraîche, le taux d'assimilation de l'azote absorbé est de 67 % (Tableau 14).

L'ensemble de ces résultats montre que :

1) En absence d'ammonium dans le milieu de culture les cellules d'endive absorbent autant de nitrate en un seul jour (3^{ème} jour : 26,5 ; 4^{ème} jour : 27,7 $\mu\text{moles } ^{15}\text{N}$ total g^{-1}MF) qu'elles n'en absorbent en deux jours en présence d'ammonium dans le milieu (en 48 heures de culture : 29,35 $\mu\text{moles } ^{15}\text{N}$ total g^{-1}MF). L'ammonium diminue donc l'absorption du nitrate par les cellules d'endive d'environ deux fois pendant les deux premiers jours de culture.

2) L'acide abscissique provoque une diminution de 12 à 15 % de l'absorption du nitrate au cours de la culture cellulaire. Dans ces conditions, les cellules renferment moins d'azote ^{15}N réduit qu'au cours d'une culture sans ABA (-12 % pendant les deux premiers jours, - 27 % le 3^{ème} jour, et - 20 % le 4^{ème} jour), ce qui nous paraît logique dans la mesure où les cellules absorbent moins de nitrate. Mais la baisse de la teneur des cellules en ^{15}N réduit n'est pas uniquement due à la diminution de l'absorption du $^{15}\text{NO}_3^-$. La diminution de la quantité de ^{15}N réduit suit de très près la chute de l'absorption du $^{15}\text{NO}_3^-$ au cours des deux premiers jours de culture (- 15 % d'absorption et de - 12 % de ^{15}N réduit). Ensuite et au cours du troisième et quatrième jours, la baisse des teneurs des cellules en ^{15}N réduit est supérieure à celle de l'absorption (au 3^{ème} jour : -15 % d'absorption et - 27 % de ^{15}N réduit g^{-1}MF , au 4^{ème} jour : - 12 % d'absorption et - 20 % de ^{15}N réduit g^{-1}MF).

La principale conclusion de cette expérience est que l'acide abscissique provoque et une nette diminution de l'absorption du NO_3^- par les cellules et une inhibition de l'assimilation de ce même nitrate absorbé. Un calcul simple des taux d'assimilation du nitrate absorbé confirme cette conclusion (Tableau 13).

3) L'ABA provoque deux effets inverses: elle augmente l'activité NR mesurée *in vivo* et entraîne une diminution de l'incorporation du ^{15}N dans l'azote réduit. L'activité NR mesurée par la méthode *in vivo* reflète donc pas l'assimilation véritable du nitrate.

Ces conclusions nous conduisent donc à rechercher le devenir de l'azote réduit en nitrite et dont l'assimilation devrait être bloquée ou détournée au cours de la voie métabolique de l'assimilation du nitrate. nous avons alors procédé à un dosage de nitrite et d'ammonium dans les cellules cultivées en présence et en absence d'acide abscissique.

Au cours de leur culture, les cellules d'endive présentent des teneurs très faibles (de l'ordre de $40 \mu\text{moles NO}_2^- \text{ g}^{-1}\text{MF}$) et la présence de l'acide abscissique dans le milieu ne modifie pas la quantité de nitrite dans les cellules.

Le dosage de l'ammonium présent dans les cellules indique qu'au cours de la culture en présence d'ABA, la teneur des cellules d'endive en ammonium est de 5,9 au 3ème jour et de $6,2 \mu\text{moles g}^{-1}\text{MF}$ au 4ème jour de culture. Dans la culture témoin, cette teneur n'est que de 3,7 au 3ème jour et de $4,3 \mu\text{moles g}^{-1}\text{MF}$ au bout de quatre jours de culture (Tableau 15).

Durée de la * culture en jours	3		4	
	Témoin	ABA	Témoin	ABA
NH_4^+ en $\mu\text{moles/gMF}$	3,71	5,91	4,33	6,20

Tableau 15 : Teneurs en ammonium des cellules d'endive cultivées en présence ou en absence d'ABA (10^{-4} M) dans le milieu

* Le milieu de culture est dépourvu d'azote ammoniacal

A l'issu de ces dosages, il est donc permis d'affirmer que les cellules d'endive n'accumulent pas de nitrite au cours de leur culture et que l'acide abscissique provoque l'accumulation de l'ammonium dans les cellules sans doute en ralentissant l'assimilation de ce dernier par une inhibition de la voie GS-GOGAT qui est actuellement considérée comme étant la principale voie assimilatrice de l'ammonium. Ce qui nous semble le plus valable d'autant plus que des dosages de protéines dans les cellules ont montré que la présence d'ABA dans le milieu de culture entraîne une diminution de la teneur en protéines des cellules (tableau 16).

Durée de la culture	3 jours	4 jours	5 jours
Témoin	6,42	7,20	7,98
ABA (10^{-4} M)	6,40	6,52	6,20

Tableau 16 : Influence de l'ABA (10^{-4} M) sur la teneur en protéines des cellules d'endive.

La teneur en protéines est exprimée en mg/gMF .

Chapitre IX

**EVOLUTION DE LA L'ACTIVITE NITRATE
REDUCTASE ET DE LA RHIZOGENESE AU COURS
DE LA CROISSANCE DE LA SUSPENSION
CELLULAIRE A11**

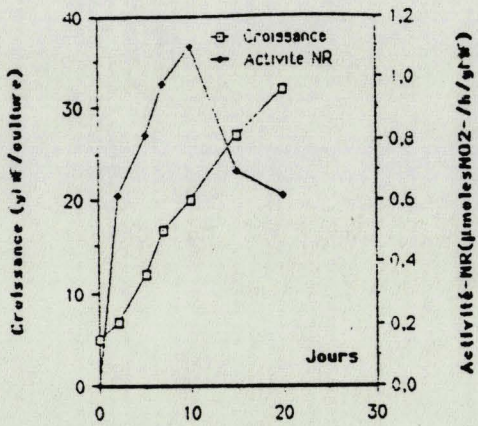


Figure 17 Activité-NR et croissance cellulaire de la suspension A11 en conditions non organogènes

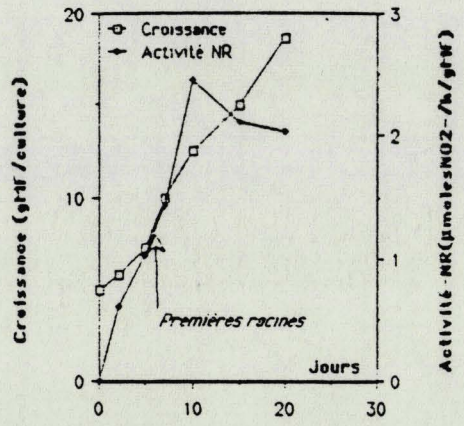
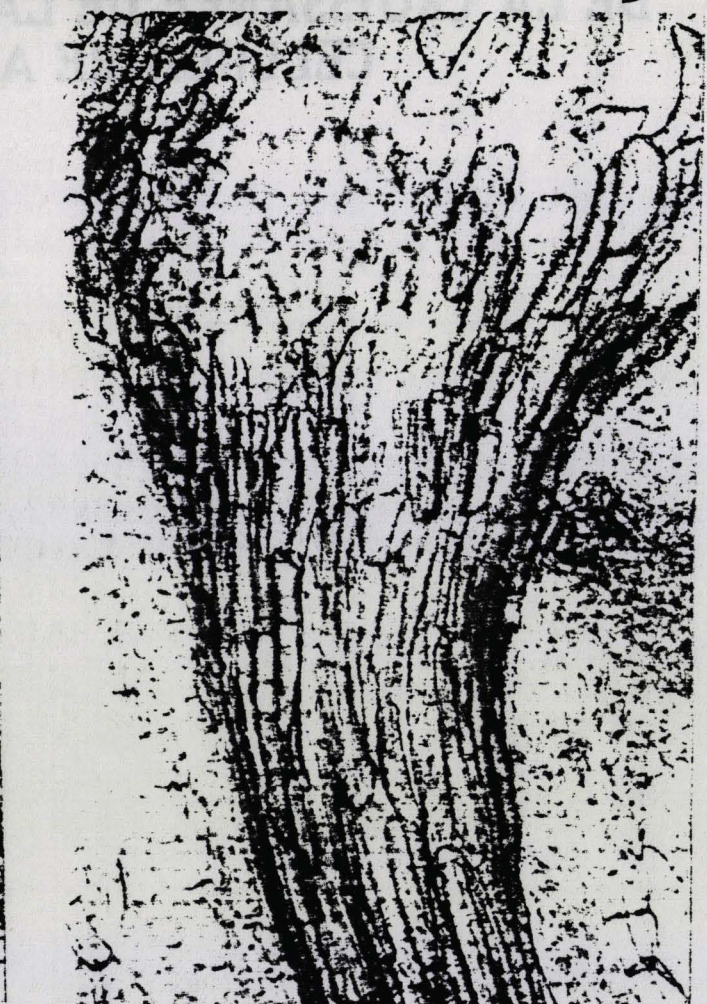
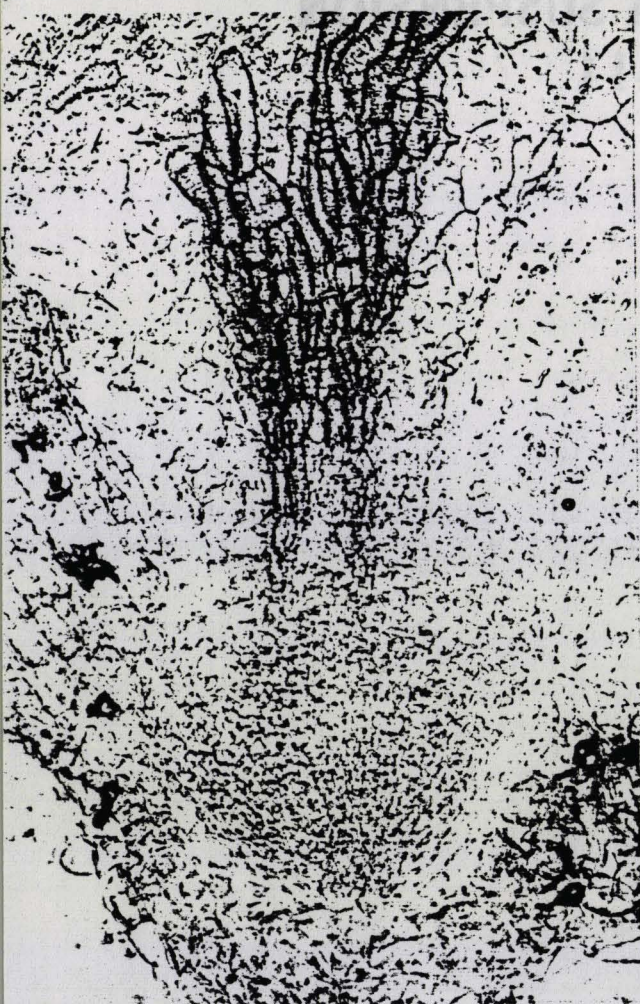


Figure 18 Activité-NR et croissance cellulaire de la suspension A11 en conditions rhizogènes



EVOLUTION DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE ET DE LA RHIZOGENESE AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE A₁₁

La lignée A₁₁ comme la lignée B₂₂ a été établie à partir de colonies tissulaires issues de la prolifération de petits explantats racinaires (cf. "Matériel et Méthodes"). Alors que la suspension cellulaire B₂₂ est très homogène et a perdu les potentialités organogènes des tissus d'origine, la lignée A₁₁ plus hétérogène, a conservé la capacité de produire des racines et des bourgeons.

La suspension A₁₁ se multiplie dans un milieu renfermant du 2,4D (0,02 mg.l⁻¹), de la kinétine (0,02 mg l⁻¹) et l'ANA (1,8 mg l⁻¹). Dans ces conditions, la suspension cellulaire ne manifeste aucune activité de différenciation. Le transfert des cellules dans un milieu dépourvu en 2,4D et en kinétine et dont la concentration en ANA a été diminuée (0,1 mg l⁻¹ au lieu de 1,8 mg l⁻¹) induit l'apparition de racines néoformées. Nous avons suivi la croissance et l'évolution de l'activité NR au cours de la culture de la suspension A₁₁ dans les conditions d'induction de la rhizogénèse et au cours d'une culture témoin.

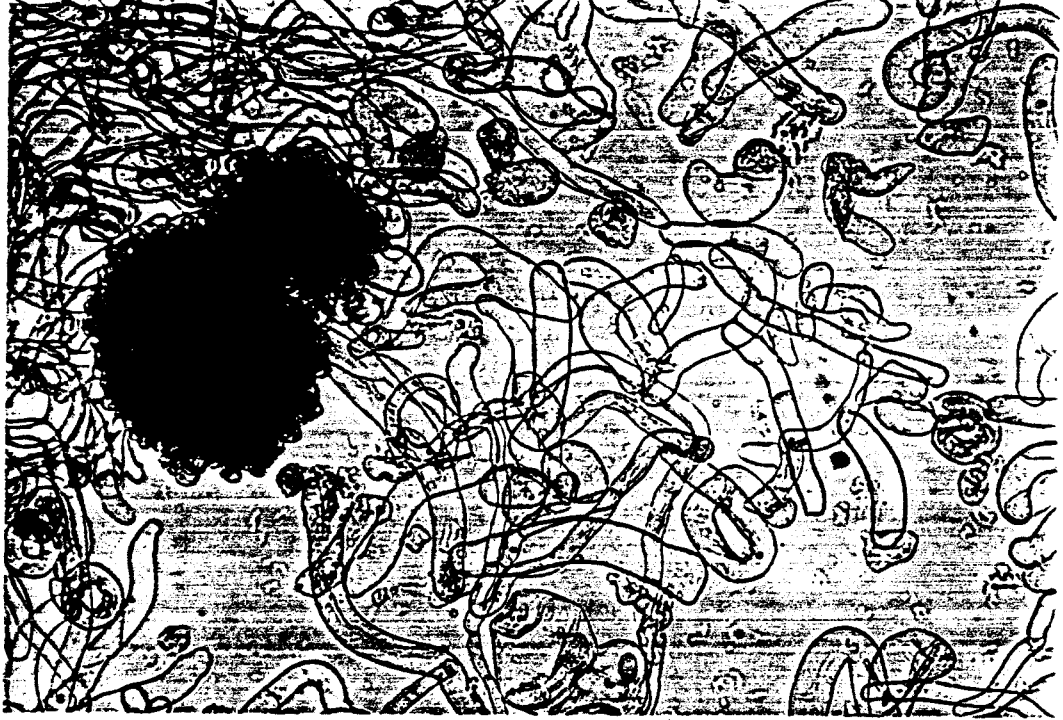
Les résultats montrent que dans les conditions de culture habituelles, l'activité NR qui est nulle à l'ensemencement des cellules, apparaît dès les premiers jours (0,6 μ mole NO₂⁻h⁻¹g⁻¹M au 2^{ème} jour). Ensuite, cette activité se développe lentement pour atteindre un maximum au bout de 10 jours (1,1 μ mole NO₂⁻) et diminue lentement. Au 2^{ème} jour de culture les cellules de la suspension A₁₁ manifestent encore une activité NR qui correspond à la formation de 0,6 μ mole NO₂⁻h⁻¹g⁻¹M (Figure 17).

La croissance cellulaire est lente par rapport à celle de la suspension B₂₂. Malgré la masse de l'inoculum qui est de 5 grammes, la masse cellulaire totale n'est que de 20 grammes au 10^{ème} jour et de 32 g au 20^{ème} jour de culture. Le temps de doublement est de 13 jours. La culture de la suspension A₁₁ en condition non organogènes aboutit à la formation d'amas cellulaires renfermant des nodules (2 à 5 mm) qui contiennent des trachéides dispersés (photographies 1., 4 et 5)

La culture en conditions d'induction rhizogène permet l'apparition de méristèmes racinaires qui donneront des racines. Celles-ci présentent une

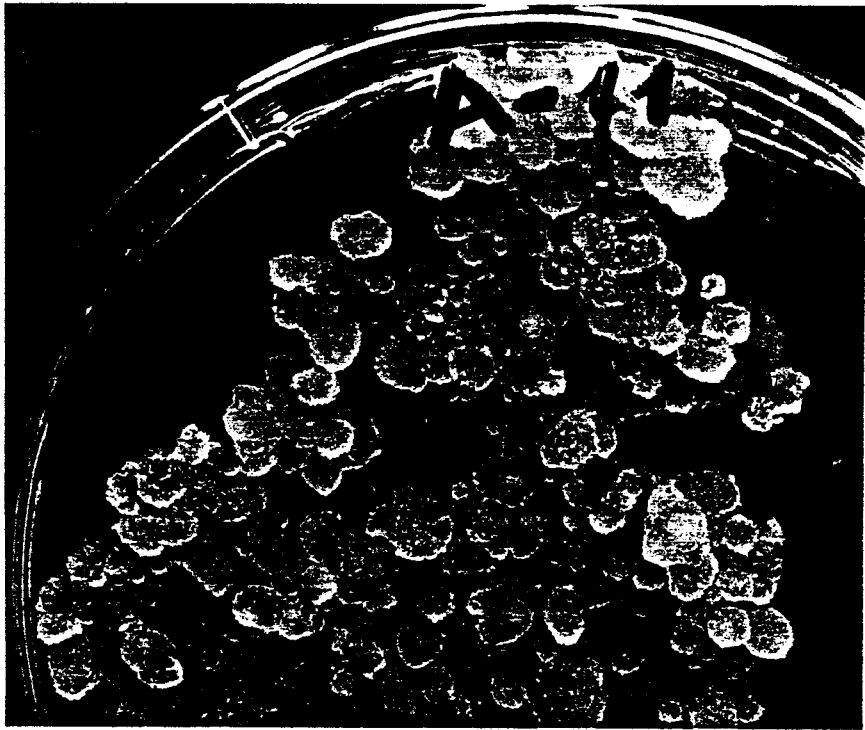
4

100 μ m



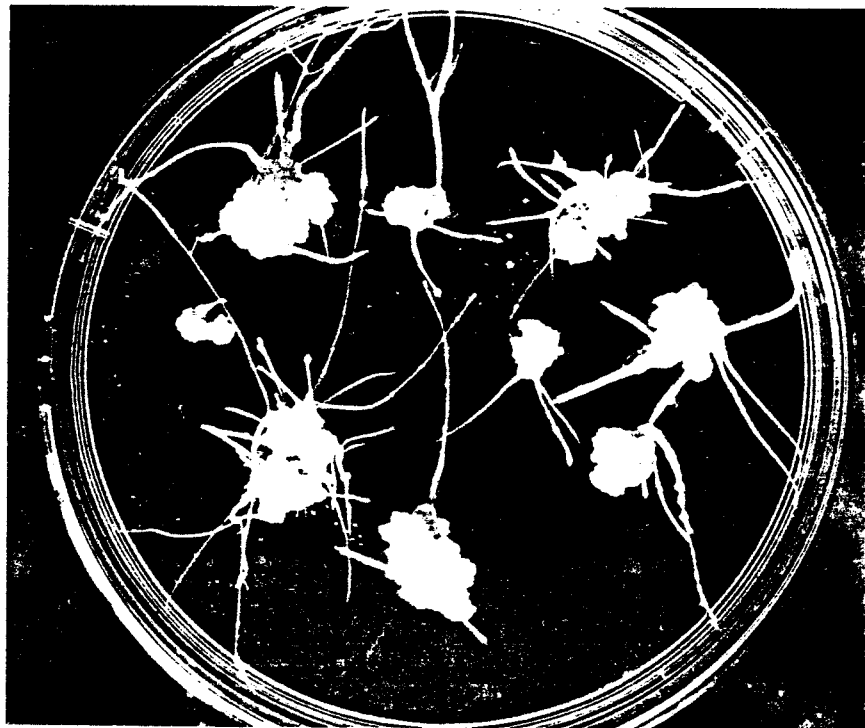
5

1 cm



6

1 cm



structure normale, notamment plusieurs cordons vasculaires, mais pas de poils absorbants (photographies 2., 3 et 6). Ce qui est habituel dans une culture de ce genre.

L'activité NR démarre lentement pendant les premiers jours de culture. Ensuite, elle augmente rapidement dès le 5^{ème} jour ($1,02 \mu\text{mole NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$) au moment où les premières ébauches racinaires apparaissent sur les cals. Au 10^{ème} jour de culture, tous les cals de la suspension présentent des racines et l'activité NR atteint son maximum ($2,45 \mu\text{moles NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$: activité légèrement plus importante que dans les cellules B₂₂: $2 \mu\text{moles NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$). Cette activité est deux fois plus importante que dans les cellules cultivées en conditions non organogènes ($1,1 \mu\text{mole NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$). L'activité enzymatique mesurée in vivo reste élevée à la suite de la culture même jusqu'au 20^{ème} jour où elle correspond à la formation de $2,04 \mu\text{moles NO}_2\text{-h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$ (Figure 18).

la croissance des cellules de la suspension A₁₁ cultivées en conditions favorisant la rhizogenèse se fait encore plus lentement qu'en conditions non organogènes. Avec une masse cellulaire de 5 grammes à l'ensemencement, la biomasse totale n'est que de 12,5 grammes de matière fraîche au bout de 10 jours et de 18,7 grammes au 20^{ème} jour de culture.

L'activité nitrate réductase est donc augmentée dans des conditions rhizogènes mais n'ayant pas pu extraire la NR de cette suspension cellulaire, il nous est donc impossible de vérifier si les caractéristiques enzymatiques (affinité pour NO_3^- et pour NADH ou NADPH) sont identiques à celles de la nitrate réductase des cellules non organogènes.

DISCUSSION

I - ETUDE DE LA MESURE DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE

1) Méthode *in vivo*

2) Méthode *in vitro*

II - PURIFICATION DE LA NR DES CELLULES D'ENDIVE ET CARACTERISTIQUES CINETIQUES DE L'ENZYME

III - ORIGINE DU POUVOIR REDUCTEUR

IV - CROISSANCE ET ACTIVITE NITRATE REDUCTASE

V - ACTION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE SUR LA CROISSANCE ET SUR L'ACTIVITE NR DES CELLULES D'ENDIVE

VI- ACTIVITE NITRATE REDUCTASE ET DIFFERENCIATION RHIZOGENE

I - ETUDE DE LA MESURE DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE

1 - METHODE *IN VIVO*

L'activité NR peut être mesurée de trois façons différentes et aucune n'est satisfaisante en soi.

Au cours de notre travail, l'activité NR a été mesurée *in vivo* et *in vitro*. La méthode de mesure *in vivo* a l'avantage d'être simple et rapide, elle permet d'évaluer le nitrite formé dans les cellules ou dans des tissus de Chicorée maintenus en anaérobiose dans un milieu d'incubation liquide et à l'obscurité (HUER et PLAUT, 1978). Cependant, elle présente l'inconvénient de fournir aux tissus du nitrate exogène et de contenir du propanol.

Le propanol est ajouté au milieu d'incubation parce qu'il modifie la perméabilité membranaire, ce qui permet un meilleur efflux du nitrite. Il provoque aussi une perméation accélérée du nitrate et peut modifier sa répartition entre les différents compartiments cellulaires (FERRARI et al., 1973), ce qui se traduit généralement par un accroissement de l'activité de réduction. On a en effet postulé l'existence d'un pool métabolique, cytoplasmique, de nitrate accessible à la réduction (FERRARI et al., 1973), et un pool de stockage vacuolaire séparé du site de réduction (ADAMOWICZ, 1980).

Pourtant, l'effet du propanol est controversé, DORCHIES (1984) observe que la présence de propanol dans le milieu d'incubation ne modifie pas l'activité des tissus racinaires de la Chicorée de Bruxelles. par contre chez les cellules de Silène et de Carotte sauvage, l'activité NR est augmentée (RAMBAUD, 1986 ; RAMBOUR, 1986). C'est d'ailleurs ce que nous avons observé chez les cellules d'endive. Si les cellules sont incubées dans un tampon dépourvu en nitrate mais contenant 1,25 % de propanol, l'activité NR est deux fois supérieure à celle mesurée dans les cellules qui sont incubées dans un tampon contenant du nitrate (62,5 mM) mais pas de propanol.

Le propanol modifie donc bien la perméabilité membranaire. l'accroissement de l'activité en absence de tout apport de nitrate exogène montre clairement qu'une partie du nitrate "endogène" qui ne participe pas à la réduction dans les conditions habituelles entre dans le pool de réduction. La différence entre nos résultats et ceux obtenus par DORCHIES (1984) dans les racines tubérisées d'endive, s'explique par le simple fait que la racine mature a une teneur en nitrate faible. L'addition de propanol n'a alors aucun effet.

Ces deux types de résultats illustrent parfaitement l'hypothèse de SHANER et BOYER (1975) confirmée par REED et HAGEMAN (1980) et SOUALMI *et al.* (1985) selon laquelle ce n'est pas la teneur en nitrate qui régule l'activité NR d'un organe, mais le flux de NO_3^- .

2 - METHODE *IN VITRO*

La méthode de mesure *in vitro* utilise des broyats cellulaires ou tissulaires. Elle ne rend pas nécessairement compte de la réaction de réduction du NO_3^- dans les cellules et les tissus (BRUNETTI et HAGEMAN, 1976). Les composants nécessaires à la réaction enzymatique ainsi que les inhibiteurs sont mis en contact alors que dans les cellules ils peuvent être localisés dans des compartiments différents. Il n'est pas non plus sûr que le pH cellulaire soit de 7,5.

Cette méthode mesure la capacité de réaction maximale de l'enzyme plutôt que son activité *in situ*. Mais l'extrême labilité de nombreuses nitrate réductases qui semble être inhérente à la molécule (REMMLER et CAMPBELL, 1986) et la richesse de nombreux végétaux supérieurs en composés phénoliques qui, oxydés au cours de l'extraction, peuvent contracter des liaisons covalentes avec les protéines, sont autant d'obstacles à une détermination correcte de l'activité NR *in vitro*. Selon JONES et MHUIMHNEACHAIN (1985), l'instabilité de la nitrate réductase et la perte de son activité sont dues à l'action de protéases mais aussi à un facteur intrinsèque qui provoque la dissociation du complexe enzymatique.

L'utilisation d'un tampon d'extraction renfermant des protecteurs de l'enzyme contre la protéolyse (SAB 3 %, leupeptine 10 μM , EDTA 3 mM) et contre l'oxydation des composés phénoliques (PVP 5 % et SAB 3 %) nous a permis d'extraire la nitrate réductase de la suspension cellulaire B₂₂. L'activité enzymatique mesurée *in vitro* est toujours supérieure à l'activité mesurée *in viva*. La mesure de l'activité NR par la méthode *in situ* aboutit à des valeurs encore plus faibles.

Toutes les tentatives d'extraction de l'enzyme à partir des racines matures ou à partir de la suspension organogène A₁₁ se sont révélées inefficaces. La structure de la NR est probablement modifiée dans la suspension rhizogène. Des observations similaires ont été reportées chez la Carotte et chez l'Orge. Chez celle-ci, la purification de l'enzyme du type sauvage a pu être achevée, alors que dans le mutant nar 1, l'activité NR n'est

mesurable que dans l'extrait brut et dans la fraction précipitée par le sulfate d'ammonium (DAILEY *et al.*, 1982). De la même façon chez la Carotte, l'extraction et la purification de la nitrate réductase est possible à partir de cellules qui prolifèrent, mais est impossible à partir d'embryons somatiques.

L'induction du processus d'embryogenèse somatique pourrait entraîner ou une modification de la structure de la nitrate réductase ou une modification de la régulation du métabolisme des phénols et de la composition protéasique (RAMBAUD et RAMBOUR, 1988).

La purification de la nitrate réductase de la racine mature n'étant pas possible, nous avons entrepris sa purification chez les cellules de la suspension B22.

II - PURIFICATION DE LA NR DES CELLULES D'ENDIVE ET CARACTERISTIQUES CINETIQUES DE L'ENZYME

L'introduction de la chromatographie d'affinité a dans de nombreux cas, permis la purification rapide de nombreuses nitrate réductases (SOLOMONSON, 1975; REDINBAUGH et CAMPBELL, 1983; NAKAGAWA *et al.*, 1985). Chez l'endive ce procédé n'a pas permis d'obtenir des taux de purification aussi élevés que dans d'autres matériels puisque nous avons obtenu une enzyme avec un taux de purification de 236. La chromatographie d'affinité a été suivie d'une chromatographie d'adsorption sur gel d'hydroxyapatite (Ultrogel). L'enzyme a été purifiée 436 fois par rapport à l'extrait brut. Des résultats similaires ont été reportés par NAKAGAWA *et al.* (1985). La purification de la NR de l'Épinard par chromatographie d'adsorption sur gel d'hydroxyapatite suivie d'une chromatographie d'affinité sur bleu Séphadex a permis l'obtention d'un extrait enzymatique purifié 446 fois.

Nous avons aussi entrepris la purification de la NR des cellules d'endive B22 par chromatographie sur DEAE cellulose. L'extrait obtenu n'est purifié que 35 fois mais il présente une activité enzymatique assez élevée pour permettre la détermination des caractéristiques cinétiques de l'enzyme.

La détermination des valeurs des K_m apparents pour le donneur d'électrons et pour le substrat a montré que le K_m pour le nitrate avec NADH comme donneur d'électrons est de $0,88 \cdot 10^{-4}$ M, le K_m pour le NADH avec le

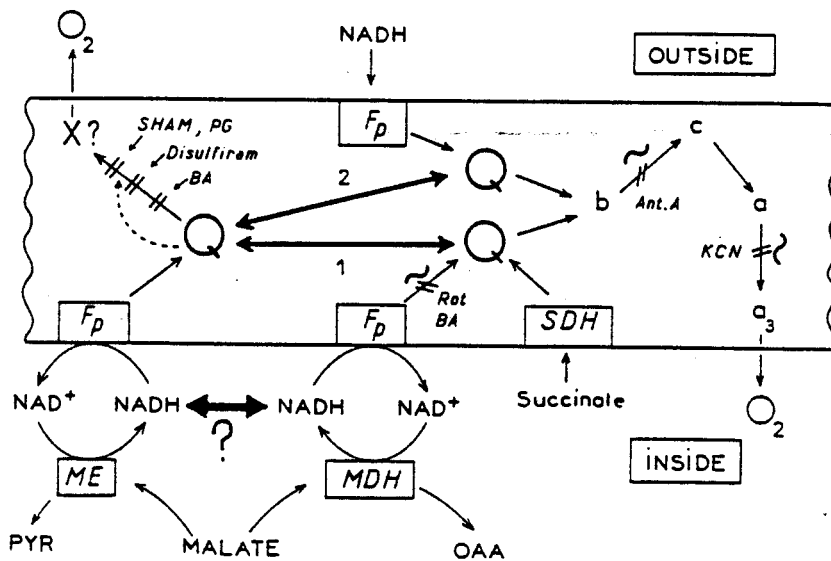
nitrate comme substrat est de 2×10^{-5} M. Ces valeurs sont du même ordre que celles rencontrées dans la littérature, soit 10^{-4} M pour le nitrate et 10^{-5} M pour le NADH (HEWITT et NOTTON, 1980). Cependant des valeurs plus faibles ont été trouvées dans les racines de Blé où le K_m NO_3^- est inférieur au K_m NADH, ($0,3 \cdot 10^{-6}$ M et $8,5 \cdot 10^{-6}$ M respectivement)(SOUALMI et CHAMPIGNY;1986). Chez cette même espèce, la nitrate réductase purifiée montre d'ailleurs une réponse biphasique en fonction de la concentration en nitrate (JONES et MHUIMHNEACHAIN;1985).

III - ORIGINE DU POUVOIR REDUCTEUR

L'origine du NADH cofacteur de la NR a souvent été recherchée, mais les résultats sont variables selon les espèces et selon les organes étudiés, s'ils sont chlorophylliens ou non chlorophylliens (LEE, 1980). Nous avons aussi essayé de déterminer chez les cellules d'endive, l'origine du NADH qui sert à la réduction du nitrate.

Nous avons d'abord constaté que la NR d'un extrait brut manifeste une activité de réduction du nitrate en présence de NADH ainsi qu'une faible activité en présence de NADPH. Dans ce dernier cas, l'enzyme n'est active qu'en pH acide (6,25 à 6,50). Cependant, après une purification, même partielle de l'enzyme, celle-ci ne manifeste plus d'activité en présence de NADPH comme seule source d'électrons. Cette activité NADPH-NR a souvent été attribuée à l'intervention de phosphatases acides qui, à pH 6,50 transformeraient le NADPH en NADH + Pi (WELLS et HAGEMAN,1874). Bien que l'activité NADPH : NR des cellules B₂₂ ait un pH optimal situé entre 6 et 6,5, nous pensons que dans les cellules d'endive, l'activité nitrate réductase est dépendante du NADH. Elle se classe donc parmi les NADH : NR (1.6.6.1).

La fourniture du NADH à la nitrate réductase par le biais de la glycolyse a été prouvée au cours de nombreux travaux (BEEVERS et HAGEMAN, 1969, HEWITT, 1975 ; GRAZYNA, 1984). Les preuves les plus flagrantes de l'intervention de cette voie proviennent d'expériences menées à l'aide de disques foliaires maintenus à l'obscurité et auxquels sont fournis des intermédiaires de la voie glycolytique. Le fructose 1-6.P, le glycéraldéhyde ou le dihydroxyacétone stimulent l'activité NR (NEYRA et HAGEMAN, 19768 ; MANN *et al.*, 1978), alors que le 3 phosphoglycérate ou le pyruvate qui sont



Schema n°2

Schématisation du transport d'électrons dans la membrane interne de la mitochondrie.

Fp : flavoprotéines (diverses NADH deshydrogénases)

SDH : succinate deshydrogénase. MDH : malate deshydrogénase

ME : enzyme malique. a, a_3 , b, c : cytochromes

Q : sites de l'ubiquinone. PYR : pyruvate. OAA : oxaboacetate

Les sites de conservation d'énergie (wavy line) et d'action des inhibiteurs sont indiqués. Ant A : antimycine A. Rot : Rotenone. BA : benzyladenine (cytokinine). PG : gallate propylique. SHAM : acide salicylhydroxamique. D'après RUSTIN *et al.*, 1980.

tous formés postérieurement à la phase oxydative n'ont pas d'action (KLEPPER *et al.*, 1971, MANN *et al.*, 1978). Chez le Pois, la préincubation des racines en présence de NAD^+ et d'acides malique ou succinique qui sont deux intermédiaires du cycle de Krebs, provoque la stimulation de l'activité NR. Cette action stimulatrice a été neutralisée par l'addition d'acide malonique au cours de la préincubation des racines. Dans ce cas, le cycle de Krebs fournit bien du NADH à la réduction du nitrate. En effet, l'acide malonique est un inhibiteur de la succinodéshydrogénase qui transfère les électrons du succinate à l'ubiquinone. Ce complexe n'interfère pas avec l'oxydation du NADH et ne constitue pas un site de conservation de l'énergie. L'inhibition de ce complexe n'a que peu d'incidence sur l'activité nitrate réductase. La roténone inhibe les flavoprotéines qui constituent les NADH déshydrogénases de la membrane mitochondriale interne, elle inhibe donc le transfert des électrons du NADH vers l'ubiquinone. Le mécanisme d'action sur les flavoprotéines situées à l'intérieur de la membrane est mal connu (PALMER *et* WARD, 1985 ; LANCE *et al.*, 1985). L'antimycine A empêche le transfert des électrons du cytochrome b vers le cytochrome c (partie terminale du transfert d'électrons). Ces deux substances bloquent donc des sites de conservation de l'énergie (Schéma n°2).

L'antimycine A inhibe l'oxydation du NADH mitochondrial et cytoplasmique. Elle accroît l'activité NR d'environ 20 % et permet donc l'économie de NADH cytoplasmique et mitochondrial par la cellule.

Par contre la roténone inhibe l'activité nitrate réductase d'environ 60 % ce qui signifie que du NADH mitochondrial est normalement utilisé par la nitrate réductase. Mais l'iodoacétate inhibe l'activité NR de façon identique (55 %). Le NADH qui sert de cofacteur à la nitrate réductase des cellules semble bien avoir une double origine : cytoplasmique et mitochondriale.

IV - CROISSANCE ET ACTIVITE NITRATE REDUCTASE

Dès leur mise en culture, les cellules d'endive entrent en croissance et une activité NR apparaît après une phase de latence de 6 heures. L'analyse de l'évolution dans le temps de l'activité NR, des teneurs en azote nitrique et en glucides solubles dans le milieu et dans les cellules, montre que le pic de l'activité de réduction du nitrate coïncide avec la disparition du saccharose et du nitrate du milieu. A la fin de la phase de croissance exponentielle, l'activité NR n'est plus mesurable et les sucres du milieu sont complètement épuisés. Le

nitrate qui a atteint 10 % de sa teneur initiale ne disparaît plus du milieu. Puisque la NR est une enzyme inductible par son substrat (Pour revue voir HEWITT, 1975), un influx de nitrate est indispensable à l'apparition et au maintien d'une activité enzymatique. Le nitrate joue même le rôle de facteur limitant de sa propre réduction (HAGEMAN, 1979 ; BEEVERS et HAGEMAN, 1980 ; GUERRERO et al., 1982 ; ROBIN, 1983). Ceci explique l'étroite dépendance de la réduction du nitrate dans les parties aériennes vis à vis du flux ascendant de l'anion provenant des racines (NELSON-SCHREIBER et SCHWEITZER, 1986).

Si l'existence de NADH:NR constitutives actuellement trouvées chez le Soja (STREIT et al;1987) était confirmée chez d'autres espèces, on pourrait s'interroger sur le bien fondé et l'affirmation selon laquelle la NR est inductible par son substrat. D'autant plus que des observations plus anciennes de HIGGINS et al. (1974) avaient montré que l'ammonium pouvait être également inducteur de la nitrate réductase de *Phaseolus aureus*.

L'effet de l'ammonium sur l'activité nitrate réductase est d'ailleurs très controversé. Chez les champignons (FACKLAM et MARZLUF;1978) et chez les algues (LOSADA et al. 1973), l'ammonium inhibe la perméation du nitrate et entraîne une répression des voies métaboliques qui permettent sa réduction.

Chez les végétaux supérieurs, l'action de l'ion ammoniacal sur la régulation de la nitrate réductase est très diversifiée et diffère d'une espèce à l'autre. Chez *Silene alba* et chez *Spirodela oligoriza*, l'ammonium inhibe l'activité nitrate réductase en ralentissant l'absorption du nitrate (RAMBOUR et al;1983 ; FERGUSON et BOLLARD; 1969).

L'inhibition par l'ion ammoniacal serait due à une dégradation active de l'enzyme ou à la modification de sa conformation(SRIVASTAVA,1979). Ce qui expliquerait la présence d'une fraction antigénique qui reconnaît les anticorps d'un immunosérum spécifique de la nitrate réductase de Silène dans des cellules cultivées en présence d'ammonium seul et qui ne présentent aucune activité nitrate réductase (POULLE et RAMBOUR;1985).

Les cellules d'endive sont cultivées dans un milieu qui renferme à la fois de l'ammonium(20,6mM) et du nitrate(39,3mM). D'une façon générale la présence d'azote réduit sous forme ammoniacale ou sous forme de glutamine, est nécessaire à la croissance.



De la même façon, des microcals provenant de la division de protoplastes foliaires ne croissent qu'en présence d'azote réduit. La culture sur nitrate comme seule source d'azote, entraîne un brunissement rapide de la plupart des tissus qui parfois produisent des bourgeons (SAKSI, 1985).

Dans le cas de la souche B₂₂, l'absorption du nitrate et de l'ammonium est concomitante, mais ce dernier s'accumule dans les cellules au début de la croissance.

La mise en culture des cellules d'endive en présence de nitrate marqué au ¹⁵N, montre que l'apparition et le développement de l'activité nitrate réductase sont accompagnés d'une absorption massive du nitrate dès le début de culture. Le retrait de NH₄⁺ entraîne une augmentation de l'absorption de NO₃⁻ mais ne modifie pas le taux de son assimilation.

Le fait que les cellules B₂₂ aient besoin d'azote ammoniacal pour leur croissance et que par ailleurs l'activité nitrate réductase suive l'absorption du nitrate, nous empêche de conclure définitivement sur l'inductibilité de l'enzyme par son substrat.

Les cellules d'endive ne sont pas chlorophylliennes, le sucre du milieu constitue l'unique source de carbone et comme chez les cellules de Silène il représente le facteur limitant de la croissance (BRASSART et al., 1978).

L'analyse des teneurs en glucides solubles dans le milieu montre également que le saccharose est entièrement épuisé au bout de trois jours de culture, juste avant l'entrée des cellules en phase de croissance exponentielle. Parallèlement à la disparition du saccharose, on voit apparaître dans le milieu du glucose et du fructose.

Ces observations laissent supposer l'existence d'invertases qui pourraient être soit pariétales, soit extracellulaires. Une activité invertasique a en effet été observée dans le milieu de culture (THOM et al., 1981 ; ZAMSKI et WYSE, 1985; KANABUS et al., 1986). Récemment, MASUDA et al. (1988) ont démontré l'existence de trois formes d'invertases acides et d'une invertase alcaline dans une suspension cellulaire de Betterave. Les invertases acides sont localisées dans le cytoplasme et dans le milieu de culture, mais elles sont surtout actives dans la paroi cellulaire. L'invertase alcaline est cytoplasmique et serait responsable de la reconstitution du saccharose à partir de glucose et de fructose.

Il apparaît donc nettement que l'absorption des sucres se fait sous la forme de monosaccharides et que le glucose est absorbé préférentiellement au fructose. Celui-ci est utilisé lorsque les cellules ont consommé le glucose. Les monosaccharides se retrouvent ensuite accumulés dans les cellules. Ces résultats confirment ceux de KANABUS *et al.* (1986) sur une suspension cellulaire de Carotte. Par contre, MASUDA *et al.* 1988, ont montré qu'au cours de la culture des cellules de Betterave, la disparition du saccharose n'est pas accompagnée de l'apparition d'hexoses dans le milieu de culture. Le saccharose serait hydrolysé au niveau de la paroi cellulaire.

L'utilisation du glucose aboutit en particulier à la production de NADH soit dans le cytoplasme soit dans la mitochondrie, mais comme la croissance est rapide, les activités anaboliques sont sans doute extrêmement importantes. Il est donc vraisemblable qu'une partie du glucose est oxydée par la voie des pentoses phosphates qui génère du NADPH. Il doit donc exister un équilibre entre la voie des pentoses et la glycolyse. La première fournit les nucléotides nécessaires à la division cellulaire et à la croissance alors que la seconde voie pourvoit à la fourniture d'énergie et de NADH directement utilisable par la nitrate réductase.

Nous avons donc voulu estimer la participation de la glycolyse à la fourniture d'un potentiel énergétique et réducteur nécessaire à la réduction du nitrate. Comme la mesure directe du NADH dans un milieu cellulaire est délicate à réaliser, l'évaluation de l'apport énergétique aux cellules est faite par des dosages des teneurs en nucléotides adénylés. Ces dosages montrent que ce potentiel énergétique sous forme d'ATP ou de liaisons P-P est surtout élevé au début de la phase de croissance exponentielle, au moment où la consommation des sucres du milieu ainsi que l'activité nitrate réductase sont à leur optimum. Lorsque les cellules entrent en phase stationnaire, les sucres sont épuisés du milieu et la teneur des cellules en nucléotides adénylés baisse de moitié environ par rapport à sa valeur maximale. Des résultats similaires ont été obtenus par KANABUS *et al.* (1986) sur une suspension cellulaire de Carotte. Par contre, la charge énergétique calculée selon la formule de ATKINSON, (1968) modifiée par KANABUS *et al.* (1986):

$$C.E = \frac{(ATP) + 0,5(ADP)}{(ATP) + (ADP)}$$

varie de 0,9 au 1er jour à 0,8 au 14ème jour de culture. Chez les cellules d'endive et selon les deux formules, le calcul de la charge énergétique montre qu'elle se maintient constante à 0,85 du début à la fin de la culture. En effet, la cellule est un milieu tamponné et la charge énergétique varie peu (PRADET, communication personnelle). Les variations les plus importantes de ce

paramètre sont observées dans des situations de stress extrêmes: anoxie (PRADET et al. 1983) ou traitement par des cyanures. L'introduction de KCN (1 mM) dans une culture de B₂₂ entraîne en effet une diminution de la charge énergétique après une heure (0,7) ou trois heures (0,5) de traitement. Par contre, le taux de liaisons P-P et d'ATP semble pouvoir être mieux corrélé au phénomène étudié.

V - ACTION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE SUR LA CROISSANCE ET SUR L'ACTIVITE NR DES CELLULES D'ENDIVE

L'effet retardateur de l'ABA sur la croissance des végétaux est un phénomène bien connu (MILBOROW, 1978). L'introduction de l'hormone dans le milieu de culture provoque effectivement un ralentissement de la croissance de diverses suspensions cellulaires (RAMBOUR, 1986 ; RAMBAUD, 1986). Il permet aussi le maintien d'une activité NR élevée et plus étalée dans le temps. Ce résultat est surprenant dans la mesure où il semble logique que la capacité de réduction du nitrate doive accompagner la synthèse des protéines nécessaires à la croissance cellulaire. Il était donc intéressant de savoir si l'ABA induit une synthèse accrue de la nitrate réductase ou si l'activité est augmentée parce que le système dispose d'un potentiel réducteur plus important par suite de l'inhibition de la croissance. Les travaux de DAIE (1984) et ceux de SAFTNER et al. (1984) ont montré que l'ABA, l'AIA et l'AG3 régulent les activités enzymatiques directement liées à la synthèse ou à l'hydrolyse du saccharose. Plus récemment, BRUN et al. (1985) ont précisé que l'ABA favorise l'absorption et le stockage du saccharose dans les tissus d'accumulation (puits) et que ces événements sont fortement corrélés à l'activité invertasique de la paroi cellulaire et du tonoplaste. Les modifications de l'activité nitrate réductase et de la croissance des cellules d'endive provoquées par l'ABA semblent être dues à l'action de celui-ci sur le métabolisme glucidique.

Chez l'endive l'ABA, inhibe de toute évidence l'activité invertasique localisée soit dans la paroi pecto-cellulosique soit dans le milieu de culture. En effet, le saccharose est utilisé moins rapidement. Il paraît assez vraisemblable que le rapport entre la voie anabolique et la voie catabolique est modifié. Bien que plus de monosaccharides s'accumulent dans les cellules traitées par l'ABA on peut supposer que la glycolyse se poursuit. On a vu que la charge énergétique de la cellule est maintenue, par contre la croissance est ralentie. Donc il est vraisemblable que plus de NADH est disponible.

La NR est inhibée par les cyanures qui forment un complexe avec la protéine enzymatique réduite (VENNESLAND;1980). Dans ce complexe, le molybdène serait "surréduit" (Mo^{4+}) et pourrait dans certains cas être réactivé par du ferricyanure ou par du nitrate (HEWITT et NOTTON, 1980).

La nitrate réductase des cellules B₂₂ est comme toutes les nitrate réductases inhibée par le cyanure mais les essais de réactivation par le ferricyanure ont toujours été négatifs. Cependant, lorsque les cellules ont été cultivées en présence d'ABA, l'activité NR est relativement protégée contre l'effet du KCN. Il est donc possible que l'ABA provoque une modification de la conformation des sites et de réduction du nitrate et d'acceptation des électrons puisque les activités cytochrome c réductase et MV: NR sont toutes deux "protégées" ou bien le "turn over" de la protéine enzymatique est modifié en présence d'ABA et l'enzyme extraite est plus stable que celle des cellules témoins.

Nous avons également montré que l'acide abscissique diminue l'absorption du nitrate et inhibe son assimilation. Il provoque aussi l'accumulation d'azote ammoniacal dans les cellules, ce qui devrait logiquement aboutir à une inhibition de la synthèse protéique. Les dosages de teneurs en protéines des cellules ont effectivement montré que les cellules cultivées en présence d'ABA contiennent moins de protéines que les cellules cultivées en conditions normales. D'où la réduction de la croissance cellulaire. Dans ces conditions, l'activité NR est plus importante et plus étalée au cours de la culture. Ces événements simultanés nous semblent favorables à l'hypothèse suivante : l'ABA inhiberait la dégradation du glucose par la voie des pentoses au profit de son utilisation par la glycolyse. En effet, l'intérêt de la voie métabolique dite des pentoses phosphates est surtout anabolique puisqu'elle assure la production du NADPH agent réducteur utilisé au cours de nombreuses synthèses, en particulier celle des acides gras et des nucléotides. D'autre part, certains composés intermédiaires sont utilisés pour d'autres synthèses ; le ribose 5-phosphate pour la synthèse de noyaux benzéniques ou indols. Cette voie métabolique est donc essentielle pour la croissance. La glycolyse par contre est une voie catabolique dont l'intérêt principal est la production d'ATP indispensable aux synthèses mais aussi de NADH agent réducteur et qui constitue l'essentiel du pouvoir réducteur de la nitrate réductase des cellules d'endive. L'ABA semble donc retarder les processus anaboliques ce qui entraîne la réduction de la croissance et par conséquent permet la disposition d'un potentiel réducteur plus important qui permet l'augmentation de

l'activité nitrate réductase. Les modifications de l'activité nitrate réductase et de la croissance des cellules d'endive provoquées par l'ABA semblent être dues à l'action de celui-ci sur le métabolisme glucidique.

VI-NITRATE REDUCTASE ET DIFFERENCIATION RHIZOGENE

Des études anciennes de EVANS et NASON (1953) effectuées sur des graines en germination avaient montré que l'activité nitrate réductase était toujours plus élevée dans les tissus "jeunes et métaboliquement actifs". Chez le Coton (RADIN, 1975) ou le Maïs (WALLACE, 1973), la nitrate réductase est la plus active dans les apex racinaires alors que chez le Concombre, l'activité NR est la plus importante dans les parties méristématiques foliaires (BLAHOVA et al. 1980). Par contre peu de recherches ont été effectuées sur les relations entre l'activité NR et la différenciation organogène des tissus somatiques.

DWIVEDI et al. (1984) ont montré qu'au cours de la caulogénèse chez la Canne à sucre, les cals qui produisent des bourgeons ont une activité NR plus élevée que les cals non caulogènes. Chez le Haricot, la formation des racines est associée avec le changement des activités enzymatiques du métabolisme de l'azote (BURZINSKI et al. 1982). Les activités NR, NiR et GDH sont augmentées à la formation des racines, alors que l'activité GS baisse après l'induction de la rhizogénèse par l'AIA. L'augmentation d'activité enzymatique apparaît avant l'émergence des racines.

Le scutellum du Maïs contient des nitrate réductases dont le donneur d'électrons peut être le NADH ou le NADPH (CAMPBELL, 1978). La mise en culture *in vitro* du scutellum d'embryons immatures permet l'obtention de cals qui différencient des bourgeons. Aucun changement dans la teneur relative de la NADH ou la NADPH nitrate réductase n'est décelable (SORGER et al. 1986).

Dans des explants racinaires de la Chicorée de Bruxelles, l'activité NADH : NR est observée lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions induisant la rhizogénèse (DORCHIES et RAMBOUR, 1985). Dans ces explants, l'initiation organogène est caractérisée par deux phases. La première qui dure 24 heures consiste en une activation cellulaire qui voit la transformation des cellules quiescentes s'engager de nouveau dans un cycle cellulaire et synthétisent de l'ADN, de l'ARN et des protéines. La seconde est une phase préparatoire à la différenciation organogène ; les synthèses d'ARN et de protéines sont

importantes et aboutissent à l'apparition, après trois jours de culture, de nodules méristématiques (VASSEUR et ROGER, 1983).

Cependant, les explants tissulaires contiennent des structures complexes. Il est difficile d'apprécier la proportion des cellules intervenant dans le processus de différenciation, ainsi que leur état de différenciation initiale.

La suspension cellulaire A₁₁ bien que constituée de microcals en suspension nous semble être un matériel plus favorable à l'étude d'un phénomène de différenciation organogène. On peut en effet raisonnablement penser que la proportion de cellules concernées par le phénomène qui est induit est plus grande que dans un explant tissulaire, ou que tout au moins la "partie non réactivée" est plus faible.

Lorsque la suspension cellulaire est cultivée dans des conditions rhizogènes, l'activité NR est augmentée significativement, elle est deux fois plus importante que dans les cellules cultivées dans des conditions non organogènes.

Comme la nitrate réductase est l'une des protéines synthétisées dès la reprise d'activité cellulaire, nous avons voulu savoir si la mise en culture des cellules dans un milieu d'induction de la rhizogenèse n'entraînait pas la synthèse de protéines spécifiques. SUNG et OKIMOTO (1981) ont en effet montré l'existence de deux protéines qui apparaissent au cours de la différenciation d'embryons somatiques de Carotte.

Dans une expérience préliminaire, nous avons procédé à l'extraction des ARN poly A⁺ de cellules cultivées pendant deux jours soit en conditions rhizogènes soit en conditions non organogènes. La traduction *in vitro* de ces ARN poly A⁺ et l'analyse des protéines obtenues en électrophorèse bidimensionnelle permet d'observer l'apparition de trois protéines dans les cellules cultivées en conditions rhizogènes. Mais nous n'avons pas pu déterminer de modification de la transcription des ARNm de la nitrate réductase. En effet, aucune modification de la distribution des protéines n'est observable dans la partie de l'électrophorégramme où migre la nitrate réductase.

A la suite de cette étude, il est donc impossible de savoir si l'augmentation de l'activité NR est due à des modifications de la traduction ou de la stabilité de la protéine. L'accroissement de l'activité pourrait être dû d'une part à un ralentissement du taux d'inactivation ou de dégradation de

l'enzyme et d'autre part à un accroissement de son taux d'activation ou de synthèse. Le lien entre la modification du taux de l'auxine et de la régulation de la nitrate réductase n'a à notre connaissance, jamais été étudié au cours de la rhizogénèse.

CONCLUSIONS

Le comportement des deux suspensions cellulaires de Chicorée de Bruxelles obtenues au laboratoire est très différent. La suspension B₂₂ non organogène a une croissance rapide et un cycle de croissance très court, la A₁₁ qui a conservé ses potentialités organogènes a une croissance lente et un cycle long.

L'étude des nitrate réductases montre que les caractéristiques enzymatiques sont vraisemblablement différentes dans ces deux souches.

En effet, nous avons pu mettre au point un tampon d'extraction, contenant des inhibiteurs des protéases (leupeptine, sérum albumine) ou de l'oxydation des phénols, qui permet la purification de la nitrate réductase de la souche B₂₂. Par contre ce tampon est totalement inefficace avec la souche A₁₁. Ou bien les compositions chimiques ou enzymatiques des deux types de cellules sont totalement différentes (teneur plus élevée en composés phénoliques, protéases plus actives chez A₁₁) ou bien la nitrate réductase est plus fragile chez A₁₁.

La nitrate réductase de la suspension cellulaire B₂₂ a été purifiée 446 fois; ce taux de purification est faible comparé à celui obtenu chez d'autres matériels. C'est une NADH:NR dont les K_m apparents sont $0,88 \cdot 10^{-4}$ M pour le NO₃⁻ et $2 \cdot 10^{-5}$ M pour le NADH. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues chez la plupart des végétaux supérieurs.

Par utilisation d'inhibiteurs de la glycolyse (iodoacetate) ou de la phosphorylation oxydative (roténone, antimycine A) nous avons pu déterminer que le NADH utilisé comme donneur d'électrons par la nitrate réductase de B₂₂ a une double origine: cytoplasmique et mitochondriale.

Au cours de leur croissance, les cellules de B₂₂ hydrolysent très rapidement le saccharose en fructose et en glucose par des invertases extracellulaires ou pariétales. Le glucose est sans doute le monosaccharide absorbé préférentiellement.

L'évolution de l'activité nitrate réductase dépend très étroitement de l'utilisation des sucres. La réduction du nitrate s'arrête lorsque les cellules ont épuisé les sucres du milieu de culture. Le nitrate s'accumule alors dans la cellule et sert vraisemblablement d'osmoticum.

Alors que le milieu ne contient plus de sucres, la cellule régule cependant sa charge énergétique et la maintient constante pendant son cycle de croissance.

L'acide abscissique inhibe la croissance cellulaire après environ 48 heures mais aussi la respiration. Cette inhibition s'exerce en ralentissant l'absorption du nitrate et en entravant la synthèse protéique. L'hydrolyse du saccharose par des invertases pariétales ou extracellulaires est également ralentie.

Or curieusement l'activité nitrate réductase est augmentée. Cet accroissement semble être lié à une disponibilité accrue en NADH, du fait de la diminution des processus anaboliques. Elle résulte en une augmentation de la teneur en azote ammoniacal ou en amides.

L'utilisation des différentes méthodes de mesure actuellement existantes de l'activité NR a montré que l'activité mesurée *in situ* est très faible. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où la plante au champ n'est guère exigeante en nitrate. Cette caractéristique pourrait contribuer à expliquer pourquoi l'activité mesurée *in vitro* est supérieure à celle trouvée *in vivo* alors que très généralement c'est l'inverse qui est observé.

Enfin dans la suspension organogène A₁₁ l'induction d'une différenciation rhizogène s'accompagne d'un accroissement de l'activité NR mesurée *in vivo*

Bien que de nombreuses observations effectuées dans le laboratoire suggèrent que la nitrate réductase pourrait être un marqueur biochimique de la différenciation rhizogène, l'impossibilité d'extraire la NR de la suspension cellulaire A₁₁ ne nous permet pas d'avérer l'hypothèse émise. Seule une étude de la régulation au niveau du génome pourra apporter une réponse.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMOWICS S., 1980. - Mise en évidence des "pools" de nitrates par la mesure in vivo de l'activité nitrate réductase.
Physiol. Vég., 18, 453-461.
- AMY N.K. and GARRETT R.H., 1980. - Repression of nitrate reductase activity and losse of antigenically detectable protein in *Neurospora crassa*
J. Bacteriol., 144, 232-237.
- APARICIO P.J. and MALDONADO J.M., 1979. - Regulation of nitrate assimilation in photosynthetic organisms. In : Nitrogen assimilation of plants (Hewitt E.J. and Cuttings C.V. ed.). Academic Press, London, 207-215.
- ASLAM M. and HUFFAKER R.C., 1984. - Dependensy of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions.
Plant Physiol., 75, 623-628.
- ASLAM M., HUFFAKER R.C., RAINS D.W. and RAO K.P., 1979. - Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings.
Plant Physiol., 63, 1205-1209.
- ASLAM M. and OAKS A., 1975. - Effect of glucose on the induction of nitrate reductase in corn roots.
Plant Physiol., 56, 634-639.
- ATKINSON D.E., 1968. - The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feed-back modifiers.
Biochemistry, 7, 4030-34.
- BEEVERS L, FLESHER D. and HAGEMAN R.H., 1964. - Studies on the pyridin nucleotide specificity of nitrate reductase in higher plants and its relationship to sulfhydryl level.
Biochim. Biophys. Acta, 89, 453-464.
- BEEVERS L. and HAGEMAN R.H., 1980. - Nitrate and nitrite reduction. In : "The Biochemistry of Plant", Vol. 5, (Stumpf P.K. et Conn E.E., eds), Academic press, New York, 115-168.

- BEN ZIONI A., VAADIA Y. and LIPS H., 1971. - Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoots.
Physiol. Plant., 24, 288-290.
- BLAHOVA H. and SEGET V., 1980. - Nitrate reductase activity in the course of cucumber leaf ontogenesis.
Biologia plantarum (Praha), 22 (3), 176-182.
- BOHME H.J., KOPPERSCHLAGER G., SCHULZ J. and HOFFMANN E., 1972. - Affinity chromatography of phosphofructokinase using Cibacron blue F 3 G-A.
J. Chromatogr., 69, 209-214.
- BONNER J.A., 1965. - Development. In : Bonner J.A. and Varner J.E. (eds).
Plant Biochem., 850-856, Acad. Press, New York.
- 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.
- BRASSART C., DUBOIS J. et BOURIQUET R., 1978. - Nutrition azotée d'une suspension cellulaire de Silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause).
C. R. Acad. Sc., 287, série D, 1373-1376.
- BRUN W.A., BRENNER M.L. and SCHUSSLER J., 1985. - Br plant growth regul group monograph, 12, 257 p.
- 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 nitrate reductase inactivating factor in extracts of *Spirodella polyrhiza*.
Acta Soc. Bot. Poloniae, 53, (3) 411-417.
- BURZYNSKI M., KUBIL-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 Physiol Plant, 4, (1-2), 21-29.

- CAMPBELL W.H., 1978. - Isolation of NAD(P)H : nitrate reductase from scutellum of maize.
Z.Pflanzenphysiol., 88, 357-361.
- CAMPBELL W.H. and SMARELLI J., 1978. - Purification and kinetics of higher plant NADH : nitrate reductase.
Plant Physiol., 61, 611-616.
- CAMPBELL J.M., J.L., 1983. - Purification of barley nitrate reductase and demonstration of nicked subunits.
Phytochem., 22, 2375-2382.
- CANVIN D.T. and WOO K.C., 1979. - The regulation of nitrate reduction in spinach leaves.
Can. J. Bot., 57, 1155-1160.
- CHANTAROTWONG W., HUFFAKER R.C., MILLER B.L. and GRANSTEDT R.C., 1976.-
In vivo nitrate reduction in relation to nitrate uptake, nitrate content, and *in vitro* nitrate reductase activity in intact barley seedlings.
Plant Physiol., 57, 519-522.
- CHAILLOU S., MOROT-GAUDRY J.F., SALSAC L., LESAIN C. and JOLIVET E., 1986. - Compared effects of NO_3^- and NH_4^+ on growth and metabolism of French Bean.
Physiol. Veg., 24, 679-687.
- CHIKWEM J.O. and DOWNEY R.J., 1982. - Purification and characterizataion of the respiratory nitrate reductase of *Bacillus stearothermophilus*.
Anal. Biochem., 126, 74-80.
- DAILEY F.A., LUO T. and WARNER R.L., 1982 . - Pyridine nucleotide specificity of barley nitrate reductase.
Plant Physiol., 69, 1196-1199.
- DAVIDSON J.R., ANDREWS M. and STEWERT 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.

- DEANE-DRUMMOND C., CLARKSON D.T. and JOHNSON C.B., 1979. - Effect of shoot removal and malate on the activity of nitrate reductase assayed *in vivo* in barley roots (*Hordeum vulgare* c.v. Midas).
Plant Physiol., 64, 660-662.
- DIEZ J., CHAPARRO A., VEGA J.M. and RELIMPIO A.M., 1977. - Studies on the regulation of assimilation nitrate reductase in *Ankistrodesmus braunii*.
Planta, 137, 231-234.
- DELWORTH F.M. and KENDE H.H., 1974. - Comparative studies on nitrate reductase in *Agrostemma githago* induced by nitrate and benzyladenine.
Plant Physiol., 54, 821-825.
- DORCHIES V. et RAMBOUR S., 1983. - Activité de la nitrate réductase mesurée *in vivo* chez *Chicorium intybus* (var. Witloof) au cours du forçage.
Physiol. Vég., 21(4), 705-713.
- DORCHIES V. et RAMBOUR S., 1985. - Activité nitrate réductase chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) à différents stades de développement et dans les tissus cultivés *in vitro*.
Physiol. Vég., 23(1), 25-35
- DORCHIES V., 1984. - Activité de la nitrate réductase de *Cichorium intybus* L. : étude à différents stades de développement de la plante et dans les tissus cultivés *in vitro*
Thèse 3ème cycle. Université de Lille I.
- DUBOIS J., DROUJININSKI A. et VASSEUR J., 1988. - Croissance et potentialités organogènes de suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof.
Bull. Soc. bot. Fr., Actual. bot., (sous presse).
- 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 Pflanzenbau Bodenkunde (Berlin), 18, 233-242.
- DWIVEDI V.N., KHAN B.N., RAWAL S.K. and MASCARENHAS A.F., 1984. - Biochemical aspects of shoot differentiation 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.
- FACKLAM J. J. and MARZLUF G. A., 1978. - Nitrogen regulation in amino acid catabolism in *Neurospora crassa*
Biochem. Genet., 16, 343-355.
- FEMTEM, P.A., LEA P.J. and STEWART G.R., 1983. - Ammonia assimilation in the roots of nitrate and ammonia-grown *hordeum vulgare* (c.v. golden promise).
Plant Physiol., 71, 496-501.
- FERGUSON A. R. and BOLLARD E. G., 1969. - Nitrogen metabolism of *Spirodela oligorrhiza* I: Utilization of ammonium, nitrate and nitrite.
Planta, 88, 344-352.
- 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. et FILNER P., 1973. - Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues : evidence for two nitrate pools.
Plant Physiol., 51, 423-431.
- FIALA V. and JOLIVET, XXXX1980. - The aptitude of roots of Witloof chicory for chicon production studied by their carbohydrate composition.
Science Hort., 13, 125 p.
- FIEDLER R. and PROSKCH G., 1975. - The determination of nitrogen 15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis : a review.
Ann. Chim., 78, 1-62.
- 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.
- GARRETT R.H. and NASON A., 1969. - Further purification and properties of *Neurospora* nitrate reductase.
J. Biol. Chem., 244 (11), 2870-2882.

- GOJON A., 1986. - Etude de la contribution des racines à la réduction du nitrate.
Thèse de Doctorat, Université de Montpellier.
- GRABAR P. and WILLIAMS C.A., 1953. - Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta., 10, 193-194.
- GRAY V.M. and GRESSWELL C.F., 1983. - The effect of respiratory inhibitors and alcohols on nitrate utilization and nitrite accumulation in excised roots of *Zea mays* L.
Z. Pflanzenphysiol., 112, 207-214.
- GRAY V.M. and CRESSWELL C.F., 1984. - Nitrite utilization by excised *Zea mays* L. roots under anaerobic conditions.
Plant Sci. Lett. 33, 31-38.
- GRAZYNA G., 1984. - Sources of reducing equivalents for nitrate reductase in *Pisum arvense* roots.
Acta Soc. Bot. Pol., 53 (4), 499-505.
- GUERRERO M.G., VEGA J.M. and LOSADA M., 1981. - The assimilatory nitrate reducing system and its regulation.
Ann. Rev. Plant Physiol., 32, 169-204.
- HAGEMAN R.H., 1979. - Integration of nitrogen assimilation in relation to yield. In "Nitrogen assimilation of Plants", (Hewitt J. et Cutting c.v. eds). Academic press, New York, 591-612.
- 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.
- HEIMER Y.M. and FILNER P., 1971. - Regulation of the nitrate assimilation pathway in culture tobacco cells. III. The nitrate uptake system.
Biochim. Biophys. Acta, 230, 362-372.
- HENRIKSEN A. and SEMER-OLSEN A.R., 1970. - Automatic methods for determining nitrate and nitrite in water and oil extracts.
Analyst, 95, 514-518.

- HEUER B. and PLAUT E., 1978. Reassessment of the *in vivo* assay for nitrate reductase in leaves.
 Physiol. Plant., 43, 306-312.
- HEWITT E.J., 1975. - Assimilatory nitrate reductase reduction.
 Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 73-100.
- HEWITT E. J. et NOTTON B. A., 1980.-Nitrate reductase systems in eukaryotic and prokaryotic organisms. In: Molybdenum and molybdenum containing complex. J. Less-Common Met., 54, 537-545.
- HEWITT E.J. and NICHOLAS D.J.D., 1964. - Enzymes of inorganic nitrogen metabolism. In : "Modern methoden der pflanzenanalyse 7. Band. vol. VII., 67, 172. Springer-verlag Berlin Gröttingen, Heidelberg.
- HIGGINS T.J.V., GOODWING P.B. and CARR .D.J.,1974.-The induction of nitrate reductase in mung bean seedlings.
 Aust. J. Plant Physiol.,1,1-8.
- HIRAI M., 1978. - NAD malic enzyme from citrus fruit.
 Phytochem., 17, 1507-1510.
- HOG K., HARTVIGSEN M.B. and RASMUSSEN O.S., 1983. - Critical evaluation of the *in vivo* nitrate reductase assay for detection of two nitrate pools in wheat leaves.
 Physiol. Plant., 59, 141-147.
- HOWARD W.D. and SOLOMONSON L.P., 1984. - Quaternary structure of assimilatory NADH : nitrate reductase from *Chlorella*.
 J. Biol. Chem., 257 (17), 10243-10250.
- IDA S. and MIKAMI B., 1983. - Purification and characterization of assimilatory nitrate reductase from *Cyanobacterium*, 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-relationship between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. III. Effect of the nitrogen source on the pattern of carbohydrate oxidation in cells of *Acer pseudoplatanus* L. grown in culture.
 Planta, 137, 71-76.

- JOHNSON J.L., HAILINE B.E., RAJAGOPALAN K.V. and ARISON B.H., 1984. - The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives.
J. Biol. Chem., 259, 5414-5422.
- JOHNSON J.L. and RAJAGOPALAN K.V., 1982. - Structural and relationship between the molybdenum cofactor and urothine.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6856-6868.
- JOLLY S.O., CAMPBELL W. and TOLBERT N.E., 1976. - NADPH and NADH nitrate reductase inhibitor from soybean leaves.
Plant Physiol., 62, 197-203.
- JONES P.W. and MHUIMHNEACHAIN M.N., 1985. - The activity and stability of wheat nitrate reductase *in vitro*
Phytochem., 24 (3), 385-392.
- JONES W.R. and SHEARD R.W., 1977. - Accumulation and stability of nitrite in intact aërian leaves.
Plant Sci. Lett., 11, 285-291.
- JONES W.R. and SHEARD R.W., 1978. - Accumulation and stability of nitrite in intact aërian leaves.
Plant Sci. Lett., 11, 285-291.
- 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.
- KAMACHI K., AMEMIYA Y., OGURA N. and NAKAGAWA H., 1987. - Immunogold localization of nitrate reductase in Spinach (*Spinocia oleracea*) leaves.
Plant Cell Physiol., 28 (2), 333-338.
- 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.

- KANABUS J., BRESSAN R.A. and CARPITA N.C., 1986. - Carbon assimilation in Carrot cells in liquid culture.
Plant Physiol., 82, 363-368.
- KENDE H.H., HANN H. and KAYS S.E., 1971. - Enhancement of nitrate reductase activity by benzyladenine in *Agrostemma githago*
Plant Physiol., 48, 702-706.
- KENDE H. and SHEN J.C., 1972. - Nitrate reductase in *Agrostemma githago*. Comparison of the inductive effects of nitrate and cytokinin.
Biochim. Biophys. Acta., 286, 228-125.
- KLEPPER L., FLESHER D. and HAGEMAN R.H., 1971. - Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves.
Plant Physiol., 48, 580-590.
- KLEPPER L. et HAGEMAN R.H., 1969. - The occurrence of nitrate reductase in apple leaves.
Plant Physiol., 44, 110-114.
- KNYPL J.S., 1979. - Hormonal control of nitrate assimilation : Do phytohormones and phytochrome control the activity of nitrate reductase . In : Nitrogen assimilation in Plants, Hewitt E.J., Cutting, c.v., ed. London Academic 541-556.
- KUO T., KLEINHOFFS A. and WARNER R.L., 1980. - Purification and partial characterization of nitrate reductase from barley leaves.
Plant Sci. Lett., 17, 371-381.
- LANCE C., CHAUVEAU M. and DIZENGREMEL P., 1985. - The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria. In higher plant cell respiration. Encyclopedia of Plant Physiology. New series, vol. 18. R. Douce and D.A. Day. Eds Springer-Verlag., 202_247.
- 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 BATTAILLE J., 1966. - Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes.
Phytochem., 5, 423-438.
- LOSADA M., GUERRERO M.G. and VEGA J.N.- 1981. - The assimilatory reduction of nitrate. In : Biochemistry and Physiology of nitrogen and Sulfur Metabolism, ed. H. Bothe, A. Trebst, Berlin, Springer
- LOWRY O.H. and ROSEBROUGH M.J., FARR A.L., RANDALL, R.J., 1951. - Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MAC KOWN C.T., VOLK R.J. and JACKSON, W.A., 1981. - Nitrate accumulation, assimilation and transport by decapitated corn roots. Effects of prior nitrate nutrition.
Plant Physiol., 68, 133-138.
- MANN A.F., HUCKLESBY D.P. and HEWITT E.J., 1978. - Sources of reducing power for nitrate reduction in spinach leaves.
Planta, 140, 261-263.
- MAURINO S.G., ECHEVARIA C., MEJAS J.A., VARGAS M.A. and MALDONADO J.M., 1986. - Properties of the *in vivo* nitrate reductase assay in maize, soybean and spinach leaves.
J. Plant. Physiol., 124, 123-130.
- MASUDA H., TAKAHASHI T., and SUGAWARA S., 1988 - Acid and alkaline invertases in suspension cultures of sugar beet cells.
Plant Physiol., 86, 312-317.
- MILBORROW B.V., 1978. - The biochemistry of phytohormones and related compounds, 295 p. In : "Phytohormones and related compounds : A comprehensive treatise". Vol. 1.
- MILLS D. and LIPS H.S., 1984. - Nitrate reduction and compartmentation in tomato leaves. I. Nitrate accumulation in leaf sections in aqueous and gaseous medium.
Physiol. Plant., 61, 141-148.

- MURASHIG T. and SKOOG, F., 1962 - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 473-497
- NAIK M.S., ABROL Y.P., NAIR T.V.R. and RAMARAO C.S., 1982. - Nitrate assimilation. Its regulation and relationship to reduced nitrogen in higher plants.
Phytochem., 21, 495-504.
- NAIK M.S. and NICHOLAS D.J.D., 1984. - Origin of NADH for nitrate reduction in wheat roots.
Plant Sci. Lett., 35, 91-96.
- NAIK M.S. and NICHOLAS D.J.D., 1986. - Malate metabolism and its relation to nitrate assimilation in plants.
Phytochem., 25, 571-576.
- NAKAGAWA H., YONEMURA H.Y., SATO T., OGURA N. and SATO. 1985 - Spinach nitrate reductase - Purification, molecular weight, and composition.
Plant. Physiol., 77, 124-128
- NASON A., ANTOINE A.D., KETCHUM P.A., FRAZIER W.A. and LEE, D.K., 1970. - Formation of assimilatory nitrate reductase by *in vitro* inter-cistronic complementation in *Neurospora crassa*.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), 65, 133-144.
- NELSON- SHREIBER B.M. and SCHWEITZER L.E., 1986. - Limitation on leaf nitrate reductase activity during flowering and podfill in soybean.
Plant Physiol., 80, 454-458.
- 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
- NEYRA C.A. and HAGEMAN R.H., 1976. - Relationships between carbon dioxide, malate and nitrate accumulation and reduction in corn (*Zea mays* L.) seedlings.
Plant. Physiol., 58, 726-730.

- NEYRA C.A. and HAGEMAN R.H., 1978. - Pathway for nitrate assimilation in corn (*Zea mays* L.) leaves. Cellular distribution of enzymes and energy sources for nitrate reduction.
Plant Physiol., 62, 618-621.
- NICHOLAS D.J.D. and NASON A., 1954. - Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase.
J. Biol. Chem., 207, 353-360.
- NICHOLAS D.J.D., NASON A. and ELROY W.D.Mc., 1954. - Molybdenum and nitrate reductase. I. Effect of molybdenum deficiency on the Neurospora enzyme.
J. Biol. Chem., 207, 341-351.
- NOTTON B.A., FIDO R.J and HEWITT E.J., 1977. - The presence of functional haem in higher plant nitrate reductase.
Plant.Sci.Lett.8, 165-170.
- OAKS A. and MIREL B., 1985. - Nitrogen metabolism in roots.
Ann. Rev. Plant Physiol., 36, 345-365.
- OJI Y., HAMANO T., RYOMA Y., MYKI 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.
- OUCHTERLONY O., 1949. - Antigen antibody reaction in gels.
Acta Pathol. Microbiol. Scand., 26, 507-517.
- PAGE G.M., MAC KOWN C.T. and VOLK R.J., 1982. - Minimizing nitrate reduction during Kjeldahl digestion of plant tissue extract and stem exudates. Application to ¹⁵N studies.
Plant Physiol., 77, 560-566
- PALMER J.M. and WARD J.A., 1985. - The oxidation of NAH by plant mitochondria. In Higher plant cell respiration; Encyclopedia of plant physiology new serie, vol 18. R.DOUCE et D.A.Day.Eds.Springer-Verlag. 173-201.

- PAN S.S. and NASON A.,1978.-Purification and characterization of homogeneous assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate nitrate reductase from *Neurospora crassa*
Biochem.Biophys.Acta.,523,293-313
- PATEMAN J.A., COVE D.J., REVER B.M. and ROBERTS D.B., 1964. - A common co-factor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase.
Nature, 201, 58-60.
- POULLE M.,1979.-Etude de la nitrate reductase d'une suspension cellulaire de *Silene alba* caracterisation,induction et purification.
These 3^{eme} cycle.Universite Lille I.
- POULLE M. and RAMBOUR S.,1985.-Regulation of nitrate reductase in suspension culture of *Silene alba*. Immunochimical approach.
Plant Science,40,111-115.
- PRADET A.,1967.-Etude des adenosines 5' mono di et triphosphates dans les tissus végétaux.I Dosage enzymatique.
Physiol.Vég.7,261-275.
- PRADET A. and RAYMOND P.,1983.-Adenine nucleotide and adenylate energy charge in energy metabolism.
Ann. Rev. Plant Physiol.34,199-224.
- PRAKASH S., SINGH P., SAWHNEY S.K. and NAIK M.S., 1984. - Regulation of nitrate assimilation in plants in light and dark.
Plant Sci. Lett., 34, 25-34.
- RADIN J.W., 1975. - Differential regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of cotton plants.
Plant Physiol., 55, 178-182.
- RADIN J.W., 1977. - Contribution of the root system to nitrate assimilation in whole cotton plants.
Aust. J. Plant. Physiol., 4, 811-819.

- RADIN J.W., 1978. - A physiological basis for the division of nitrate assimilation between roots and leaves.
Plant Sci. Lett., 13, 21-25.
- RADIN J.W., PARKER L.L. and SELL C.R., 1978. - Partitioning of sugar between growth and nitrate reduction in cotton roots.
Plant Physiol., 62, 550-553.
- RADIN J.W., SELL C.R. and JORDAN W.R., 1975. - Physiological significance of the in vivo assay for nitrate reductase in cotton seedlings.
Crop. Sci., 15, 710-712.
- RAMARAO C.S., SRINIVASA N. 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.
- RAMBAUD C. 1986. - Evolution et caractérisation de la nitrate reductase au cours de l'embryogenese somatique chez *Daucus carota* L.
These 3eme cycle. Universite de Lille I
- RAMBAUD C. et RAMBOUR S., 1988. - Partial characterization of nitrate reductase in carrot cells; changes in enzymatic activity during somatic embryogenesis
Plant Physiol. Biochem. 27, (2) sous presse.
- RAMBOUR S., 1986. - La nitrate réductase marqueur de la croissance cellulaire et de la différenciation organogène? Etude de sa régulation dans une suspension cellulaire de *Silène* et des tissus de Chicorée de Bruxelles cultivés *in vitro*.
Thèse d'Etat. Universite de Lille I
- RAMBOUR S. POULLE M. DANIAU J.L. et BRASSART C., 1983. - Régulation de l'activité de la nitrate réductase dans une suspension cellulaire de *Silene alba*.
Can. J. Bot. 61, 3523-3529
- RAO L V M., DATTA N., MAHADEVAN M., GUHA-MUKERJEE S. and SOPORY S.K., 1984. - Influence of cytokinins and phytochrome on nitrate reductase activity in etiolated leaves of maize.
Phytochem., 23, 1875-1879.

- RAYMOND P. and PRADET A., 1980.-Stabilization of adenine nucleotide ratios at various levels by an oxygen limitation of respiration in germinating lettuce *Lactuca sativa* seed.
Biochem.J. 190, 39-44.
- REDINBAUGH M.G. and CAMPBELL W.H., 1981.-Purification and characterization of NAD(P)H:nitrate reductase from corn roots.
Plant Physiol., 68, 115-120.
- REDINBAUGH M G. and CAMPBELL W.H.-1983-Purification of squash NADH:nitrate reductase by zinc chelate affinity chromatography
Plant Physiol. 71, 205-207.
- REDINBAUGH M.G. and CAMPBELL W.H.. 1985. - Quaternary structure and composition of squash NADH : nitrate reductase.
J. Biol. Chem., 260, 3380-3385.
- REED A.J. and CANVIN D.T. 1982. - Light and dark controls of nitrate reduction in wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts.
Plant Physiol., 69, 508-513.
- REED A.J. and HAGEMAN R.H., 1980. - Relationship between nitrate uptake, flux, and reduction and the accumulation of reduced nitrogen in maize (*Zea mays* L.). II. Effect of nutrient nitrate concentration.
Plant Physiol., 66, 1184-1189.
- REMMLER J.L and CAMPBELL W.H., 1986.-Regulation of corn leaf nitrate reductase .II.Synthesis and turnover of enzymes activity and protein.
Plant Physiol., 80, 442-447.
- ROBIN P., 1979.-Etude de quelques conditions d'extraction de la nitrate réductase des racines et des feuilles de plantules de Mais.
Physiol. Vég., 17(1), 45-54.
- ROBIN P., 1983.-Contribution à l'étude de la réduction du nitrate chez les plantes cultivées.
Thèse d'Etat. Université des sciences et techniques du Languedoc Montpellier.

- ROBIN P., CONEJERO G., PASSAMA L. et SALSAC L., 1983. - Evaluation de la fraction métabolisable du nitrate par la mesure *in situ* de sa réduction. *Physiol. Vég.*, 21, 115-122.
- ROBIN P., CONEJERO G., TRANCHANT J.P., PASSAMA L. et SALSAC L., 1983. - Mesure de la réduction du nitrate dans les feuilles intactes. *Physiol. Vég.*, 21, 123-128.
- ROTH-BEJERAMO N. and LIPS S.H., 1970. - Hormonal regulation of nitrate reductase activity in leaves. *New phytol.*, 69, 165-169.
- ROUSTAN J.L., NEUBURGE M. and FOURCY A., 1974. - Nitrate reductase of maize. Some properties. *Physiol. Vég.*, 12, 527-544.
- RUSTIN P., MOREAU F. and LANCE C., 1980. - Malate oxidation in plant mitochondria via malic enzyme and the cyanide-insensitive electron transport pathway. *Plant Physiol.*, 66, 457-462.
- SAFTNER R.A. and WYSE R.E., 1984. - effet of plant hormones on sucrose uptake by sugar beet root tissue Discs. *Plant Physiol.*, 74, 951-955.
- SAKSI N., 1985. - Cultures et potentialités de régénération de protoplastes de feuilles de *Cichorium intybus* L. var Witloof. Thèse 3ème cycle Université de Lille I.
- SARKISSIAN G.S. and FOWLER M.W., 1974. - Inter-relationship between nitrate assimilation and carbohydrate metabolism in plant roots. *Planta*, 119, 335-349.
- SAWHNEY S.K., NAIK M.S. and NICHOLAS D.J.D., 1978. - Regulation of nitrate reduction by light, ATP and mitochondrial respiration in wheat leaves. *Nature*, 272(5654), 647-648.
- SCHRADER L.E., GATALDO D.A. and PETERSON D.M., 1974. - Use of protein in extraction and stabilization of nitrate reductase. *Plant Physiol.*, 53, 688-690.

- SHANER D.L. and BOYER J.S., 1976. - Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux.
Plant. Physiol., 58, 499-504.
- SHEN T.C., FUNKHOUSER E.A. and GUERRERO M.G., 1976. - NADH and NAD(P)H nitrate reductases in rice seedlings.
Plant Physiol., 58, 292-294
- SHERRARD J.H. and DALLING M.J., 1978. - Effect of casein on extractibility and stability of nitrate reductase from wheat leaves.
Ann. Bot., 42, 1421-1427.
- SHERRARD J.H., KENNEDY J.A. and DALLING M.G., 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.
- SMARELLI J. Jr. and CAMPBELL W.H., 1981. - Immunological approach to structural comparison of assimilatory nitrate reductase.
Plant Physiol., 55, 12-1230.
- SNAPP S., SOMERS D.P.A. and VARNER R.L., 1984. - Immunological comparisons of higher plant nitrate reductases.
Plant. Sci. Lett., 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 S. A. and WARNER R.L., 1982. - Barley nitrate reductase contains a functional cytochrome b 557.
Plant. Sci. Lett., 24(3), 261-265.
- SOMERS D.A., KUO T., KLEINHOF S. A. and WARNER R.L., 1983. - Nitrate reductase deficient mutants in barley: immunoelectrophoretic characterization.
Plant Physiol., 71, 145-149.

- SOUALMI K. and CHAMPIGNY M.L.,1986.-Comparison of the NADH:nitrate reductases wheat shoots and roots.
J.Plant Physiol.,125,35-45
- SOUALMI-BOUJEMAA K.,MOYSE A.and CHAMPIGNY M.L.,1985;-Modulation of nitrate reductase in wheat shoot and root by nitrate.
Physiol.Vég.,23,869-875.
- SRIVASTAVA H.S., 1980.-Regulation of nitrate reductase activity in higher plants.
Phytochemistry,19,725-733.
- STEPAN-SARKISSIAN G. and FOWLER M.W., 1978. - Changes in the levels of metabolites of the pathway of carbohydrate metabolism during the induction of nitrate assimilation in pea roots.
Biochem. Physiol. Pflanzen, 172, 1-13.
- STREIT L.,MARTIN B.A and HARPER J.E., 1987.-A method for the separation and partial purification of the three forms of nitrate reductase present in wild-type soybean leaves.
Plant Physiol.,84,473-478.
- SUNG Z.R.and OKIMOTO R.,1981.-Embryonic proteins in somatic embryos of carrot.
Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,78,3683-3687.
- SUZUKI A., GADAL P. and OAKS, XXX, 1981. - Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots.
Planta, 151, 457-461.
- TENCATE C.H.and BRETELER H.,1982.Effect of growth regulators on nitrate utilization by roots of nitrogen depleted dwarf bean.
J.Exp.Bot.,133,37-46.
- TEN CATE C.H and BRETELER H.,1981.-Role of sugars in nitrate utilization by roots of dwarf bean.
Physiol.Plant., 52,129-135.

- THOM M., MARETZKI A., KUMOR E. et SAKAI W.S.,1981.-Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. *Plant Cell Tissu Organ Culture*,1:3-14.
- UDAYAKUMAR M., DEVENDRA R., SREENIVASA REDDI V. and KRISHNA SASTRY K.S., 1981. - Nitrate availability under low irradiance and its effect on nitrate reductase activity. *New. Physiol.*, 88, 289-297.
- 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.
- VASSEUR J.et ROGER V.,1983.-Synthèses d'acides nucleiques et de proteines au cours de l'initiation de bourgeons adventifs sur des explantats de *Cichorium inthybus* cultivés *in vitro* *Physiol.Plant*,57,485-491.
- VENNESLAND B.1981.-HCN and control of nitrate reduction. The regulation of the amount of the active nitrate reductase present in chlorella cells. In: *Biochemistry and Physiology of nitrogen and Sulfur Metabolism*. Ed. H. Bothe, A. Trebst. Berlin: Springer.
- WALLACE W.,1973;-A nitrate reductase inactivating enzyme from maize root. *Plant Physiol.*,52,197-201.
- WALLACE W., 1986. - Distribution of nitrate assimilation between the root and the shoot of legumes and a comparison with wheat. *Physiol. Plant.*, 66, 630-636.
- WELLS G.N.and HAGEMAN R.H.,1974.-Specificity of nicotinamide adenine dinucleotide by nitrate reductase from leaves. *Plant Physiol*,54,136-141.
- WRAY J.L and FILNER P.,1970.-Structural and functional relationships of enzyme activities by nitrate in barley. *Biochem.J.*,119:715-725.
- WRAY J.L and KIRK D.W.,1981.-Inhibition of NADH-nitrate reductase degradation in barley leaf extract by leupeptin. *Plant.Sci.Lett.*,23,207-213.

- YAMAYA T. and OHIRA K., 1976., Nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture.
Plant Physiol., 17, 633-641.
- ZAMSKI E. and WYSE R.E., 1985., -Stereospecificity of glucose carrier in sugar beet suspension cells.
Plant Physiol., 78, 291-295.
- ZIELKE H.R. and FILNER P., 1971., -Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultured tobacco cells.
J. Biol. Chem., 246, 1772-1779.

RESUME

Deux suspensions cellulaires de la Chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* L. var. Witloof) possèdent des caractéristiques différentes. la souche B₂₂ non organogène prolifère très rapidement et présente donc un cycle de croissance court. La souche A₁₁ a conservé ses potentialités organogènes mais prolifère lentement.

La mise au point d'un tampon d'extraction renfermant des inhibiteurs protéasiques et des protecteurs contre l'oxydation des phénols a permis d'extraire et de purifier la nitrate réductase de B₂₂ mais non de A₁₁.

La nitrate réductase de B₂₂ est une NADH:NR dont les constantes d'affinité pour le NADH et le NO₃⁻ sont respectivement de 2.10⁻⁵M et 0.8 10⁻⁴M. Le NADH utilisé a une origine mitochondriale et cytoplasmique. L'activité nitrate réductase est maximale au 3ème jour de culture ; elle est étroitement corrélée à l'utilisation du saccharose qui est d'abord hydrolysé dans le milieu avant d'être utilisé.

En présence d'ABA (10⁻⁴M), la croissance cellulaire, l'absorption et l'assimilation du nitrate sont ralenties, mais l'activité NR est paradoxalement augmentée. L'hydrolyse du saccharose du milieu est également inhibée et le métabolisme des sucres intracellulaires est modifié. La charge énergétique est maintenue constante, elle est identique à celle des cellules témoins. L'accroissement de l'activité NR pourrait être dû à une disponibilité en NADH plus importante ou à une modification de la structure ou du "turnover" de la protéine enzymatique.

ABSTRACT

Two suspension cultures of *Cichorium intybus* L. possess different growth rates. Strain B₂₂ grows very rapidly, and has a short growth cycle but has lost all its regeneration potentialities. Strain A₁₁ grows slowly but retains organogenic capacities.

An extraction buffer containing protease inhibitors as well as protectors against phenol oxidation enables the extraction of the NR from B₂₂ but not from A₁₁.

Nitrate reductase from B₂₂ is a NADH:NR. The apparent K_m for NADH and NO_3^- are $2 \cdot 10^{-5}$ M and $0,88 \cdot 10^{-4}$ M respectively. Both cytoplasmic and mitochondrial NADH are used for the nitrate reduction.

Nitrate reductase activity peaks at day 3 of the culture and is tightly correlated to the metabolism of sucrose, which is the main carbon source in the medium. Sucrose is hydrolysed before it is used by the cells.

When the cells are cultured in presence of 10^{-4} M ABA, growth, nitrate absorption and assimilation are inhibited but NR activity is surprisingly enhanced. The hydrolysis of sucrose as well as the intracellular sugar metabolism are inhibited but the energy charge remains constant and equals that of control cells.

The NR activity enhancement could result from a higher level of intracellular NADH or from a modified conformation and turn over of the enzymatic protein.