

N° d'ordre

**THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE des SCIENCES et
TECHNOLOGIES de LILLE**

**Clonage, Caractérisation et Etude de l'Expression du
gène de la
Nitrate Réductase chez *Cichorium intybus* L.**



Option: PHYSIOLOGIE ET GÉNÉTIQUE MOLECULAIRE VEGETALE

par

Benoît PALMS

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université en Sciences de la Vie et de la Santé

Soutenue devant la commission d'examen:

S. Rambour
P. Rouzé
T. Lamaze
M. Van Montagu
D. Thomas

Professeur, Université de Lille I
Directeur de Recherche, INRA Gand
Chargé de Recherche, INRA Montpellier
Professeur, Université de Gand
Professeur, Université de Compiègne

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Avant-propos

Le travail qui a fait l'objet de ce mémoire a été réalisé principalement au laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire Végétales de Lille I sous la direction de Monsieur le Professeur Serge Rambour. Je lui adresse l'expression de ma vive reconnaissance pour son soutien, ses conseils précieux et son amitié tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur Pierre Rouzé d'avoir accepté d'examiner ce travail, de ses avis et ses critiques précieuses concernant la rédaction de mon travail ainsi que pour en avoir fait le rapport.

Je remercie également Monsieur Thierry Lamaze pour ses conseils et d'avoir assuré le rapport de ma thèse.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le Professeur Marc Van Montagu pour m'avoir donné toutes les facilités au sein de son laboratoire ainsi que d'avoir accepté de participer au jury.

Je suis également reconnaissant à Monsieur le Professeur Daniel Thomas d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse.

Qu'il me soit permis de remercier les Entreprises Hoquet Graines de bien avoir voulu financer une partie de ce travail.

Je voudrais remercier plusieurs personnes du laboratoire de Génétique à Gand, en plus particulier Janice et Gilbert pour m'avoir fait découvrir les techniques de l'hybridation in situ ainsi que Nino, Jan et Wilson pour leur participation importante au séquençage.

Je tiens également à remercier toute l'équipe sans qui ce travail n'aurait jamais pu aboutir: Eric, pour tous ses encouragements, ses histoires belges (Ah ça, Eric!), Malika pour son optimisme (Allah est grand!), Pascale pour sa bonne humeur (mais aussi pour les 15 derniers nucléotides ...!), Christophe (toujours aussi calme), Robert pour m'avoir fait découvrir les petits astuces du 'cyberspace', Nathalie pour ses 'activités', Brigitte pour son 'secours', et tout ceux qui, à titres divers, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Enfin, je tiens surtout à remercier de tout mon coeur Martine pour sa compréhension, sa gentillesse, ses encouragements, et surtout sa patience... .

ABBREVIATIONS

BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate Toluidine
BSA	Bovine Serum Albumine
cpm	Coups par minute
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DIG	Digoxigénine
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène-diaminetétra-acetate de sodium
HEPES	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-éthane sulfonique
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MF	Matière Fraîche
MOPS	Morpholinopropane-sulfonate
NAD(P)H	Nicotinamide adénine (phosphate) réduite
NBT	p-Nitro Blue Tetrazolium Chloride
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyéthylèneglycol
PIPES	1,4-piperazinediethanesulfonic acid
PMSF	Phényl Méthyl-Sulfonyl Fluoride
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SSC	Standard Sodium Citrate buffer
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	Tris (hydroxyméthyl) amino méthane
TRITON	p-isocétylpolyoxyéthylène phénol (polymère)
UDP	Uridine 5'Diphosphate
UDPG	Uridine 5'Diphosphoglucose
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	2
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1.L'azote dans le monde végétal	5
2. Structure et domaines de la protéine Nitrate réductase.....	6
3. Structure primaire de la nitrate réductase.....	9
4.L'assimilation du nitrate	11
4.1. Absorption du nitrate et activité nitrate réductase.....	11
4.2. Activité nitrate réductase et métabolisme carboné	13
4.3. Le métabolisme carboné et ANR dans des organes tubérisés.....	16
5. Régulation de la nitrate réductase	18
5.1.La lumière et les glucides	18
5.2. Les métabolites azotés	19
5.3. Les phytohormones.....	19
5.3.1. Hormones diverses.....	20
5.3.2. Effet de l'ABA	20
5.4. Régulation post-traductionnelle.....	21
6.Conclusion	23
MATERIEL ET METHODES	24
I. Le matériel végétal.....	25
II. Manipulations concernant les acides nucleiques	26
III. Les techniques d'hybridation <i>in situ</i>	35
IV. Dosages des activites enzymatiques.....	38
V. Dosage des glucides	43
RESULTATS	45
A. Construction de la banque d'ADNc	46
1. Construction de la banque	47
2.Criblage de la banque	52
3. Analyse de l'insert	53
B. Etude de la régulation de la nitrate réductase chez la chicorée	56
I. Etude de l'expression du gène <i>nia</i> dans la jeune plantule.....	57
1. L'induction par le nitrate	57
2. Effet de la concentration du nitrate sur la répartition spatiale des activités	58
3. Etude au niveau cellulaire.....	59
II. Etude de la nitrate réductase et du métabolisme carboné dans les suspensions cellulaires en présence d'ABA.....	68
1. Introduction du problème.....	67
1.1. Action de l'acide abscissique sur la croissance cellulaire.....	67
1.2. L'effet de l'ABA sur l'activité NR.....	68
1.3. Effet de l'ABA sur la transcription du gène <i>nia</i>	69
1.4. Effet de l'ABA sur l'activité de l'invertase acide (INV).....	71
1.5. Effet de l'ABA sur l'activité Saccharose Synthase (SS)	72
1.6. Effet de l'ABA sur l'activité Saccharose Phosphate Synthase (SPS)....	73

1.7. Conclusion	74
2. Analyse des glucides intra- et extra-cellulaires	75
3. Etude des états de phosphorylation et de déphosphorylation	79
2.1. Etude de l'état de la protéine active NR	79
2.2. Etude de l'état de la protéine active SPS	80
2.3. Conclusion	82
4. Influence de l'ABA sur l'activité NR dans la plantule	82
C. Clonage du gène <i>nia</i> chez la chicorée.....	84
1. Introduction.....	85
2. Détermination du nombre de gènes <i>nia</i> chez la chicorée de Bruxelles.....	85
3. Utilisation de la PCR pour le clonage du gène <i>nia</i>	86
3.1. Approche utilisée	86
3.2. Amplification et clonage des fragments.....	87
3.3. La région flavinique et hémique	91
3.4. La partie molybdique.....	93
3.5. Clonage du fragment correspondant à la partie N-terminale.....	95
4. Clonage de la région 3' non-codante du gène <i>nia</i>	95
5. La partie 5' régulatrice du gène <i>nia</i>	97
6. Conclusion	98
DISCUSSION.....	99
1. Le clonage du gène <i>nia</i>	100
2. La séquence nucléotidique	101
3. L'analyse de la structure protéique de la nitrate réductase de la chicorée	103
4. La répartition de l'activité nitrate réductase.....	110
4.1. L'apport énergétique à la réduction du nitrate.....	110
4.2. Interaction ABA-ANR.....	114
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	118
ANNEXES	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	133
RESUME	161

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le nitrate joue deux rôles importants dans la plante. D'abord il constitue une source d'azote nécessaire à la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques, d'autre part il participe au maintien de la régulation osmotique soit parce qu'il s'accumule dans les feuilles, soit parce que sa réduction produit des acides organiques qui sont stockés dans les vacuoles (Salsac, 1982). L'accumulation de ces anions exerce un appel d'eau du milieu extérieur, ce qui peut faciliter la circulation de la sève brute en absence de transpiration, comme c'est le cas lors du forçage de racines de chicorée, réalisé à l'obscurité et en humidité saturante (Fouldrin et Limami, 1993).

Le nitrate peut, lorsqu'il est absorbé à fortes doses, être particulièrement dangereux pour les nourrissons et les jeunes animaux, chez qui il peut former des nitrosamines qui sont carcinogènes ou de la méthémoglobine qui entrave la respiration.

La teneur en nitrate est cependant variable selon les espèces et peut atteindre de 80 à 120 mmoles par kg de matière fraîche dans les feuilles d'épinard, de laitue ou de scarole alors qu'elle n'est que de 3 à 3,5 mmole par kg de matière fraîche chez le chicon (Chaillou et Limami, 1994; Reinink *et al.*, 1994). La chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* L. var. Witloof) qui, comme la laitue ou la scarole (*Cichorium endiviae* L.) est une *Asteraceae*, présente l'avantage de ne pas provoquer de risques d'intoxication par le nitrate.

C'est une plante bisannuelle, qui semée en avril-mai, développe une rosette de feuilles et une racine tubérisée qui est récoltée en septembre-octobre. Mise à l'obscurité et en conditions hydroponiques, elle produit un bourgeon étioilé aux feuilles fortement imbriquées: l'endive ou le chicon.

La chicorée de Bruxelles est cultivée dans le nord de la France (12000 ha), la Belgique (8000 ha) et les Pays-Bas (4000 ha), ce qui montre son importance économique.

Sa culture est peu exigeante en nitrate et les producteurs savent de longue date que l'apport de fumures azotées importantes induit une susceptibilité accrue à diverses infections fongiques et surtout bactériennes (*Erwinia chrysantemii*, *Pseudomonas pectynolytica*, ...). D'autre part des expérimentations de nutrition azotée menées en conditions contrôlées, montrent que des concentrations en nitrate de 3 mM permettent l'obtention de racines tubérisées produisant des chicons de bonne qualité, alors que des concentrations de 6 mM produisent des racines, qui en forçage développeront des chicons dont les feuilles s'écartent et ne sont plus imbriquées et qui sont donc de mauvaise qualité.

Enfin les agriculteurs ont également remarqué que de courtes périodes de sécheresse, survenant en fin de végétation, sont également capables d'assurer une production de bonne qualité. Des stress hydriques pourraient donc, à condition de ne pas être prolongés, avoir une incidence positive sur la production d'un chicon de qualité. L'ABA pourrait intervenir à cette étape, car il existe une relation entre le froid, la sécheresse et l'ABA (Howarth et Ougham, 1993).

Bien que les mécanismes soient inconnus, l'activité nitrate réductase et la vitesse relative de croissance sont étroitement corrélées. D'une part la croissance exige l'apport d'azote, et d'autre part elle exerce un appel sur l'absorption du nitrate (Touraine *et al.*, 1994). En effet les plantes à croissance rapide ont une capacité d'absorption élevée et réduisent souvent le nitrate dans les feuilles (Garnier *et al.*, 1989), alors que les plantes à croissance lente, comme les ligneux, le réduisent dans la racine et possèdent un système d'absorption qui ne permet pas de saturer les sites de réduction (Gojon *et al.*, 1994).

Dans ce contexte, la chicorée de Bruxelles constitue un système intermédiaire intéressant: c'est une herbacée, bisannuelle, à croissance végétative lente qui réduit le nitrate principalement dans la racine lorsqu'elle est jeune, et dans les feuilles vertes lorsque la racine tubérise et accumule des polymères de fructose tel que l'inuline (Dorchies et Rambour, 1983). L'accumulation de fructosanes dans des tubercules constituerait un mécanisme de résistance aux basses températures et pourrait également accroître l'efficacité de la réduction du CO₂ aux basses températures (Pollock et Chatterton, 1988).

Cette physiologie particulière de la chicorée de Bruxelles permet donc d'aborder l'étude de l'influence du métabolisme carboné et de stress environnementaux sur l'assimilation du nitrate.

N'ayant pas pu cloner et caractériser le promoteur, nous avons utilisé une sonde ADNc nitrate réductase, pour aborder l'étude de quelques aspects du métabolisme azoté, dans la plante entière, mais aussi dans des suspensions cellulaires de chicorée. Des études antérieures menées dans le laboratoire sur des suspensions cellulaires de *C. intybus* ont montré de façon surprenante une diminution de la croissance entraînant une hausse de l'activité nitrate réductase et une modification du métabolisme du saccharose (Chraïbi, 1988).

C'est dans ce contexte que se situe notre travail; le but fixé était de cloner et de caractériser la gène *nia* de la chicorée de Bruxelles, ainsi que sa partie régulatrice, dans la perspective de pouvoir fabriquer des constructions chimériques permettant d'une part la surexpression du gène et d'autre part l'étude de sa régulation par l'ABA, qui à forte concentration inhibe la croissance des cellules de chicorée mais provoque une augmentation de l'activité nitrate réductase.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

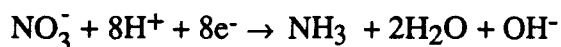
1. L'AZOTE DANS LE MONDE VÉGÉTAL

Pour construire leurs composants cellulaires, en particulier les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle, les plantes ont besoin d'un élément essentiel: l'azote. Les plantes le puisent directement dans le sol principalement sous une forme minérale, le nitrate.

Les plantes peuvent aussi puiser l'azote sous d'autres formes que le nitrate. Ainsi d'une part, l'ammonium peut être fourni par l'apport d'engrais, mais dans un sol normalement aéré, il est rapidement oxydé sous forme de nitrate; il existe d'autre part des relations symbiotiques par des associations rhizosphériques (*Azospirillum*) ou des associations actinorhizales dans lesquelles l'azote assimilé est directement transféré de la bactérie (*Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*) vers la plante (légumineuse).

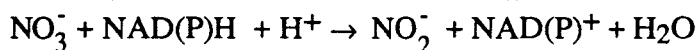
La réduction du nitrate a un coût très élevé pour la plante, en ce sens qu'elle consomme près de 20% de l'énergie photosynthétique (de la Torre, 1991).

La conversion du nitrate en ammonium demande un apport de 8 électrons et se fait en deux étapes.



Elle provoque une alcalinisation du contenu cellulaire (Dijkshoorn, 1962) et induit la mise en œuvre d'un mécanisme de régulation du pH intracellulaire: le pHstat biochimique (Raven et Smith, 1976).

La première étape est la réduction du nitrate en nitrite catalysée par la nitrate réductase (NR). Elle demande un apport de 2 électrons:



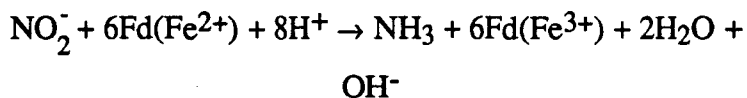
Dans la mesure où les produits de réduction du nitrate (le nitrite et l'ammonium) sont toxiques, la plante est dans l'obligation d'assimiler le nitrate. Par conséquent cette étape régule toute l'assimilation du nitrate absorbé et est donc le facteur limitant du développement et de la croissance de la plante entière (Guerrero *et al.*, 1981). La présence de la nitrate réductase dans les racines et les feuilles des plantes supérieures, sa purification partielle et sa caractérisation ont été décrites pour la première fois par Evans et Nason (1953).

Les deux électrons proviennent des nucléotides pyridiniques: le NADH ou le NADPH. Ainsi, chez les végétaux supérieurs trois types de nitrate réductases existent. L'une n'utilise que le NADH comme donneur d'électrons (NADH:NR; EC 1.6.6.1), l'autre

n'utilise que le NADPH (NADPH:NR; EC 1.6.6.3.) et la troisième est une NR bispécifique, qui utilise soit le NADH soit le NADPH (NAD(P)H:NR; EC 1.6.6.2.).

La plupart des plantes et des algues analysées jusqu'à présent possèdent une NR qui utilise le NADH comme donneur d'électrons. On retrouve le plus fréquemment la NADH:NR dans les feuilles, tandis que la NAD(P)H:NR est plutôt retrouvée dans les racines. La NADPH:NR est présente chez les champignons, mais n'a jamais été isolée chez les plantes supérieures. Chez la chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* var. Witloof) la seule forme mise en évidence est une NADH:NR (Chraïbi, 1988).

La deuxième réaction est la réduction du nitrite en ammonium catalysée par la nitrite réductase (NiR EC 17.7.1.). Elle utilise 6 électrons et est couplée au transport photosynthétique d'électrons par un produit de la photosynthèse, la ferrédoxine réduite.



La réduction du nitrate en nitrite s'effectue dans le cytoplasme et le nitrite est ensuite transporté dans le chloroplaste où il est réduit en ammonium qui à son tour est assimilé en glutamine. Le pouvoir réducteur (la Fd_{red}) nécessaire à l'assimilation du nitrite est directement généré par la photosynthèse. Le nitrite accumulé réduit notamment le transfert d'électrons entre les deux photosystèmes (Sinclair, 1987). C'est probablement pour des raisons de toxicité qu'il existe une co-régulation entre la NR et la NiR (Faure *et al.*, 1991). A l'obscurité le nitrite est transporté et assimilé dans les plastes. L'énergie nécessaire à cette assimilation est alors produite par le métabolisme glucidique (Huppe et Turpin, 1994).

2. STRUCTURE ET DOMAINES DE LA PROTÉINE NITRATE RÉDUCTASE

Depuis les travaux de Redinbaugh et Campbell (1985) on admet que la protéine enzymatique est un homodimère dont chaque sous-unité a une masse moléculaire d'environ 110 kDa. Des analyses après protéolyses partielles ont révélé l'existence de domaines d'oxydo-réduction fonctionnels (Solomonson *et al.*, 1986; Kubo *et al.*, 1988). Il en existe trois par monomère: la partie flavinique dans la région C-terminale de la protéine, suivie par la partie hémique et finalement la partie molybdique en région N-terminale. Grâce à sa structure, la NR permet une complémentarité intragénique. Ceci signifie que lorsqu'une sous-unité NR défectueuse dans un domaine fonctionnel est complexée avec une sous-unité défectueuse dans un autre domaine, une activité enzymatique totale peut être reconstituée avec un transfert d'électrons parcourant

l'ensemble des domaines des différentes sous-unités (Pelsy et Gonneau, 1991). Plus récemment Lu *et al.* (1994) ont pu mettre en évidence la structure tridimensionnelle de la région flavinique de la nitrate réductase de maïs. Une comparaison avec d'autres membres de flavoprotéines indique qu'il existe une différence dans l'orientation des lobes liant les cofacteurs à FAD et NADH, indiquant l'importance des modifications structurales pour la fonction biologique de la protéine. La structure tridimensionnelle de la protéine apporte également l'explication moléculaire des différences de spécificité pour le NADH et le NAD(P)H des nitrate réductases (Lu *et al.*, 1994).

Les domaines sont associés avec des groupements prosthétiques: la flavine adénine nucléotide (FAD), un cytochrome b557 et une molybdoptérine (Losada *et al.*, 1981) qui assurent le transit des électrons du NAD vers le nitrate. Le flux d'électrons partant du NAD(P)H passe d'abord par la partie flavinique C-terminale, puis par le domaine hémique; ensuite par le domaine molybdique pour arriver finalement au nitrate (Figure 1).

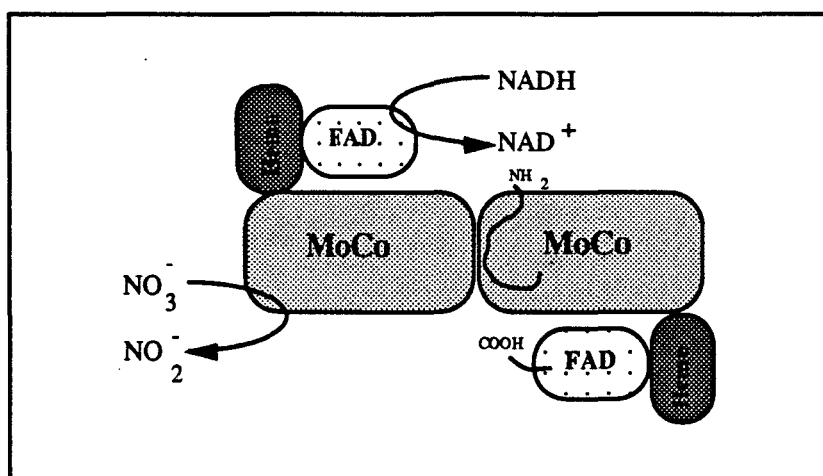


Figure 1. Structure et domaines catalytiques de la NR des végétaux supérieurs. Les sites de donneurs et accepteurs d'électrons par sous-unité, ainsi que les domaines amino- et carboxy-terminaux sont représentés dans ce modèle hypothétique d'une molécule NR dimérique (d'après Caboche et Rouzé, 1990).

Les séquences primaires de ces domaines catalytiques ont été bien définies et comparées à celles de protéines à pouvoir d'oxydoréduction (Figure 2) (pour revue voir: Kleinhofs et Warner, 1990; Solomonson et Barber, 1990; Rouzé et Caboche, 1992; Campbell et Kinghorn, 1990). Pour la partie flavinique de la protéine, une homologie importante jusqu'à 47 % est retrouvée avec la cytochrome b5 réductase (Yubisui *et al.*, 1987). La partie hémique a des homologies de 32 à 48 % avec la cytochrome b5 (Le et Lederer, 1983; Calza *et al.*, 1987). En ce qui concerne la partie molybdique, elle n'a pas ou peu d'homologies avec les molybdoprotéines, mais, mis à part les 80 premiers acides aminés,

elle présente des régions d'homologie (jusqu'à 40 %) avec la sulfite oxydase (Crawford *et al.*, 1988) (Figure 2).

Mis à part son activité physiologique globale, la nitrate réductase (NR:NADH) possède aussi des activités partielles qui sont catalysées par les différents domaines de l'enzyme. Ces activités partielles peuvent être divisées principalement en deux groupes: d'une part les activités indépendantes du site de liaison avec le nitrate, nommées activités diaphorases ou NADH:déhydrogénases qui permettent la réduction par le NADH du ferricyanure [NADH:FR] et nécessitent du FAD, du cytochrome c [NADH:CR] ou encore de dichlorophénol indophénol [NADH:DR]. Ces deux dernières réactions nécessitent du FAD et le groupement prosthétique hémique (Solomonson et McCreery, 1986; Kubo *et al.*, 1988; Notton *et al.*, 1989); d'autre part celles dont les activités sont indépendantes du site de liaison avec le NADH. Dans ce cas les électrons nécessaires à la réduction du nitrate, sont fournis par la flavine réduite (FADH₂:NR ou FMNH₂:NR) et nécessitent le groupement prosthétique hémique ainsi que MoCo. Les électrons peuvent aussi être fournis par le méthylviologène réduit (MV:NR), ou encore par le bleu de bromophénol (BB:NR); ils ne nécessitent alors que le MoCo (Chérel *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1987; Wray et Fido, 1991).

L'existence de ces fonctions partielles sont particulièrement intéressantes pour la caractérisation des mutants NR ainsi que pour l'identification et l'étude des domaines fonctionnels de l'enzyme par des digestions protéolytiques partielles (Solomonson *et al.*, 1986). Des régions sensibles à la protéolyse et séparant les domaines catalytiques ont été mises en évidence par Kubo *et al.* (1988). Une digestion protéolytique par la trypsine de la NR de l'épinard a permis l'obtention de deux polypeptides de 59 et de 45 kDa (Kubo *et al.*, 1988). Le polypeptide de 45 kDa contient les groupes prosthétiques flavinique et hémique avec leurs activités partielles NADH:FR et NADH:CR. Le polypeptide de 59 kDa contient la Mo-ptérine. Par contre une incubation en présence de la protéase V8 de *Staphylococcus aureus* libère un monomère de 30 kDa contenant le FAD avec l'activité NADH:FR, ainsi qu'un dimère de 170 kDa, contenant les groupes prosthétiques hémique et Mo-ptérine, avec les activités FH:NR et MV:NR. Le polypeptide de 45 kDa obtenu par traitement par la trypsine, peut être coupé une fois de plus par la protéase V8 afin de donner deux fragments de 28 et 14 kDa (Kubo *et al.*, 1988; Notton *et al.*, 1988). Les données obtenues par séquençage de la protéine et par protéolyse partielle indiquent que deux régions sensibles à la protéolyse séparent les domaines catalytiques (figure 2) (Nakagawa *et al.*, 1990). En comparant les séquences d'acides aminés de différentes NR, Daniel-Vedele *et al.* (1989) ont montré que ces séquences de 25 à 30 acides aminés ne sont pas très conservées et qu'elles ont divergé rapidement au cours de l'évolution.

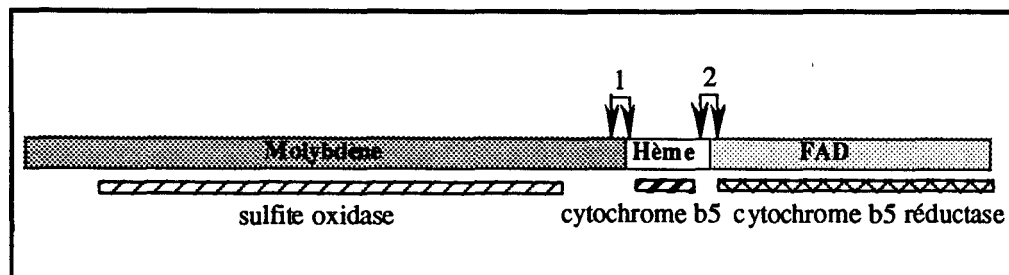


Figure 2 : Représentation schématique des régions d'homologies de la nitrate réductase avec d'autres protéines et des régions sensibles à la protéolyse par la trypsine (1) et la protéase V8 (2).

Chez les plantes supérieures les séquences en acides aminés des NR varient selon les espèces et comprennent de 891 à 928 résidus. Les NR d'*Arabidopsis*, de la tomate, de l'orge et du tabac présentent des taux d'homologies de 70 à 80 %, selon la distance phylogénique, ce qui signifie que la NR est une enzyme moyennement conservée parmi les plantes supérieures.

3. STRUCTURE PRIMAIRE DE LA NITRATE RÉDUCTASE

Le gène codant pour l'apoprotéine de la nitrate réductase a été cloné chez de nombreuses espèces différentes. Les méthodes utilisées sont basées sur l'isolement d'une fraction de messagers polyadénylés de plantes mises en conditions d'induction de la nitrate réductase. Des banques d'ADNc sont construites après transcription inverse des ARNm et clonage des ADNc dans les phages λ gt11. Les recombinants sont triés par des anticorps polyclonaux anti-nitrate réductase.

Le premier ADNc NR de 1,1 Kb a été isolé chez l'orge à l'aide d'un anticorps homologue (Cheng *et al.*, 1986) alors que le premier ADNc 'full length' a été isolé chez la courgette (Crawford *et al.*, 1986).

Des criblages de banques génomiques à l'aide des ADNc ont permis d'isoler et de séquencer les gènes *nia* des plantes supérieures telles que le tabac (Vaucheret *et al.*, 1989), la tomate (Daniel-Vedèle *et al.*, 1989), *Arabidopsis thaliana* (Wilkinson et Crawford, 1991 et 1993), le riz (Choi *et al.*, 1989), la courgette (Hyde *et al.*, 1991), le haricot (Hoff *et al.*, 1991; Jensen *et al.*, 1993), l'orge (Miyazaki *et al.*, 1991), *Lotus japonicus* (Waterhouse *et al.*, 1994) ainsi que des algues comme *Volvox carteri* (Gruber *et al.*, 1992), *Chlamydomonas reinhardtii* (Fernandez *et al.*, 1989) et des champignons comme *Aspergillus nidulans* (Johnstone *et al.*, 1990), *Aspergillus niger* (Unkles *et al.*, 1992), *Neurospora crassa* (Fu et Marzluf, 1987; Okamoto *et al.*, 1991), *Ustilago maydis* (Banks *et al.*, 1993), *Fusarium oxysporum* (Diolez *et al.*, 1993) et de l'ascomycète *Leptosphaeria maculans* (Williams *et al.*, 1994).

Le nombre de gènes chez les plantes supérieures peut varier d'une copie chez les *Solanaceae* (Pelsy et Caboche, 1992) à 8 copies chez le riz, selon le cultivar (Kleinhofs *et*

al., 1988) (tableau 1). La raison pour laquelle certaines plantes possèdent plusieurs enzymes nitrate réductase n'est pas connue, mais elle peut être liée à une optimisation de la réduction du nitrate dans différentes conditions physiologiques (Hoff *et al.*, 1992).

Plantes supérieures	# gènes/n	# introns
<i>Cucurbita maxima</i>	1	3
<i>Petunia hybrida</i>	1	3
<i>Nicotiana tabacum</i>	1	3
<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	3
Spinaceae oleracea	1	3
<i>Betula pendula</i>	1	3
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	3 (<i>nia1</i>), 2 (<i>nia2</i>)
<i>Hordeum vulgare</i>	1 à 7	1 (<i>Nar1</i>), 2 (<i>Nar7</i>)
<i>Oryza sativa</i>	2 à 8	3 (<i>nia1</i>)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	2 ?	3 (<i>nia1</i>), 4 (<i>nia2</i>)
<i>Lotus japonicus</i>	1 ?	3
<i>Zea mays</i>	2 ?	?

Algues		
<i>Volvox carteri</i>	1	10
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	n.d.

Champignons		
<i>Emericella niger</i>	1	3
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	6
<i>Leptosphaera maculans</i>	1	4
<i>Neurospora crassa</i>	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	1
<i>Ustilago maydis</i>	1	3

Tableau 1: Présentation du nombre de gènes *nia*, par génome haploïde ainsi que le nombre d'introns présents dans le gène *nia* chez les plantes supérieures, les algues et les champignons.

L'organisation générale des gènes *nia* des plantes supérieures montre une similitude au niveau de l'emplacement des introns. Ainsi, la région molybdique est la seule partie qui peut contenir des introns. Ceux-ci ne séparent pas des unités fonctionnelles et leur taille varient d'une espèce à l'autre (Daniel-Vedèle *et al.*, 1989). Malgré la conservation stricte de l'emplacement des introns dans la région molybdique dans le gène *nia* chez les plantes supérieures, des variations importantes sont notées concernant le nombre d'introns (tableau 1). En effet *Arabidopsis thaliana* possède deux introns dans le gène *nia2* (Wilkinson et Crawford, 1991 et 1993) et *Phaseolus vulgaris* en possède 4 dans le gène *nia2* (Jensen *et al.*, 1993) (tableau 1).

Cette conservation d'emplacement des introns n'est pas retrouvée dans les gènes *nia* des algues ni des champignons où les introns sont localisés d'une manière plus aléatoire dans le gène *nia*. Ainsi chez *Chlamydomonas reinhardtii* la position des introns dans le gène *nit-1* est différente, comparée à celle des gènes des plantes supérieures (Fernandez *et al.*, 1989). Concernant le nombre d'introns une grande variabilité est également retrouvée dans le gène *nia* de *Volvox carteri* qui en contient 10 (Gruber *et al.*, 1992); chez les champignons, où le gène *nia* de *Leptosphaera maculans* en contient 4 dont 3

sont situés dans la partie molybdique et un dans la région hémique (Williams *et al.*, 1994) et le gène *nia* d'*Aspergillus nidulans* possède 6 introns dont 5 sont localisés dans la partie molybdique et un seul intron dans la région hémique (Johnstone *et al.*, 1990), et *Neurospora crassa* qui n'en contient qu'un seul dans la région hémique (Okamoto *et al.*, 1991).

Par contre l'analyse des séquences codantes des gènes *nia* indique que la structure générale des protéines nitrate réductase est bien conservée et qu'un seul modèle peut être proposé pour décrire toutes les nitrate réductases eucaryotiques comme nous l'indique la figure 1, p.7 (d'après Caboche et Rouzé, 1990).

4. L'ASSIMILATION DU NITRATE

Alors que les voies du métabolisme du carbone et leur régulation sont bien connues chez les végétaux, paradoxalement la régulation de l'assimilation de l'azote minéral combiné et celle du nitrate en particulier sont encore assez mal connues.

Les végétaux supérieurs sont souvent classés en espèces qui assimilent le nitrate soit dans les feuilles soit dans les racines. Dans la première catégorie on trouve essentiellement des herbacées, alors que les ligneux sont habituellement placés dans la seconde catégorie (Gojon *et al.*, 1994).

La régulation de la réduction du nitrate et plus particulièrement de la nitrate réductase a été étudiée très largement dans les feuilles des espèces herbacées et peu d'études ont été menées conjointement dans les feuilles et les racines d'une même espèce (Gojon *et al.*, 1994). Les études menées depuis ces dernières années sur les mécanismes de régulation de la réduction du nitrate ont abouti à deux conceptions qui sont d'ailleurs complémentaires. Pour certains auteurs c'est la disponibilité en énergie qui régule la nitrate réductase (Pace *et al.*, 1990; Glaab et Kaiser, 1993). Pour d'autres, l'absorption et le flux de nitrate constituent le facteur primordial de la réduction du nitrate (Imsande et Touraine, 1994; Gojon *et al.*, 1994).

4.1. Absorption du nitrate et activité nitrate réductase

L'absorption même du nitrate est un processus qui demande de l'énergie (Glass, 1988): à un équivalent absorbé, correspond la dépense d'une mole d'ATP. Il semble exister deux mécanismes d'absorption qui suivent des cinétiques Michaeliennes différentes. Le premier système est un système de transport actif, sensible aux inhibiteurs métaboliques, inductible par le nitrate pour lequel il a une affinité faible (Glass, 1988). Un second système nettement moins sensible aux inhibiteurs métaboliques est de type canal; il est constitutif et présente des caractéristiques d'un système de transport n'exigeant pas d'énergie (Hedrich et Schroeder, 1989; Siddiqi *et al.*, 1990). Le gène

CHL1 codant pour un transporteur à faible affinité a été récemment cloné chez *Arabidopsis*. L'expression de *CHL1* dans des oocytes de *Xenopus* produit une protéine CHL1 qui est induite par le nitrate et par des pH faibles et qui permet le transport du nitrate et du chlorate (Tsay *et al.*, 1993). Deux autres gènes homologues *NTA1* et *NTA2* ont également été caractérisés chez *Arabidopsis*; ils codent pour des protéines racinaires inductibles par le nitrate mais qui y répondent plus lentement que *CHL1* (Tsay *et al.*, 1994).

Chez *Chlamydomonas reinhardtii* les protéines responsables de l'absorption et du transport du nitrate ont été caractérisées et les gènes (*nar-1* à *nar-4*) codant pour ces enzymes forment avec le gène *nit-1* un groupe de gènes (*gene-cluster*) (Quesada *et al.*, 1993 et 1994). Des gènes codant pour des protéines de transport du nitrate ont également été isolés de la cyanobactérie *Synechococcus* PCC 7942 (Omata, 1991; Omata *et al.*, 1989, 1993) et d'*Aspergillus nidulans* (Johnstone *et al.*, 1990; Unckles *et al.*, 1991). L'absorption de l'ion nitrate est couplée soit au symport des protons dans la cellule végétale (McClure *et al.*, 1990; Ruiz-Cristin et Briskin, 1991; Glass *et al.*, 1992) soit à l'antiport d'un ion HCO_3^- (Benzioni *et al.*, 1971; Touraine *et al.*, 1988).

Quel que soit le mécanisme impliqué, le résultat est identique: l'absorption et l'assimilation du nitrate entraînent une alcalinisation du milieu extérieur et la mise en œuvre d'une régulation du pH intracellulaire (Marschner *et al.*, 1986). La présence d'ions ammonium dans la plupart des milieux réduit le problème d'alcalinisation, car l'absorption d'un ion ammonium est couplé à un antiport d'un proton. Récemment Ninnemann *et al.* (1994) ont identifié un transporteur d'ammonium (*AMT1*) chez *Arabidopsis*.

Les plantes qui réduisent le nitrate dans les feuilles produisent des acides carboxyliques et des acides aminés qui constitueraient des signaux transportés par le phloème capables de contrôler l'absorption de nitrate, qui se fait par l'antiport $\text{NO}_3^-/\text{HCO}_3^-$. La capacité à absorber le nitrate contrôlerait alors la distribution de l'activité de réduction du nitrate entre la feuille et la racine (Imsande et Touraine, 1994). Bien que chez les plantes herbacées et les ligneux, les valeurs des rapports des activités NR dans la feuille/activité NR dans la racine soient opposées, il semblerait qu'un même mécanisme contrôle cette répartition. En effet selon une étude récente de Gojon *et al.* (1994) c'est la disponibilité en nitrate qui contrôlerait la taille des pools racinaires du nitrate qui, soit s'accumule dans les vacuoles, soit rentre dans le processus de la réduction, soit encore est transporté dans la stèle. Toute augmentation du transport de nitrate dans la stèle, augmente sa diffusion dans le symplasma de la racine, et diminue sa concentration aux sites de réduction. Par conséquent les facteurs contrôlant l'activité NR et sa distribution dans les différents organes, seraient la demande en azote et les flux de nitrate à travers la plante. Il n'en demeure pas moins vrai que les mécanismes moléculaires restent

totallement inconnus et l'hypothèse d'un antiport $\text{NO}_3^-/\text{HCO}_3^-$ ne peut, pour l'instant, pas être éliminée.

Il est connu que des ions (métabolites) absorbés du sol ne sont pas uniformément distribués dans les cellules d'un tissu particulier. Ce phénomène a aussi été observé lors de l'absorption de nitrate par des racines de maïs: à faible concentration (200 μM), l'accumulation du nitrate et la présence de la protéine NR ne sont détectées que dans les cellules de l'épiderme. A des concentrations plus importantes (20 mM), la protéine NR est aussi retrouvée dans les cellules corticales. Il se pourrait donc que, dans les conditions habituelles, l'absorption du nitrate et la NR soient liées à la couche cellulaire épidermique. Par ailleurs il est également possible que le nitrate soit efficacement transporté vers la stèle afin de maintenir le taux de nitrate dans les cellules intermédiaires en dessous du niveau de détection du nitrate et du niveau inductible de la NR (Rufty *et al.*, 1986). Ces résultats ont été obtenus avec des racines de jeunes plantules de maïs, qui sont des exportateurs de nitrate (Pate, 1973). Ce type d'expérimentation n'a pas encore été réalisé avec des plantes où la racine joue le rôle majeur dans la réduction du nitrate et qui exportent l'azote sous forme d'acides aminés, comme chez les jeunes plantules de chicorée de Bruxelles. En effet chez la chicorée de Bruxelles l'activité nitrate réductase est toujours la plus élevée dans les jeunes racines, mais quand la plante se développe au champ, l'activité nitrate réductase diminue au cours de la tubérisation; elle est alors localisée dans les feuilles vertes de la rosette et dans les racines secondaires (Dorchies et Rambour, 1985). Lorsque la réduction du nitrate se fait dans la racine, l'apport énergétique et le pouvoir réducteur ne peuvent venir que du catabolisme des glucides.

4.2. Activité nitrate réductase et métabolisme carboné

La réduction du nitrate en ammonium puis le passage de celui-ci dans la fraction azotée organique consomme du pouvoir réducteur, des squelettes carbonés et de l'énergie cellulaire sous la forme d'ATP. Il n'est donc pas surprenant que l'ensemble des réactions se déroulent souvent dans les cellules du mésophylle, là où s'effectue la photosynthèse. En effet jusqu'à 55% du carbone assimilé est consommé par le métabolisme azoté (Huppe et Turpin, 1994).

Chez les plantes qui assimilent le nitrate dans les feuilles, il existe donc un transport d'azote nitrique vers les parties aériennes, puis une redistribution des produits de réduction dans l'ensemble de la plante et particulièrement vers la racine (Cooper *et al.*, 1986; Lambers *et al.*, 1982; Hocking *et al.*, 1984).

La nitrate réductase est une enzyme cytosolique active dans les feuilles vertes. La source de pouvoir réducteur (NADPH) à la lumière est produite dans le chloroplaste, mais sachant que la NR demande un apport de NADH il doit exister un système de transfert du NADH du chloroplaste vers le cytosol. Un premier système (figure 3a) a été

proposé par Klepper *et al.* (1971) dans lequel le dihydroxy-acétone-phosphate (DHAP), produit dans le chloroplaste en utilisant le NADPH et l'ATP, est transporté vers le cytosol et converti en 3-phosphoglycéraldéhyde (3PGA). Ceci conduit à la production de NADH et d'ATP. L'acide phosphoglycérique est à nouveau transporté dans le chloroplaste et le NADH dans le cytosol est utilisé pour la réduction du nitrate en nitrite. Un autre système de transport du malate (figure 3b) a été proposé par House et Anderson (1980). La synthèse du malate dans le chloroplaste utilise le NADPH, et après transport du malate vers le cytosol, celui-ci est oxydé en oxaloacétate (OAA) et le NADH ainsi produit est utilisé par la nitrate réductase.

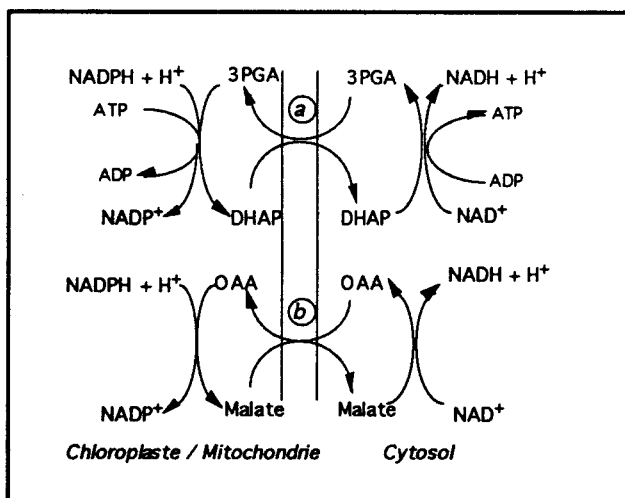


Figure 3: Présentation schématique des systèmes navettes qui produisent du NADH dans le cytoplasme.

Le fait que l'activité NR soit régulée par la lumière (Deng *et al.*, 1990; pour revue, voir Lillo, 1994) n'est pas surprenant, car cette régulation est indispensable pour éviter toute accumulation de nitrite. La réduction de nitrate en nitrite se réalise dans le cytoplasme. Le nitrite est ensuite transporté dans le chloroplaste où son assimilation en glutamine est immédiate, ceci grâce à la production photosynthétique de la ferrédoxine réduite (Fd_{red}) nécessaire à la NiR et la GOGAT, et de l'ATP nécessaire à la GS.

Chez le maïs, le nitrite est transporté dans les plastes où son assimilation en acides aminés est réalisée. La nitrate réductase peut utiliser soit le NADH ou le NADPH comme pouvoir réducteur (Long et Oaks, 1990). Ces deux réducteurs sont apportés soit par la glucose-6-phosphate déshydrogénase soit par la 6-phosphogluconate déshydrogénase toutes deux présentes dans le cytosol (Emes et Fowler, 1979; Oji *et al.*, 1985), ou encore par un mécanisme de navette de malate produit dans les mitochondries, qui est oxydé dans le cytosol en acide oxaloacétique (Naik et Nicholas, 1986). L'ATP est nécessaire pour la synthèse du glucose-6-phosphate (G6-P). Le NADPH, libéré par le métabolisme oxydatif des pentoses phosphates (OPP) est le pouvoir réducteur de la NiR et la GOGAT dans les plastes. Le NADPH, par-contre, ne réduit pas directement la NiR ou la GOGAT,

mais fonctionne par un système de transports d'électrons. La coopération entre le métabolisme OPP et l'assimilation du nitrite dans les plastes assure un apport d'électrons aussi longtemps qu'il y existe une réserve de G6-P. Les racines doivent utiliser d'autres stratégies que les tissus photosynthétiques pour leur apport en énergie et en squelettes carbonés. L'énergie cytosolique est probablement livrée par la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) et la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. Le métabolisme OPP jouerait aussi un rôle important dans les racines où la NR est bispécifique (Naik et Nicholas, 1981).

La réduction du nitrate dans les feuilles à l'obscurité se réalise par un processus similaire. Les chloroplastes contiennent une NADPH-Fd réductase qui utilise des réducteurs équivalents générés par le métabolisme oxydatif des pentoses phosphates aussi longtemps qu'il y a suffisamment de réserve en G6-P.

En plus de l'ATP et du pouvoir réducteur, l'assimilation du nitrate exige que des squelettes carbonés soient disponibles. En effet l'accumulation d'ammonium est toxique et la plante se trouve dans l'obligation de l'incorporer dans la fraction organique sous forme de glutamine qui peut être soit une forme de stockage d'azote soit le point de départ du métabolisme de l'azote organique.

Il s'en suit que le métabolisme du carbone et l'assimilation du nitrate sont étroitement imbriqués. Il est clair que les métabolites carbonés et azotés circulent dans la plante et que leur destination finale dépend des demandes et de la compétition entre les différents tissus non-producteurs (les puits). Ces tissus en demande sont des jeunes feuilles, le système racinaire ou encore des fruits en voie de développement. Comme ces interactions changent au fur et à mesure que la plante se développe, le transport des métabolites azotés ou carbonés est aussi soumis à ces changements.

Afin de mieux comprendre ces régulations, il est important d'étudier les interactions des deux métabolismes azoté et carboné. D'une part, il existe une compétition entre les deux voies pour les électrons provenant de la photosynthèse. D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, la réduction du nitrate dépend de la quantité de pouvoir réducteur (NADH, NADPH ou la ferrédoxine) et d'énergie (l'ATP). La NR, la NiR et la GOGAT sont stimulées par le pouvoir réducteur, livré par la photosynthèse aux tissus foliaires ou par le métabolisme des sucres dans les racines. De plus, les chaînes carbonées utilisées dans l'assimilation de l'ammonium pour la synthèse des acides aminés, sont produites par la fixation du gaz carbonique. Les premières études démontrant ces relations ont été effectuées sur des algues unicellulaires (Syrett, 1953, 1956 et 1988).

Les relations entre l'assimilation du carbone par la photosynthèse et l'assimilation azotée dans les feuilles a déjà été le sujet de nombreuses recherches (Robinson, 1988; Bloom *et*

al., 1989; Khamis *et al.*, 1990; De LaTorre *et al.*, 1991; Vincentz *et al.*, 1993; Foyer *et al.*, 1994). Dans les feuilles, les modulations des activités de la SPS, PEP carboxylase et de la NR ont montré la synchronisation de l'assimilation azotée et de la fixation du carbone ainsi que de sa répartition (Huber *et al.*, 1992 a; Kaiser et Spill, 1991; Champigny et Foyer, 1992; Manh *et al.*, 1994). Dans le cas des plantes exportatrices d'asparagine, l'énergie nécessaire est apportée par un flux de métabolites des régions photosynthétiques vers la racine. Ceci est le cas chez certaines légumineuses comme *Pisum arvense* L. (Wallace et Pate, 1965) ou le lupin (Atkins *et al.*, 1979). Il est naturellement difficile de comparer différentes espèces à cause des différences de vitesse de croissance, d'habitat, de photosynthèse et de beaucoup d'autres facteurs.

4.3. Le métabolisme carboné et activité nitrate réductase dans des organes tubérisés

Le saccharose constitue la forme majoritaire de transport du carbone chez les végétaux (Salisbury et Ross, 1985). La répartition des photosynthétats entre les différents organes puits dépend de leur force de demande, c'est à dire de leur capacité à importer les assimilats (Ho, 1988). L'import des assimilats est contrôlé par le gradient de concentration en saccharose qui existe entre les organes sources (feuilles adultes) et les organes puits (jeunes feuilles, tubercules ou graines).

Le maintien de ce gradient dépend du clivage du saccharose au niveau des organes puits (Ho *et al.*, 1991; Clifford, 1992). Parmi les enzymes capables d'assurer cette fonction figurent la saccharose synthase (SS) et l'invertase (INV). De nombreux travaux réalisés sur des organes de mise en réserves chez différentes plantes accumulatrices de l'amidon suggèrent que la SS serait l'enzyme responsable de la force d'appel des puits (Sung *et al.*, 1989; Sery, 1992). Ross et Davies (1992) ont montré que l'activité SS et la synthèse de la protéine SS dans le tubercule de pomme de terre sont contrôlées par la concentration en saccharose. Dans les tubercules matures l'activité SS décline alors que l'activité invertasique augmente. Les invertases ou β -D-fructofuranosidases (EC 3.2.1.26) sont présentes en quantité considérable dans le monde végétal et de nombreuses études décrivent leur présence (Avigad, 1982). L'invertase catalyse la dégradation du saccharose en hexoses (glucose et fructose). Deux isoenzymes invertasiques distinctes existent: une enzyme dont le pH d'activité est de 4,5 à 5,0 définie comme une invertase acide et une enzyme hydrolysant le saccharose à un pH 7,5-8,0 et désignée comme une invertase alcaline. Les rôles physiologiques des deux formes d'invertase ont été définis dans beaucoup d'espèces végétales. L'invertase acide est très active dans les tissus jeunes et caractérise les tissus à croissance rapide (Morris et Arthur, 1984 et 1985) et les organes en développement au début de leur maturation (Kato et Kubota, 1978). Elle intervient

dans le métabolisme du saccharose à turnover rapide. L'invertase alcaline présente une activité toujours peu élevée, souvent masquée par l'importance de l'activité invertasique acide et est spécifique d'un tissu mature dont la croissance et le développement sont ralentis (Ricardo, 1974; Masuda *et al.*, 1987). Elle intervient dans la régulation de l'accumulation du saccharose (Gayler et Glasziou, 1972).

Chez la chicorée, au cours de la tubérisation (phase végétative), le métabolisme racinaire carboné est orienté vers la synthèse des fructosanes (inuline) à partir des assimilats issus des feuilles adultes. La racine se comporte alors comme un organe puits. Les fructosanes sont synthétisés et stockés dans les vacuoles et peuvent constituer en fin de tubérisation 80% de la matière sèche racinaire (Fiala et Jolivet, 1980). La première enzyme impliquée dans le métabolisme des fructosanes est la saccharose:saccharose-fructosyl-transférase (SST) qui assure le transfert d'un fructose provenant d'une molécule de saccharose à une autre molécule de saccharose pour former un trisaccharide, qui dans le cas de la chicorée est un 1-kestose (liaison β 2,1). Le 1-kestose semble être, dans le cas de la chicorée, le seul intermédiaire entre le saccharose et les fructosanes (Limami et Fiala, 1993). Le glucose libre peut être exporté vers le cytoplasme où il sera repris pour la synthèse du saccharose. Cette étape est catalysée par la sucrose phosphate synthase (SPS, EC 2.4.1.14). Le contrôle de la biosynthèse du saccharose est partagé entre la SPS et la Fructose-1,6-bis-phosphatase.

Chez la chicorée, au cours du forçage, la réduction du nitrate s'effectue dans les racines secondaires qui se forment le long de la racine tubérisée, mais jamais dans les feuilles étiolées de l'endive, même lorsqu'elles sont transférées à la lumière (Dorchies et Rambour, 1983). Ainsi, on peut se demander si chez cette espèce la nitrate réductase n'est pas un marqueur privilégié de la rhizogenèse.

Des observations similaires ont été faites chez le citronnier (Bar-Akiva et Sagiv, 1967), le soja, le tournesol (Weissman, 1972) ou le coton (Radin, 1974, 1975). Chez cette dernière espèce, l'activité nitrate réductase n'est décelable dans les racines qu'avant leur élongation alors que chez la chicorée c'est l'inverse: l'activité NR des racines en élongation est supérieure à celle de la racine. De plus, chez la chicorée, le transfert de la réduction du nitrate de la racine vers la feuille est lié à la tubérisation de la racine principale. En effet l'activité nitrate réductase régresse ou disparaît dans un organe qui acquiert une fonction de mise en réserve (Dorchies et Rambour, 1983). Plusieurs facteurs, comme l'âge de la plante, le développement des puits, l'intensité de la lumière peuvent avoir un effet profond sur la quantité relative de nitrate réduit dans les racines (Andrews, 1986; Thomas *et al.*, 1979). Chez le pois, par exemple, les taux d'activité NR sont élevés dans des feuilles soumises à des intensités lumineuses élevées; par contre à faible luminosité les activités NR sont plus importantes dans les racines (Pate, 1980).

Des fluctuations de l'activité des autres enzymes impliquées dans l'assimilation du nitrate ont été observées chez la chicorée de Bruxelles. Ainsi Sechley *et al.* (1991) ont montré que les activités de la nitrate réductase (EC 1.6.6.1), la glutamine synthétase (EC 6.3.1.2.), la ferrédoxine glutamate synthase (EC 1.4.7.1) et la glutamate déhydrogénase (GDH) (EC 1.4.1.2-4) varient au cours de l'année et coïncident avec les altérations de la disponibilité saisonnière du nitrate, de la teneur en fructose et en sucrose. Les feuilles fournissent à la racine les sucres nécessaires à la synthèse des fructosanes (Gupta *et al.*, 1991). L'activité de cette synthèse, couplée à une augmentation de l'activité de la SS et de la SPS, est la plus forte quand la racine se met à tubériser et parallèlement l'activité NR diminue. Cette corrélation entre le métabolisme carboné et azoté dans la racine tubérisée de la chicorée reste encore à déterminer.

5. RÉGULATION DE LA NITRATE RÉDUCTASE

Jusqu'à présent nous avons vu que les fluctuations de l'ANR pourraient être reliées aux grandes fonctions physiologiques comme la photosynthèse ou la croissance. Si la relation avec la réduction du carbone est immédiatement compréhensible (la photosynthèse est la source première des différents potentiels énergétiques), la relation avec la croissance est, nous l'avons vu, plus difficile à appréhender.

L'apport de la biologie moléculaire et l'obtention de mutants ont permis non seulement d'analyser la structure des gènes *nir* des différentes espèces, mais aussi de comprendre certains mécanismes de régulation du gène (pour revue, voir Solomonson et Barber, 1990; Pelsy et Caboche, 1992; Hoff *et al.*, 1994; Oaks, 1994).

5.1. La lumière et les glucides

La lumière et la photosynthèse sont des facteurs majeurs dans l'augmentation de l'activité NR (Crawford *et al.*, 1992; Hoff *et al.*, 1992; pour revue, voir Lillo, 1994). Les glucides synthétisés par la photosynthèse fournissent d'une part l'énergie pour la plante et d'autre part les squelettes carbonés pour les différents métabolismes dont l'assimilation azotée. Un apport exogène de saccharose, fructose et glucose dans le milieu de culture induit la synthèse *de novo* de la protéine NR. Ces sucres sont donc capables de remplacer partiellement l'induction transcriptionnelle du gène *nir* par la lumière (Cheng *et al.*, 1992). L'activité NR connaît un rythme circadien: elle augmente en fin de phase d'obscurité et diminue en fin de phase lumineuse (Lillo *et al.*, 1984). La lumière peut ainsi avoir un effet transcriptionnel sur le gène *nir*. Ainsi des oscillations correspondant à des variations du taux d'ARNm semblent dues à une régulation transcriptionnelle (Pilgrim

et al., 1993; Lillo, 1994). Borello *et al.* (1993) ont montré que cette régulation trouve son origine dans une séquence consensus de différents promoteurs régulés par la lumière comme ceux des gènes *cab*, *rbcS* et *nia*.

5.2. Les métabolites azotés

La plus grande partie de l'activité NR semble être sous contrôle métabolique: induction par le nitrate, mais inhibition par l'ammonium et des métabolites azotés.

Mis à part quelques exceptions (Streit *et al.*, 1986) la plupart des gènes NR sont inductibles par le nitrate (Kleinhofs et Warner, 1990). Cette caractéristique d'induction de la nitrate réductase par son substrat a été décrite pour la première fois par Tang et Wu (1957). Les gènes *nia* des plantes supérieures répondent rapidement à la présence de nitrate externe; le taux d'ARNm augmente déjà après 15 à 30 minutes d'induction par le nitrate (Gowri et Campbell, 1989; Melzer *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1991). Récemment Lin *et al.* (1994) ont pu déterminer une région en 5' du gène *nia* responsable de l'induction transcriptionnelle par le nitrate.

Par-contre les produits d'assimilation de l'azote exerceraient un rétrocontrôle négatif sur l'expression du gène *nia*. Des acides aminés importants pour le transport de l'azote réduit (Gln, Asn,...) répriment l'expression de la nitrate réductase chez l'épinard (Shirashi *et al.*, 1992) et chez le tabac (Vincentz *et al.*, 1993). Cannons et Pendleton (1994) ont montré que chez *Chlorella vulgaris* l'ammonium aurait un effet post-transcriptionnel sur la NR. L'ammonium diminuerait la stabilité de l'ARNm de la nitrate réductase.

Il est cependant étonnant qu'un mutant *nia*⁻ de *Nicotiana plumbaginifolia* dans lequel une construction chimérique surexprimant le gène *nia* a été introduite, maintienne une croissance normale et ne montre pas de modifications phénotypiques (Vincentz et Caboche, 1991).

5.3. Les phytohormones

5.3.1. Hormones diverses

La régulation de la nitrate réductase par les hormones n'a pas encore été étudiée d'une manière approfondie.

La synthèse des NR des végétaux supérieurs, plus particulièrement celles des plantes étiolées et des suspensions cellulaires, est stimulée par les cytokinines. Cette augmentation d'expression est en partie transcriptionnelle et peut être observée après 5 minutes d'exposition à la lumière de plantes traitées par l'hormone (Lu *et al.*, 1990). Schmerder et Borriss (1986) ont montré que l'activité NR chez *Agrostemma githago* était

aussi induite par l'éthylène et que l'induction par les cytokinines ne se faisait qu'en présence d'éthylène. Ils supposent également qu'il existe une régulation indépendante de la NR par le nitrate et par les cytokinines. Une stimulation de la synthèse *de novo* de la protéine NR est observée par les cytokinines chez *Agrostemma* (Hirschberg *et al.*, 1972; Kende *et al.*, 1971). Chez le blé, le maïs, l'orge, les cytokinines ont un effet stimulant sur l'activité NR. Cependant, en général, leur action intervient en corrélation avec la lumière. Ainsi, si la kinétine n'a aucun effet sur l'activité nitrate réductase de la semence de laitue placée à l'obscurité, elle est en revanche légèrement stimulante à la lumière (Knypl, 1977). Plus récemment Suty *et al.* (1993) ont montré que les cytokinines stimulent en effet l'activité nitrate réductase de cultures cellulaires de tabac à la lumière mais aussi à l'obscurité. Une augmentation du taux d'ARNm a aussi été observée.

Concernant l'action des auxines les résultats sont très contradictoires et ne permettent pas de dégager un mécanisme d'action généralisable. En effet, des résultats opposés ont été observés chez diverses espèces: l'apport exogène d'auxine entraîne une répression de l'activité NR chez le maïs (Rao *et al.*, 1984), une activation chez le blé (Klepper, 1979) et une activation enzymatique et transcriptionnelle de la NR chez la chicorée (Vuylsteker, 1991).

5.3.2. Effet de l'ABA

Le stade physiologique, et donc métabolique de la plante et plus particulièrement de la racine, ont un effet important sur le métabolisme azoté chez la chicorée (Sechley *et al.*, 1991).

L'ABA qui, sous conditions de stress est synthétisé dans la racine (Hartung et Davies, 1991), induit, inhibe ou augmente le taux d'ARNm spécifiques et son influence sur l'expression du gène se situe, du moins d'une part, au niveau transcriptionnel (Guiltinan *et al.*, 1990; Mundy *et al.*, 1990).

Plusieurs études ont déjà été entreprises sur l'interaction de l'ABA et la NR sans pouvoir aboutir à une conclusion générale. En effet, l'ABA a des actions diverses et opposées comme chez la pomme de terre par exemple où une stimulation de l'activité NR est observé dans les tubercules (Palmer, 1981), tandis que dans la plante entière l'ANR est inhibée (Palmer, 1985 a et b). Une augmentation de l'ANR est également observée chez *Phaseolus acoitifolius* (Sankhla et Huber, 1975). L'ABA aurait aucun effet sur l'ANR dans les couches à aleurones des grains d'orge (Ferrari et Varner, 1969), mais inhiberait l'ANR dans les feuilles étiolées de l'orge (Lu *et al.*, 1992). Si l'enzyme est stockée sous une forme inactive (Funkhouser *et al.*, 1980), alors l'ABA pourrait induire l'activation par une stimulation de la production d'activateurs (Yamaya et Oaks, 1980) ou de substances telles que le NADH.

Le rôle de l'ABA dans le développement et la croissance de la plante est pléiotropique et son mécanisme d'action n'est pas tout à fait compris. D'une part, l'ABA semble jouer un rôle important dans le développement de la plante et peut réguler l'expression de certains gènes embryogènes. D'autre part l'ABA intervient dans l'absorption d'ions, dont le Ca^{2+} et pourrait donc intervenir dans le système de transduction de signaux pour le contrôle des gènes responsables de la régulation du potentiel hydrique. L'ABA s'accumule en conditions de sécheresse et est probablement un signal pour l'initiation des processus d'adaptation aux stress (Davies et Jones, 1991). L'ABA joue également un rôle important dans le métabolisme des sucres. Le mécanisme de régulation de la biosynthèse des sucres n'est pas encore totalement élucidé, cependant les activités de la F1,6BPase (EC 3.1.3.11) et de la SPS (EC 2.4.1.14) seraient les étapes limitantes dans la régulation de la voie de biosynthèse photosynthétique du saccharose (Zimmerman *et al.*, 1978; Stitt *et al.*, 1988). Il y a des indications selon lesquelles l'ABA et la GA₃ modifieraient l'activité de la SPS dans des feuilles excisées du pois et de la betterave (Daie, 1986). Un changement rapide de l'activité SPS peut aussi se produire par une modification de l'interaction entre sources et puits, sachant que les organes puits peuvent contrôler les niveaux d'ABA dans les organes sources (feuilles) du soja (Setter *et al.*, 1981). Les gibbérélines et l'ABA influencent le transport des glucides chez la tomate et *Vicia fabia* (Cheikh, 1981; Aloni *et al.*, 1986).

Le transport des éléments photosynthétiques vers les puits est donc régulé d'une façon importante par les hormones qui peuvent ainsi agir comme régulateurs d'activités (ou de synthèse) des enzymes de biosynthèse du saccharose (SPS et F1,6BPase) (Huber *et al.*, 1986; Brenner, 1986).

5.4. Régulation post-traductionnelle

Depuis quelques années déjà les études sur les régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles deviennent plus nombreuses (pour revues, voir Gallie, 1993 et Sullivan et Green, 1993). Les différents points de contrôle de régulation après la transcription se situent au niveau de la maturation du pré-ARNm, le transport nucléocytoplasmique, l'efficacité de traduction, la stabilité des transcrits (pour revue, voir Green, 1993; Sachs, 1993; Decker et Parker, 1994), la modification de la protéine par des réactions de phosphorylation et déphosphorylation (pour revue, Ma 1993; Kaiser et Huber 1994) et sa stabilité (pour revue voir Vierstra, 1993).

Concernant la nitrate réductase plusieurs études ont déjà été entamées (Kaiser et Huber, 1994). Les variations diurnes de la nitrate réductase peuvent être expliquées par des régulations transcriptionnelles ainsi que post-transcriptionnelles (Lillo, 1991). Cannons et Pendleton (1994) supposent une régulation post-transcriptionnelle par

Cannons et Pendleton (1994) supposent une régulation post-transcriptionnelle par l'ammonium qui contrôlerait la stabilité des ARNm NR. L'effet des cytokinines peut également s'expliquer par un effet post-transcriptionnel, une modulation de la polyadénylation des ARNm nitrate réductase (Suty *et al.*, 1993).

Des protéines qui inactivent la nitrate réductase par une liaison spécifique ou par protéolyse partielle peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la nitrate réductase (Wallace et Oaks, 1986). Plusieurs protéines qui inactivent la nitrate réductase ont déjà été isolées et purifiées (Wallace, 1974; Yamaya et Ohira, 1977; Jolly et Tolbert, 1978; Yamagishi *et al.*, 1988). Le NADH serait par ailleurs capable de protéger la protéine NR et de lever l'inhibition de l'activité NR en se liant à ces inhibiteurs spécifiques (Campbell et Smarelli, 1986).

D'autre part le NADH peut exercer un effet inhibiteur sur l'activité NR en "sur-réduisant" les centres redox de la protéine en absence d'un accepteur d'électrons comme le nitrate par exemple (Hewitt et Notton, 1980).

Les effets de phosphorylation et déphosphorylation ont également été étudiés (Kaiser et Spill, 1991; Van Quy et Champigny, 1992; Champigny et Foyer, 1992; Huber *et al.*, 1992 a, b et c; Kaiser *et al.*, 1992; MacKintosh, 1992; Huber *et al.*, 1993; Glaab et Kaiser, 1993; MacKintosh et MacKintosh, 1993; Foyer *et al.*, 1994; Kaiser et Huber, 1994). Ce système de phosphorylation et déphosphorylation régule plusieurs activités enzymatiques dont la NR, la SPS et la PEPCase. Une modification covalente par phosphorylation entraînerait une inactivation de la nitrate réductase. Des données biochimiques suggèrent que l'activation par la lumière serait due à une déphosphorylation de la NR par la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Huber *et al.*, 1992 a, b et c, McKintosh, 1992).

Le flux des squelettes carbonés vers l'assimilation azotée serait aussi régulé par un mécanisme de phosphorylation et de déphosphorylation. Ainsi l'addition du nitrate aux cultures de blé induirait la phosphorylation de la PEPCase la rendant ainsi active et la SPS la rendant ainsi inactive (Champigny et Foyer, 1992; Van Quy et Champigny, 1992). La régulation des phosphatases et des kinases responsables pour ces mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation n'est pas encore élucidée, mais il est certain que divers facteurs comme la lumière et le Ca^{2+} sont impliqués.

Par ailleurs un autre système de régulation post-traductionnel a été proposé par Stöhr *et al.* (1993) où la protéine NR cytosolique subirait des modifications post-traductionnelles afin de générer une protéine membranaire.

6. CONCLUSION

Nous pouvons conclure que la régulation de la nitrate réductase est très étudiée. Ces voies de régulations transcriptionnelles, post-transcriptionnelles et post-traductionnelles sont présentées dans la figure 4.

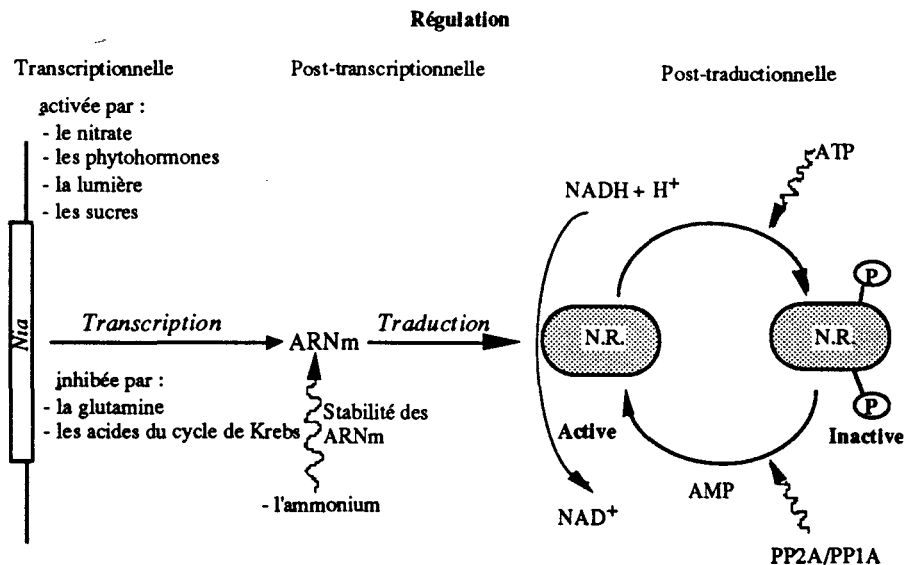


Figure 4: Présentation schématique des facteurs de régulation de la nitrate réductase

Un système de régulation bien défini ne peut être avancé car il existe beaucoup de paramètres impliqués dans la régulation de la NR qui peuvent ou non agir simultanément selon les conditions physiologiques. Les premières étapes de l'assimilation azotée peuvent être corrélées avec une augmentation de la glycolyse ou de la photosynthèse libérant ainsi l'ATP et le NAD(P)H. Dans les racines une augmentation des voies d'oxydation des pentoses phosphates est observée, libérant du pouvoir réducteur. Les deux voies de métabolisme azoté et carboné sont interconnectées par des facteurs de régulation aussi divers que le nitrate, les hormones, la lumière, les métabolites azotés et/ou carbonés, les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation et les régulations d'oxydo-réduction.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. LE MATERIEL VEGETAL

1. PRÉSENTATION

Cichorium intybus (var. Witloof) ($2n = 2x = 18$) ou la chicorée de Bruxelles est une *Asteraceae* bisannuelle. Semée en Avril-Mai, la graine produit une racine tubérisée qui arrive à maturité en Octobre-Novembre et qui porte une rosette de feuilles vertes. Laisser en champs, les plantes développent, au printemps suivant, une hampe florale qui produira les graines.

Dans la pratique agricole courante, les racines tubérisées matures sont récoltées en Novembre, débarrassées de leurs feuilles et mises en forçage à l'obscurité et à 18°C. En moins de trois semaines, le bourgeon se développe produisant des feuilles étiolées étroitement imbriquées: l'endive ou le chicon.

La Chicorée de Bruxelles est une espèce qui présente de remarquables propriétés d'organogénèse. Elle est en effet capable de régénérer des plantes entières à partir de tous ses organes: racines (Gautheret, 1959), feuilles vertes ou étiolées (Toponi, 1983; Vasseur *et al.*, 1986), pistils (Dubois *et al.*, 1988) ou d'anthers (Guedira *et al.*, 1989).

2. LES SUSPENSIONS CELLULAIRES

Deux suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* (var. Witloof) ont été établies à partir de colonies tissulaires issues de la prolifération d'explants racinaires. Les lignées nommées A11 et B22 ont des caractéristiques totalement différentes. La B22 est constituée d'un ensemble de petites cellules ovales ou arrondies, à croissance rapide (temps de doublement de 26h), mais ayant perdu toute capacité de régénération. Le cycle de croissance est de 8 jours. La lignée A11 est beaucoup plus hétérogène et contient de nombreux nodules de quelques dizaines de cellules. Sa croissance est lente (temps de doublement de 10 jours), mais elle est capable de produire soit des bourgeons, soit des racines.

Ces deux lignées sont cultivées en milieu de Murashige et Skoog (1962) liquide contenant 0.5 g/l de glutamine et 20 g/l de saccharose. Les substances de croissance utilisées sont l'acide 1-naphtyl acétique (ANA) (1.8 mg/l), l'acide 2.4-dichlorophénoxyacétique (0.02 mg/l) et la kinétine (0.02 mg/l).

L'extraction des ARN est effectuée à partir des cellules B22 qui présentent une activité nitrate réductase importante au 4^{ème} jour de culture. Ces cellules sontensemencées tous les 8 jours: elles sont filtrées sur des tamis en inox de maille de taille décroissante (1 mm et 50 µm). Les cellules sont lavées par une solution de saccharose (20 g/l). Environ un gramme de cellules est alors transféré dans des fioles contenant du milieu neuf. Les fioles de culture sont placées inclinées à 40° sur des agitateurs rotatifs (70 rpm) dans une pièce

maintenue à 25°C. L'intensité lumineuse fournie (1.5 Wm⁻²) est émise par des tubes fluorescents (De Luxe Cool White).

3. STÉRILISATION DES GRAINES ET MISE EN CULTURE

Après avoir été immergées dans une solution de SDS à 1% pendant 1 minute, les graines sont rincées dans de l'eau stérile, et ensuite stérilisées dans une solution de chlorure mercurique (0,1%) pendant 2 minutes. Après trois bains successifs dans de l'eau stérile, les graines sont mises à germer sur un milieu Murashige et Skoog (1962) (modifié ou non) sans addition d'hormones et en lumière continue (1.5 Wm⁻²; Cool White Deluxe) à 20°C.

II. MANIPULATIONS CONCERNANT LES ACIDES NUCLEIQUES

1. EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE VÉGÉTAL

L'extraction de l'ADN génomique se fait principalement selon Dellaporta *et al.* (1983). Le matériel végétal est broyé en présence d'azote liquide et repris dans 15 ml de tampon d'extraction (100 mM Tris.Cl pH 8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM β-mercaptoéthanol) pour 1 g de matériel auquel 1 ml de 20% SDS est ajouté. Le tout est mélangé vigoureusement et incubé à 65°C pendant 10 min. La plupart des polysaccharides et des protéines sont éliminés dans un précipité de dodécyl sulfate de potassium après addition de 5 ml d'acétate de potassium et une incubation de 20 min à 0°C. Après une centrifugation le surnageant est clarifié par une filtration sur du Miracloth (Calbiochem). Les ARN sont éliminés par un traitement à la RNaseA (10 µg/ml); les protéines restantes sont éliminées par la protéinase K (40 µg/ml). Après une dernière purification au phénol, l'ADN est précipité par le propanol. Après une centrifugation le culot est repris dans du TE pH 8,0. L'ADN est éventuellement repurifié sur un gradient de CsCl par une ultracentrifugation à 48000 rpm pendant 18 h. La concentration et la pureté sont déterminées par mesure des absorbances à 230, 260 et 280 nm.

2. EXTRACTION DE L'ARN

Les ARN sont extraits à partir de plantules âgées de 2 à 3 semaines. L'extraction s'effectue principalement selon Verwoerd *et al.* (1989). Ce protocole permet de traiter plusieurs échantillons à la fois tout en ayant de l'ARN de qualité et en quantité suffisante pour l'hybridation.

Les explants sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide et broyés dans les tubes Eppendorf à l'aide d'un pilon jusqu'à obtention d'une poudre fine. Celle-ci est reprise

dans 800 µl de tampon d'extraction (1 vol de phénol / 1 vol du tampon de 100 mM Tris.HCl pH 8.0, 100 mM LiCl, 10 mM EDTA et 1 % SDS) à 80°C. L'extrait est déprotéinisé par une phénolisation. Les acides nucléiques sont récupérés par précipitation à l'éthanol suivie d'une centrifugation. Après resuspension du culot, on isole les ARN par une précipitation sélective au chlorure de lithium (4 M) pendant au moins 12 heures à 4°C. Ensuite les ARN sont à nouveau centrifugés et repris dans un volume d'eau (traitée au DEPC) et reprécipités à l'éthanol ce qui élimine les sucres et les sels. Le culot sera finalement repris dans un volume adéquat d'eau stérile.

3. EXTRACTION DES ARN POLY(A)⁺ POUR LA PRÉPARATION DE LA BANQUE D'ADN_c

Les ARN sont extraits de cellules âgées de 4 jours dont l'activité NR a été induite par transfert sur milieu neuf (Chraïbi, 1988). Les cellules sont récupérées par filtration sous vide à l'aide d'un entonnoir de Büchner contenant 2 épaisseurs de papier filtre, pesées, congelées par de l'azote liquide puis éventuellement stockées à -70°C.

Les cellules sont broyées en présence d'azote liquide et reprises dans le tampon NETS (NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; Tris.Cl 10 mM pH 7.5; SDS 1%). Le tout est déprotéinisé jusqu'à ce que la phase aqueuse soit entièrement claire. Les restes de phénol sont éliminés par une extraction à l'éther éthylique. Les acides nucléiques sont ensuite précipités par de l'éthanol en présence d'acétate de sodium (concentration finale de 0,15 M). Après centrifugation, les culots sont repris dans un volume minimal d'eau stérile. Un premier dosage des acides nucléiques est effectué par mesure de l'absorbance sous UV; la valeur des rapports 260/280 et 260/230 renseignent sur leur degré de pureté. Si les rapports (≈ 2) sont satisfaisants, les ARN sont ensuite sélectivement précipités par un même volume de 4 M LiCl pendant au moins 12 h et finalement centrifugés. Le culot est resuspendu dans de l'eau stérile. Une aliquote est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose. Le reste de la solution est reprécipité à l'éthanol pendant une nuit.

Après une centrifugation les ARN sont repris dans le tampon NETS, dénaturés (2 min à 65°C) et remis sur glace. Ensuite la solution est déposée sur une colonne oligodT équilibrée par du tampon NETS. Un premier lavage élimine les ARN poly(A)⁻. L'éluion des ARN poly(A)⁺ se fait avec de l'eau stérile par fractions de 500 µl, qui sont lues au spectrophotomètre à 260 nm. Celles contenant l'ARN poly(A)⁺ sont rassemblées et précipitées par l'éthanol.

4. HYBRIDATION SUR L'ADN GÉNOMIQUE

L'ADN génomique digéré par les enzymes de restriction est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose (1% d'agarose; 1 x TAE). L'ADN est ensuite dépuriné, dénaturé,

neutralisé et transféré sur une membrane de nylon (Amersham Hybond-N) selon Southern (Southern, 1975).

L'hybridation se fait principalement selon Hames et Higgins (1985) dans un tampon phosphate 20 mM, pH 6,8 contenant 50 % de formamide déionisée, 5 x SSC, 1 x Denhardt's, 0,2 % SDS et 10% de sulfate de dextran (PM 500 K) en présence de 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon. La préhybridation se fait à 42°C pendant 3 à 4 h; l'hybridation se fait à la même température avec la sonde marquée au ³²P.

Après 12 h d'hybridation la membrane est lavée 2 x 5 min dans du 2 x SSC/ 0,1 % SDS à température ambiante et ensuite 2 x 30 min à 50°C dans du 0,2 x SSC/ 0,1 % SDS. La membrane est mise en contact avec un film Kodak XO-MAT à -70°C.

5. L'HYBRIDATION SUR LES ARN TOTAUX

Après électrophorèse en gel dénaturant (agarose/formaldéhyde; Sambrook *et al.*, 1989) les ARN totaux sont transférés sur une membrane de nylon (Amersham) selon le protocole de Southern (1975) adapté pour les ARN selon Thomas (1980). La fixation se fait à 80°C pendant 2 h ou par cross-linking sous UV pendant 4 min.

La préhybridation se fait dans le tampon suivant: 7 % SDS, 0.25 M Na₂HPO₄ [pH 7.0], 1 % BSA (Sigma, Fraction V) à 65°C pendant au moins 1 h. L'hybridation se fait à 60-68°C (selon le degré d'homologie de la sonde) dans le même tampon en présence de la sonde. Après 8-12 h d'hybridation la membrane est lavée à la même température, mais dans du 5 % SDS, 0.02 M Na₂HPO₄ [pH 7.0]. La stringence du lavage est augmentée par une baisse de la concentration en SDS. Après les lavages, la membrane est mise en contact avec un film Kodak XO-MAT à -70°C.

6. CONSTRUCTION DE LA BANQUE D'ADNc

6.1. Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)

La synthèse des ADNc est effectuée selon le protocole du kit *Amersham* "cDNA synthesis system plus".

La synthèse se fait à partir de 1 à 2 µg d'ARN; le nucléotide radioactif est le [^α³²P]dCTP. Lorsque le premier brin est synthétisé, l'ARN est éliminé par une RNase H et le second brin est synthétisé par l'action de la DNA polymérase I d'*E. coli*. L'ADNc double brin est ensuite purifié par une extraction au phénol/chloroforme (1/1; v/v) et précipité par une solution d'acétate d'ammonium et d'éthanol absolu.

Les ADNc sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose en conditions dénaturantes (NaOH 50 mM) (Sambrook *et al.*, 1989). Ainsi il est possible de déterminer la distribution des différentes classes d'ADNc d'après leur migration dans le gel.

6.2. L'encapsulation de l'ADNc dans les phages

Les ADNc sont insérés dans les bras du phage (voir résultats) selon le protocole décrit par Amersham. Après une incubation de 20 h à 15°C, le milieu réactionnel est transféré à 20°C pendant 2 h en présence des deux réactifs d'Amersham. A ceux ci sont ajoutés 0,5 ml d'un tampon Tris.HCl pH 7,5 contenant du NaCl, du MgSO₄ et 2 % de gélatine. Les tubes sont alors stockés à 4°C jusqu'au titrage de la banque.

7. LE TITRAGE ET LE CRIBLAGE DE LA BANQUE

7.1. Titrage de la banque

Les phages sont mis en suspension (dans du tampon Tris.HCl pH 7,5 en présence de 2% de gélatine) à des dilutions de 10⁻² à 10⁻⁷. Cent microlitres de chaque dilution sont ensuite mélangés à 100 µl d'une suspension d'*E. coli* (Y1090) et mis à incuber 15 min à 37°C. Les phages sont alors étalés en boîtes de Petri et incubés pendant une nuit à 43°C. Le titre de recombinants est calculé en comptant le nombre de plages de lyse.

7.2. Criblage de la banque

Le criblage de la banque se fait par hybridation sur les plages de lyse. Les phages sont dilués afin d'obtenir 4.10⁴ plages de lyse par ml. Ceux-ci sont mis en contact avec une première membrane pendant 5 min et une deuxième membrane est ensuite déposée sur les phages pendant 8 min. Les 2 membranes sont alors trempées 5 min dans une solution de dénaturation (0,2 M NaOH; 0,2 M EDTA pH 8,0) puis transférées dans une solution de neutralisation pour 5 min (acétate d'ammonium 2 M pH 4,5). Elles sont finalement rincées pendant 2 x 5 min dans du 2 x SSC. L'ADN est fixé 1-2 h à 80°C.

L'hybridation se fait en présence d'oligonucléotides marqués au ³²P (voir 'Préparation des sondes') dans un tampon 5 x SSC, 5 x Denhardt's, 1 % SDS et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon. La préhybridation se fait à 47°C pendant 2-3 h et l'hybridation se fait dans les mêmes conditions pendant 18-20 h. Les membranes sont ensuite lavées 2 fois 15 min dans une solution de 2 x SSC; 0,1 % SDS et mises en contact avec un film autoradiographique (Kodak XO-MAT) à -70°C.

7.3. L'extraction de l'ADN des phages

Les plages de lyse présentant un signal positif sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et introduites dans 0,5 ml d'une suspension d'*E. coli* Y1090 ($2,5 \cdot 10^8$ cellules/ml). L'adsorption des phages s'effectue pendant 15 min d'incubation. Puis 5 ml de milieu de culture contenant du CaCl_2 (5 mM) et de la triacilline (50 $\mu\text{g/ml}$) sont ajoutés. Après une lyse totale, les phages sont récupérés et stockés à 4°C en présence d'une goutte de chloroforme. Un premier titrage de la banque est réalisé afin de procéder à un deuxième criblage puis à un troisième criblage. Si toutes les plages présentent un signal positif, l'ADN phagique est extrait et purifié.

A 4 ml de lysat de phages, 4 ml de tampon SM (100 mM NaCl; 100 mM Tris.Cl pH 8,0; 2 mM EDTA) sont ajoutés en présence de 20% de PEG. Après une incubation sur glace pendant une heure puis une centrifugation, le culot est repris dans du LB en présence de la résine DE-52 (*Bio-Rad*). Après deux centrifugations successives les protéines sont éliminées par un traitement à la protéinase K (0,1 mg/ml) suivi d'une incubation en présence d'acétate de potassium 3 M à 88°C puis d'une précipitation. Le surnageant, contenant l'ADN phagique, est précipité en présence d'éthanol à -20°C.

8. EXTRACTIONS D'ADN PLASMIDIQUE

8.1. La minipréparation de l'ADN plasmidique

L'extraction à petite échelle se fait selon Birnboim et Doly (1979) à partir d'une culture liquide de 1 à 1,5 ml. L'extraction est basée sur une lyse alcaline totale des cellules, suivie d'une neutralisation et d'une précipitation des protéines. L'ADN chromosomique est éliminé au cours de la précipitation et les plasmides sont purifiés (par phénolisation) et précipités.

8.2. La maxipréparation de l'ADN plasmidique

Une extraction à grande échelle se fait à partir d'une culture bactérienne liquide de 100 à 200 ml. La préparation et la purification se font principalement selon le protocole Qiagen™ (Diagen). La culture bactérienne est centrifugée et resuspendue dans 4 ml de tampon P1 (25 mM Tris.HCl pH 8,0; 10 mM EDTA). Après 5 min, 4 ml de tampon P2 (1 % SDS, 0,2 N NaOH) sont ajoutés et ce mélange est incubé pendant 5 min à température ambiante. Afin de précipiter les protéines dénaturées, 4 ml de tampon P3 (2,55 M KAc pH 4,8) sont ajoutés et après incubation sur glace pendant 30 min, le tout est centrifugé

(30.000 g, 30 min, 4°C). Le surnageant est filtré sur Miracloth™ et le plasmide est purifié sur une colonne Qiagen-tip 100.

9. L'HYBRIDATION SUR L'ADN PLASMIDIQUE

Après l'électrophorèse (1 x TAE) en gel d'agarose (0,5 à 1 %), l'ADN est transféré selon Southern (1975). La membrane fixée (4 min sous UV ou 2 h à 80°C) est préhybridée dans le tampon d'hybridation (6 x SSC, 1 x Denhardt's, 0,1 % SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon) pendant au moins 2 heures à 60°C et ensuite hybridée pendant au moins 6 h à 60°C dans le même tampon en présence de la sonde marquée. La membrane est ensuite lavée successivement dans 6 x SSC, 0,1 % SDS (2 x 5 min, température ambiante), 2 x SSC, 0,1 % SDS (2 x 15 min, 60°C) et finalement dans 0,2 x SSC, 0,1 % SDS (2 x 30 min). La membrane est mise en contact avec un film Kodak XO-MAT à -70°C.

10. LE MARQUAGE DES SONDAS D'ADN

10.1. Marquage d'oligonucléotides par kination

La kination permet de marquer des oligonucléotides (de taille de 20-50 bp) d'une façon spécifique à l'extrémité 5'OH en présence de la T₄ polynucléotide kinase:

30 pmoles d'oligonucléotides sont incubés en présence du tampon de kination (10 x T₄PNK Boehringer), 2 U de T₄ polynucléotide kinase, 3 pmole de [γ -³²P]ATP (act. spéc. 10 mCi/ml) pendant 1 h à 37°C.

Les oligonucléotides sont purifiés sur une colonne Nensorb™ (NEN-Research Products-Biotechnology System Division) afin d'éliminer les nucléotides non-incorporés.

10.2. Multiprime labelling

Les sondes ADN sont marquées à l'aide du kit 'T7-Multiprime labelling' de Pharmacia.

A 25-50 ng de sonde dénaturée dans le tampon de marquage (dans un volume final de 50 µl), sont ajoutés les hexanucléotides et les dNTP, le [α -³²P]dCTP (act. spéc. 25 µCi/µl) et la T₇ DNA polymérase. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à 37°C. Les sondes sont purifiées sur colonnes Qiagen-tip 5, selon le protocole Qiagen (Diagen).

11. SYNTHÈSE ET MARQUAGE DES SONDAS D'ARN

11.1. Marquage de sondes froides

La synthèse de sondes ARN se fait à partir d'un vecteur contenant les promoteurs SP6, T7 ou T3 RNA polymérase aux extrémités du polylinker. La synthèse des sondes 'run off' se fait sur du vecteur linéarisé en présence des nucléotides et de l'UTP couplé à la digoxigénine. Cette base marquée est incorporée tous les 20-25 nucléotides.

Le mélange réactionnel (50 µl) comporte 1µg d'ADN, le mélange des dNTP, 2 U d'inhibiteur de RNase, le tampon de transcription et 40 U de SP6, T7 ou T3 RNA polymérase. Le tout est incubé pendant 2-4 h à 37°C. Ainsi, 10-20 µg d'ARN peuvent être synthétisés à partir de 1µg d'ADN. L'ARN est précipité en présence d'éthanol et après centrifugation, le culot est repris dans 50 µl d'eau traitée DEPC. Pour améliorer la pénétration de la sonde dans les tissus, la sonde est soumise à une hydrolyse afin d'obtenir des fragments de 150 nucléotides. L'hydrolyse se fait à 60°C dans 30 µl de 0,2 M Na₂CO₃ et 20 µl de 0,2 M NaHCO₃. Le temps d'hydrolyse est calculé selon Moench *et al.* (1985) et est donnée dans la formule suivante:

$$t = \frac{(L_0 - L_f)}{k L_0 L_f} \text{, où}$$

L_0 = taille du fragment au départ

L_f = taille du fragment souhaitée

k = constante de 0,11 Kb/min

Après l'hydrolyse, l'ARN est précipité à -20°C en présence de 5 µl d'acide acétique 10%, 11 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 6,0), 1 µl de tRNA (10 mg/ml), 1.2 µl de MgCl₂ 1 M et 300 µl d'éthanol. Après centrifugation, le culot est repris dans un volume adéquat et la sonde est prête pour l'hybridation.

12. SYNTHÈSE DES OLIGONUCLÉOTIDES

Les oligonucléotides sont synthétisés selon la méthode au β-cyanophosphoramidate dans un synthétiseur automatique (Applied Biosystems 394 DNA Synthesizer) en utilisant le programme de synthèse standard. Les oligonucléotides sont ensuite séchés sous vide et resuspendus dans de l'eau. Ils sont stockés ainsi à -20°C. Les concentrations sont déterminées par lecture de l'absorbance à 260 nm.

13. LA PCR

L'amplification par PCR se fait principalement selon les conditions suivantes:

1 µg d'ADN génomique	<u>*Composition du Tampon 10 x PCR:</u>
400 ng de chaque oligonucléotide	672 mM Tris.Cl pH 8,8
2.5 U Taq polymérase	166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
200 µM du mélange dNTP	67,2 mM MgCl ₂
1 x Tampon PCR (*)	100 mM β-ME
(V _{tot} = 100 µl)	1,68 mgml ⁻¹ gélatine

Conditions d'amplification:

dénaturation	94° 2'	94° 1'	94° 1'
hybridation	54° 1'	56° 1'	56° 1'
polymérisation	<u>72° 2'</u>	<u>72° 2'</u>	<u>72° 10'</u>
#cycles	1 X	33 X	1 X

Chaque amplification a été réalisée dans ces conditions mis à part quelques petites modifications, telles que les durées ou les températures d'hybridation.

14. LA LIGATION POUR LA PCR INVERSE

La PCR inverse a pour but d'amplifier une région inconnue adjacente à une région connue. Pour cela l'ADN génomique est digéré de telle façon qu'on obtienne une seule bande par hybridation en utilisant une sonde voisine de la séquence inconnue. L'ADN correspondant à la bande qui contient la région inconnue et une partie de la séquence connue, est circularisé par ligation. Ce fragment circularisé est de nouveau linéarisé par coupure dans un site de restriction unique dans la séquence connue. L'amplification par PCR peut alors s'effectuer selon un protocole classique.

Une fois que l'enzyme de restriction susceptible de libérer le fragment recherché est déterminé, l'ADN génomique est digéré par cette enzyme de restriction puis lié de telle façon que la formation de cercles de monomères est favorisée. Cette ligation se fait comme décrit par Collins et Weissman (1984). Afin d'obtenir des cercles de monomères, il est important que $i < j$, où

i = la concentration totale d'ADN

j = la concentration locale d'une extrémité proche d'une autre de la même molécule

Le volume finale du milieu de ligation est donc important et est calculé selon la formule suivante:

$$j = \frac{63.4}{[\text{taille Kb}]^{1/2}} \mu\text{g/ml} \quad \text{et } 10i < j.$$

La ligation se fait à 12°C pendant 12h avec la T₄DNA superligase (New England Biolabs; 400000 U/ml) à une concentration supérieure de 2,5 U/μl. Après phénolisation, l'ADN circularisé est précipité. Le culot est repris dans un volume final de 10 μl et utilisé pour l'amplification par PCR.

15. LE SÉQUENÇAGE

Une partie du séquençage a été réalisée au sein du laboratoire de Génétique de Gand en utilisant le kit "Taq DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems) sur un "ABI 373 DNA Sequencer" (Applied Biosystems).

Le séquençage que nous avons réalisé a été fait selon le protocole de Sequenase® (United States Biochemical) :

L'ADN subit une dénaturation alcaline de 2 min à 65°C pour l'hybridation des oligonucléotides dans un volume final de 10 μl. Ce mélange réactionnel est refroidi lentement à < 35°C pendant 15-30 min; sont ensuite ajoutés le [α -³⁵S]dATP, 0.1 M DTT, la solution de marquage et la séquenase polymérase. Après mélange et une courte incubation de 2-5 min à température ambiante, 3.5 μl de ce mélange sont transférés dans chaque tube contenant les réactifs de terminaison (ddGTP, ddATP, ddTTP et ddCTP) et préincubés à 37°C pour 5 min. Après l'addition du tampon d'arrêt et une incubation de 2 min à 75°C les échantillons sont immédiatement chargés sur gel .

Le gel utilisé est un gel classique de polyacrylamide à 6%. Après une double migration de 5 h et 3 h (1800V, 80 mA, 55 °C) dans le tampon TBE (10 x TBE: 108 g/l Tris.Cl pH 8,0; 55 g/l acide borique; 9,4 g/l Na₂EDTA), le gel est éventuellement fixé dans 10 % d'acide acétique, 10 % de méthanol afin d'éliminer l'urée. Ensuite le gel (après séchage à 80°C) est mis en contact avec un film autoradiographique (Kodak XAR-5).

Les séquences ont été analysées sur 'Intelligenetics®' (Université de Genève, Suisse) et 'GCG Software', quick@embl-heidelberg.de; les alignements ont également été effectués sur PC/Gene® ainsi que sur Blitz@EMBL-heidelberg, Fasta@embl-heidelberg.de, predictprotein@embl-heidelberg.de et cbrg@inf.ethz.ch.

III. LES TECHNIQUES D'HYBRIDATION *IN SITU*

1. L'HYBRIDATION *IN SITU* EN BUTYL-METHYLACRYLATE (BM)

1.1. Préparation du matériel

La méthode d'inclusion en BM permet d'obtenir une meilleure préservation histologique des tissus comparée à l'inclusion en paraffine. Le protocole utilisé a été décrit par Kronenberger *et al.* (1993).

Les tissus sont fixés dans un tampon 50 mM PIPES contenant de la formaldéhyde à 4% et du DTT 1 mM pendant des durées variant de 6 heures à une nuit à 4°C. Toutes les étapes suivantes se font à 0-4°C.

Les tissus sont déshydratés dans une série de bains successifs d'éthanol de 10% à 95% contenant du DTT 1 mM et finalement dans l'éthanol à 100% contenant du DTT 10 mM. Chaque étape de déshydratation se fait pendant 2 x 45min (les tissus peuvent éventuellement être conservés pour une courte durée dans de l'éthanol à 80%).

Après la déshydratation des échantillons, ceux-ci sont transférés successivement dans une série de bains d'éthanol-méthacrylate (25%, 50%, 75%, 100% BM) et ensuite dans trois bains de méthacrylate à 100% (4:1 B/M) et toujours en présence de DTT 10 mM.

De l'azote gazeux est bullé dans le milieu d'inclusion contenant 0.5% d'éther benzoïne éthylique afin d'éliminer l'oxygène. Les échantillons sont alors placés dans des capsules et mis à 4°C sous UV pendant 18-72 h pour la polymérisation. Le milieu ne contient pas d'agents de cross-linking afin que le polymère puisse se dissoudre dans de l'acétone après la confection des coupes. Les échantillons une fois inclus dans le BM, peuvent être stockés à -20°C.

1.2. La confection de coupes en BM

Le matériel inclus dans le BM est coupé à sec à l'aide d'un microtome Reichert. Des coupes semi-fines (4-6 µm) sont placées sur les lamelles. Après séchage sur une plaque chauffante (60°C) la résine est enlevée par une incubation de 5-15 min dans de l'acétone. Les coupes sont réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de 100 à 30% additionné de NaCl 0.85%. Après un lavage dans du 0.85% NaCl, les coupes sont transférées dans le tampon PBS (8 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14.4 g/l Na₂HPO₄ et 2.4 g/l K₂HPO₄; pH 7.4) Elles sont ensuite traitées à la protéinase K (40 µg/ml) pendant 10 minutes, puis incubées dans du PBS/0,2 % glycine (2 min) et post-fixées dans de la formaldéhyde (4% dans du PBS; v/v). Après plusieurs lavages dans le PBS les coupes

sont traitées par 0.5% d'anhydride acétique dans du 0.1M triéthanolamine (pH 8.0), lavées dans du PBS et ensuite dans du NaCl 0.85%. Les coupes sont finalement déshydratées dans une série de bains d'éthanol, séchées à l'air et incubées pendant une nuit à 50°C avec la sonde d'ARN marquée à la digoxigénine.

2. L'HYBRIDATION *IN SITU* SUR DES EXPLANTS ENTIERS ('WHOLE MOUNT')

2.1. Introduction

Les techniques d'hybridations *in situ* sur de l'ARNm sont amplement utilisées pour étudier l'expression spatiale des gènes dans les plantes.

L'hybridation *in situ* sur des explants a été développée pour localiser des ARNm dans des embryons de *Drosophila melanogaster* (Tautz et Pfeife, 1989). Ludevid *et al.* (1992) ont pu localiser des ARNm codés par un gène spécifique du tonoplaste qui est exprimé dans les cellules de la zone d'élongation de la racine des plantules d'*Arabidopsis thaliana*.

Nous avons utilisé cette nouvelle technique, modifiée par de Almeida *et al.* (1994) afin de localiser l'expression spécifique du gène de la nitrate réductase chez la chicorée de Bruxelles.

2.2. Préparation et fixation du matériel végétal

Le matériel utilisé correspond à des plantules entières ou des explants (racines, feuilles...). 200 mg de matériel végétal sont fixés pendant 2 x 15 min dans 5 ml de PBT (PBS additionné de 0,1 % Tween 20) contenant de l'EGTA 0,08 M, 5 % de formaldéhyde et 10 % de DMSO à pH 7,4. Ce fixateur est mélangé avec un même volume d'heptane afin de mieux perméabiliser les tissus. L'heptane dissout les lipides membranaires. Les tissus fixés sont ensuite déshydratés dans du méthanol (2 x 5 min) et dans de l'éthanol (4 x 5 min) et placés pendant une nuit à -20°C.

2.3. Traitements de préhybridation

Les échantillons sont rincés par de l'éthanol absolu et lavés pendant 45 min dans un mélange d'éthanol et de xylène. Après deux lavages de 2 x 5 min dans de l'éthanol 100% et du méthanol 100%, ils sont transférés dans un mélange de méthanol et de PBT (1:1; v:v) pour 10 min. Les échantillons sont ensuite post-fixés pendant 30 min dans du PBT contenant 5% de formaldéhyde et rincés plusieurs fois dans du PBT. Le traitement par la protéinase K (40 µg/ml) se fait dans du PBT pendant 20 min à température ambiante. La protéinase K est neutralisée par un rinçage au PBT à 0.2% de glycine pendant 5 min et deux rinçages successifs par du PBT. Une nouvelle post-fixation se fait

pendant 30 min au PBT additionné de 5% de formaldéhyde. Les échantillons sont ensuite rincés plusieurs fois par du PBT. Après passage dans un mélange de PBT et de tampon d'hybridation (HS: 50% formamide, 5 x SSC, 50 µg/ml d'héparine) (1:1; v:v) suivi de quelques rinçages dans le HS, la préhybridation se fait dans le HS pendant 1-2 h à 60°C.

2.4. L'hybridation

Les tissus sont transférés dans des tubes Eppendorf en présence de 100 à 500 µl de tampon d'hybridation contenant 1 à 3 µg/ml de sonde et de l'ADN de sperme de saumon (concentration finale de 100 µg/ml) dénaturés.

L'hybridation se fait à 60°C dans un environnement humide pendant 20h. La synthèse de la sonde s'effectue comme préalablement décrit dans 12.1.. Les sondes ribonucléiques sont digérées jusqu'à une taille moyenne de 150 nucléotides par hydrolyse alcaline (Cox *et al.*, 1984).

2.5. Les traitements de post-hybridation

Les échantillons sont d'abord lavés 2 x 30 min à 55°C dans du tampon HS frais et ensuite dans un mélange de HS/NTE (1:1) pendant 30 min à 37°C et une deuxième fois avec du NTE. Afin d'éliminer les sondes non-hybridées on procède à un traitement par la RNaseA (40 µg/ml) dans du NTE à 37°C pendant 30 min. Après quelques lavages dans du NTE à 37°C les échantillons sont mis à température ambiante et lavés plusieurs fois dans le même tampon. Ensuite ils sont équilibrés dans un mélange de NTE/PBT (1:1) pendant 20 min et rincés dans du PBT pour finalement être incubés avec la solution de blocage d'anticorps (BS: 2% BSA, Fraction V dans du PBT) pour une durée de 30 min.

2.6. Traitement des anticorps avant la détection

Afin d'éliminer les liaisons aspécifiques d'anticorps qui peuvent provoquer des bruits de fond importants, les anticorps sont d'abord saturés par une incubation d'une nuit avec des tissus fixés et non-fixés.

Les tissus frais et fixés sont broyés dans un petit volume d'acétone froid à 90%, en présence d'azote liquide et ensuite vortexés en présence d'acétone 90% puis mis à 4°C pendant une nuit. Après une centrifugation de 5 min à 13000 g, le surnageant est enlevé et le culot est resuspendu dans un petit volume d'acétone à 90%. La suspension est séchée sur un papier filtre dans un dessiccateur. La poudre séchée est stockée à 4°C.

La poudre (± 30 mg) et/ou les tissus coupés sont mis dans 400 µl d'une solution de PBT contenant 2% de BSA (fraction V) auquel 20 µl de fragments Fab anti-digoxigénine couplés à phosphatase alcaline (AP) sont ajoutés. Cette solution est incubée

pendant 24 h à température ambiante à l'obscurité. La solution de blocage est centrifugée pendant 3 min à 10000xg et le surnageant est utilisé pour la détection.

2.7. La détection

La solution de blocage (BS) est remplacée par 6 ml de tampon BS frais auquel on ajoute 60 µl d'anticorps présaturés et l'incubation se fait pendant une nuit à température ambiante. L'anticorps AP est finalement dilué au 1:2000. Un premier lavage est effectué dans du tampon BS frais pendant 10 min. Les échantillons subissent ensuite 4 lavages de 60 min dans du PBT puis sont équilibrés dans la solution de détection (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris.Cl pH 9,5 et 0,1% Tween 20) pendant 2 x 5 min. Les explants sont transférés dans des tubes en verre contenant du tampon de détection frais additionné de 1 mM de lévamisole. Le lévamisole agit comme un inhibiteur potentiel des alcalines phosphatases endogènes.

4,5 µl de NBT (75 mg/ml dans 70% v/v H₂O/diméthylformamide) et 3,5 µl de BCIP (50 mg/ml dans 100% de diméthylformamide) sont ajoutés et le tout est incubé à l'obscurité pendant 5 à 60 min.

La réaction chromogène est arrêtée par transfert des échantillons dans la solution de PBT en présence de 20 mM EDTA. Les échantillons sont ensuite analysés sous microscope et éventuellement traités au chlorolactophénol. La réaction se révèle par une coloration bleue, et par une coloration rougeâtre en microscopie à fond noir.

IV. DOSAGES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

1. NITRATE RÉDUCTASE

1.1. Mesure de l'activité Nitrate Réductase *in vivo*

La mesure de l'activité NR *in vivo* consiste à doser le nitrite produit pendant l'incubation des cellules maintenues en conditions d'anaérobiose et à l'obscurité (Ferrari et Varner, 1971; Jaworski, 1971).

Les explants ou les cellules filtrées sont pesés et immergés dans 1ml de tampon phosphate (3 vol de 0,1 M K₂HPO₄ et 0,1 M KH₂PO₄ pH 7,4; 5 vol de 0,1 M KNO₃ et 0,1 vol de n-propanol). Le mélange est soumis à un courant d'azote durant ±1 minute afin d'obtenir les conditions anaérobies nécessaires pour réduire l'activité NiR. Le tube immédiatement bouché est placé à l'obscurité et à 28°C pendant 30 min. Les nitrites formés *in vivo* sont révélés par addition de 2 réactifs: 0,5 ml de sulfanilamide et 0,5 ml

naphtyléthylènediamine hydrochlorure. L'activité nitrate réductase (ANR) est mesurée par absorption colorimétrique à 540 nm et est exprimée en $\mu\text{mole NO}_2^-/\text{min/g MF}$.

1.2. Mesure de l'activité Nitrate Réductase *in vitro*

1.2.1. L'extraction

Les tissus ou les cellules sont d'abord broyés dans de l'azote liquide, puis la poudre est reprise et rebroyée dans le tampon d'extraction (Tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M pH 7,4; 3 mM EDTA; 0,1 M KNO_3 ; 5 % [p/v] PVPP; 0,1 mM Na_2MoO_4 ; 2,5 mM cystéine; 0,5 % Triton X-100 [v/v]); 10 μM leupeptine) sur glace. Après une centrifugation (27.000 g; 20 min) le surnageant est filtré sur Whatman 1M. Le filtrat qui contient l'enzyme est utilisé pour la mesure de l'ANR.

1.2.3. Mesure de l'activité NR

A 100 μl d'extrait brut sont ajoutés: 1 ml de tampon de mesure (0,005 M K_2HPO_4 pH 7,5; 3 mM EDTA; 25 μM leupeptine; 0,625 mM Cystéine; 0,125% Triton X-100 [v/v]; 10 μM FAD), 100 μl 0,1 M KNO_3 , 200 μl 1 mM NADH. Cette solution est incubée à 28°C pendant 30 min. Le NADH pouvant interférer avec la lecture du nitrite (Hewitt et Nicholas, 1964), l'excès de NADH est neutralisé par une courte incubation en présence d'alcool déshydrogénase (50 μl d'une solution de 50 mg/ml à 400 U/mg) et l'acétaldéhyde (50 μl d'une solution de 5,6 ml/100ml). Après l'addition du sulfanilamide (0,2 % dans le HCl 3N) et de la naphthyléthylène diamine (0,15 %), la DO est mesurée à 540 nm.

2. SACCHAROSE SYNTHASE

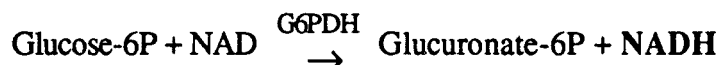
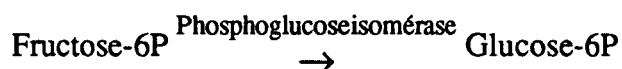
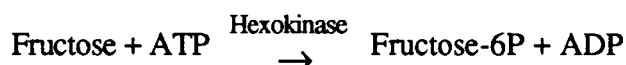
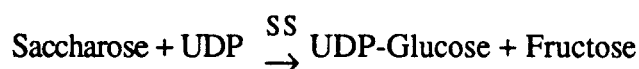
2.1. L'extraction

Le broyage se fait à 0°C dans le tampon d'extraction (500 mM K-phosphate/citrate pH 7,0; 5 mM MgCl_2 ; 3 % PVP; 5 mM DTT; 10 mM EDTA; 20 % Glycérol; 1 mM PMSF; Triton X-100). Le broyat est agité 20 min sur glace et après centrifugation le surnageant est purifié par deux précipitations successives au $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$. Après une centrifugation le surnageant est repris dans le tampon de réaction (50 mM Hepes pH 7,2; 15 mM MgCl_2 ; 1 mM EDTA; 2 mM DTT) et dessalé sur une colonne PD10 (Pharmacia). Les protéines sont récupérées dans 3 ml de tampon de réaction. Cette solution est utilisée pour mesurer les activités SS mais aussi SPS.

2.2. Mesure de l'activité Saccharose Synthase (SS)

La mesure se fait essentiellement selon Nguyen-Quoc (1991) basée sur un principe de 3 réactions enzymatiques couplées l'une à l'autre dont l'étape finale libère le NADH. Le NADH est le composé final qui sera quantifié par mesure de l'absorbance (à 340 nm) reflétant l'activité de la saccharose synthase.

Le principe:



Les réactions se font dans le tampon suivant: 50 mM HEPES pH 7,0; 2 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 100 mM ATP; 140 mM NAD; 1 M Saccharose; 100 mM UDP en présence des enzymes de couplage (PGI [700 U/ml]; HK [300 U/ml]; Glucose-6P-déshydrogénase [G6PDH; 1000 U/ml]).

Elles s'effectuent à 30°C dans une microcuve dans un volume final de 1ml, en deux étapes:

La 1^{ère} étape consiste à incuber l'échantillon en présence de 200 mM de saccharose, 1 mM ATP, 0,4 mM NAD, les enzymes de couplage (7 U de PGI; 3 U de HK et 10 U de G6PDH) dans le tampon Hepes. Une lecture spectrophotométrique est effectuée en continu à 340 nm à 30°C pendant 10 min.

Lors de la 2^{ème} étape 2 mM d'UDP sont ajoutés au mélange obtenu précédemment et la lecture se répète à 340 nm à 30°C pendant 10 min.

L'activité de la saccharose synthase est donnée par la pente des deux droites et l'intégration de celles-ci doit être calculée de telle façon qu'on obtienne un coefficient de régression le plus proche de 1. La différence des pentes permet de mesurer l'activité SS (réduction d'une mole de NAD pour la formation d'une mole de fructose).

La 1^{ère} étape permet en fait de mesurer l'activité invertasique neutre et la différence des deux pentes permet de soustraire cette activité de celle de la SS. Ainsi on obtient la formule suivante (où l'activité SS est donnée en µmole Fructose/min/mg prot):

$$\text{Activité SS} = \frac{\Delta \text{Pente} / \# \mu\text{g de protéine dans } 100\text{ml}}{6.22 \times t} \times 1000$$

où

6,22 = coefficient d'extinction molaire du NADH (L. cm⁻¹. μmole⁻¹)

t = temps d'intégration

3. SACCHAROSE PHOSPHATE SYNTHASE

3.1. L'extraction

L'extraction se fait de la même façon que pour la SS.

3.2. Mesure de l'activité saccharose phosphate synthase (SPS)

L'activité SPS est mesurée en conditions de substrat non limitant (V_{max}) et par la formation de saccharoseP à partir d'UDPG et de Fru6P en présence de Glu6P. Le milieu d'incubation est tamponné par du 50 mM HEPES (pH 7,5) et contient du 10 mM Fru6P, 10 mM UDPG, 32 mM Glu6P, 15 mM MgCl₂, 15 mM EDTA en présence de 50 μl de l'extrait enzymatique.

L'incubation se fait à 25°C pendant 10 min. La réaction est arrêtée par l'addition de 5 N NaOH qui modifie le pH. Le Fru6P non-métabolisé est détruit par une incubation de l'échantillon pendant 10 min à 100°C suivi par un refroidissement sur glace pendant 5 min. L'addition de 1250 μl de solution d'anthrone (0,15 % [p/v]) dans H₂SO₄ 70 % (v/v) à 40°C pendant 20 min permet ensuite la lecture de la DO à 620 nm après refroidissement de l'échantillon sur glace. Ainsi l'activité est calculée selon la formule suivante (en nmole sacch/min/mg prot):

$$\text{Activité SPS} = \frac{29 \times [\text{DO}_{620} (\text{essai} - \text{blanc}) / \text{DO}_{620} (\text{standard} - \text{blanc})] \times 2}{t_{25^\circ\text{C}} \times \# \mu\text{g Protéines dans } 100\mu\text{l}} \times 1000$$

4. INVERTASE

4.1. L'extraction

Le broyage du matériel végétal (1 g) se fait dans un tube Potter à 0°C dans 1 ml de tampon phosphate-citrate 0,1 M pH 4,8. Le tout est centrifugé 5 min à 10000 g et le dosage se fait sur le surnageant.

Tampons	T0 (sans incubation)	T30 (30min d'incubation)
Extrait	100 µl	100 µl
Saccharose 0,225M	200 µl	200 µl
ZnSO ₄ 5 %	300 µl	300 µl
Ba(OH) ₂ 0,15M	300 µl	300 µl

4.2. Mesure de l'activité invertasique

Le dosage se fait selon le protocole suivant:

Le temps T0 permet de déterminer la quantité de glucose existant à l'état libre dans l'extrait biologique et se fait sur 300µl du surnageant auxquels sont ajoutés 2 ml de réactif GOD-POD (= 99 vol de réactif A + 1 vol de réactif B; [Réactif A: 16 mg de peroxydase; 1 ml de Glucose-oxydase (Sigma) dans 200 ml de 200 mM Tris.Cl pH 7,5] ; [Réactif B: 50 mg d'orthodanisidine dans 7 ml H₂O]). Le tout est incubé pendant 10 min à 30°C et après l'arrêt de la réaction par l'addition de 1 ml de 6 N HCl, la DO est lue à 530 nm. Les concentrations de glucose sont calculées à partir d'une gamme étalon (préparée de la même façon que pour les échantillons, mais à partir d'une solution mère de glucose de 0 à 100 µg/ 100 µl). Les activités sont exprimées en µmoles de saccharose hydrolysé par min/mg de protéines.

5. ÉTUDE DE PHOSPHORYLATION ET DE DÉPHOSPHORYLATION

Ces expériences ont pour but de vérifier l'état de phosphorylation sous lequel se trouve la protéine concernée lorsqu'elle est active.

5.1. Caractérisation de la protéine nitrate réductase

Les cellules sont broyées dans de l'azote liquide et resuspendues dans un tampon A (HEPES/KOH 50 mM, pH 7.8, leupeptine 50 µM, MgCl₂ 5 mM). Après un homogénéisation d'une minute, le mélange est centrifugé à 15000xg pendant 2 min à 4°C. Les échantillons sont ensuite dessalés sur une colonne PD-10 (Pharmacia) et récupérés dans 3 ml de tampon A. Les activités enzymatiques sont mesurées en utilisant 50 µl d'extrait additionné de 950 µl de tampon d'incubation B (HEPES/KOH 20 mM, pH 7.8, leupeptine 50 µM, NADH 0.5 mM, KNO₃ 2 mM, FAD 10 µM) placés à 30°C durant 30 min. La réaction est arrêtée par l'addition de 20 µl d'acétate de zinc 0.5 M et de 50 µl d'ADH (2 mg/ml). Après une incubation de 5 min, les réactifs de diazotation sont ajoutés et la mesure de l'activité nitrate réductase est lue à 540 nm.

En parallèle, de l'ATP à une concentration final de 1 mM est ajouté à l'extrait brut et une cinétique est effectuée afin de mettre en évidence l'effet de la phosphorylation sur l'activité de la protéine.

5.2. Caractérisation de la protéine saccharose phosphate synthase

Les cellules sont broyées dans de l'azote liquide et resuspendues dans un tampon HEPES/KOH pH 7.4 (Siegl et Stitt, 1990). Après centrifugation (2 min, 15000xg à 4°C), les échantillons sont dessalés sur colonne PD-10 (Pharmacia) et récupérés dans 3,5 ml de tampon de réaction comme décrit précédemment.

Les activités enzymatiques sont mesurées dans les extraits bruts, et dans les échantillons additionnés d'ATP (1 mM) puis d'AMP (5 mM) et d'ATP ou AMP uniquement afin de mettre en évidence les effets de phosphorylation et déphosphorylation *in vitro* de la protéine SPS.

V. DOSAGE DES GLUCIDES

1. PREPARATION DES EXTRAITS

1.1. Les glucides intracellulaires

La technique d'extraction des glucides intracellulaires est inspirée de celle mise au point par Fiala et Jolivet (1980).

100 mg de cellules congelées par de l'azote liquide sont mises en suspension dans 1 ml d'eau bouillante pendant 15 minutes. Un extrait aqueux est recueilli par filtration sur Miracloth. Le résidu cellulaire est repris dans 1 ml d'éthanol à 80% et placé à 70°C durant 8 minutes. L'extrait alcoolique obtenu est ajouté à l'extrait aqueux et l'ensemble est placé une nuit à -20°C. Le précipité d'hydrates de carbone formé est centrifugé (20 min, 10000xg) et le culot est ensuite séché à 50°C pendant une nuit. Les résidus secs sont repris dans 1 ml de sorbitol (1 mg/ml). Le stockage des extraits se fait à -20°C afin d'éviter toute possibilité de fermentation alcoolique des extraits.

L'analyse des sucres présents est effectuée par HPLC après filtration des échantillons sur une membrane Millipore 0,045 mm.

1.2. Les glucides extracellulaires

Les échantillons sont dilués dans un même volume de sorbitol (1 mg/ml) et filtrés sur une membrane Millipore 0,045 mm. Ils sont analysés, comme les glucides intracellulaires, par HPLC.

2. L'ANALYSE PAR HPLC

Les glucides sont analysés sur un HPLC (Spectra Physics) équipé d'un détecteur réfractométrique (Knauer) et d'une colonne de microgel échangeuse d'ions (Water Sugar Pack 1). L'élution se fait à 85°C avec de l'eau distillée (0,5 ml/min).

L'étalonnage de la colonne se fait à l'aide d'une solution de saccharose, de glucose, de fructose et de sorbitol (tous à 1 mg/ml); le sorbitol étant le standard interne.

La concentration en oses (mg/ml) se calcule de la manière suivante:

$[\text{ose}] = (\text{Surface du pic de l'ose} / \text{Surface du pic de sorbitol}) \times F_{\text{ose}}$, où $F_{\text{saccharose}} = 0,857$,
 $F_{\text{glucose}} = 1,197$ et $F_{\text{fructose}} = 1,061$.

RÉSULTATS

CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADN_c

ET

CLONAGE D'UN ADN_c NR

1. CONSTRUCTION DE LA BANQUE ADNc

1.1. Extraction de l'ARN total de cultures cellulaires

L'ADNc est isolé à partir d'une banque d'ADNc représentant une population d'ARN polyadénylés (ARN poly(A)⁺). Dans notre cas le clone contenant l'ADNc d'intérêt a été identifié dans la population totale d'ADNc en criblant la banque avec des oligonucléotides synthétiques. La fréquence d'apparition de clones d'ADNc d'ARN messagers dans la banque, est généralement proportionnelle à l'abondance de ce type d'ARN dans la population totale des ARN messagers. Dans notre cas le nombre de copies d'ARN messenger nitrate réductase a été amplifié par un traitement des suspensions cellulaires par le nitrate.

Après 4 jours de culture, en présence de nitrate, les cellules de la souche B22 ont été prélevées à un stade où l'activité nitrate réductase est maximale.

Après filtration sous vide, les cellules sont congelées par de l'azote liquide et l'ARN est extrait à froid (voir 'Matériel et Méthodes') à partir de 5 g de cellules. Les ARN sont dissous dans 1ml d'eau stérile. Des aliquotes de 20 µl sont prélevées et ajoutées à 980 µl d'eau afin de lire les absorbances à 230, 260, 280 nm (A₂₃₀, A₂₆₀, A₂₈₀).

	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Lot n°1	0.177	0.447	0.224	1.99	2.53
Lot n°2	0.145	0.450	0.211	2.13	3.10
Lot n°3	0.144	0.448	0.209	2.14	2.14

Tableau 1: Valeurs des A₂₃₀, A₂₆₀, A₂₈₀ de solutions d'ARN total (dilution 1/50) extrait de lots de 5g de cellules.

Le calcul des rapports A₂₆₀/A₂₈₀ et A₂₆₀/A₂₃₀ montre qu'ils sont respectivement égaux et supérieurs à 2. On considère que la qualité de l'extraction est satisfaisante. Afin de vérifier l'intégrité des ARN, nous procédons à une électrophorèse en gel d'agarose (1% d'agarose dans du tampon TBE selon Sambrook *et al.*, 1989).

Sachant qu'une unité de A₂₆₀ correspond à 40 µg d'ARN total, la teneur en ARN des cellules est d'environ 170 µg/g MF.

1.2. Purification des ARN polyadénylés (ARN poly(A)⁺)

L'ARN polyadénylé est séparé des ARN non-polyadénylés (ARN poly(A)⁻) par chromatographie sur colonne de cellulose oligo dT conditionnée par du tampon NETS.

L'ARN total est déposé sur la colonne et celle-ci est ensuite lavée par environ 5 ml de tampon NETS. Une aliquote de l'effluent est prélevée afin d'évaluer la teneur en ARN poly(A)⁻. Les ARN poly(A)⁺ sont élués par de l'eau stérile. Les A₂₆₀ et A₂₈₀ sont mesurées sur chaque fraction (0,5 ml). Les fractions les plus riches en ARN poly(A)⁺ sont collectées. La quantité d'ARN poly(A)⁺ collectée est de 11,52 µg. L'ARN poly(A)⁺ représente donc: 3,72% de l'ARN total si on considère la somme ARN poly(A)⁻ + ARN poly(A)⁺ recueillis ou 3,55% de l'ARN déposé. Ceci est une valeur satisfaisante puisque dans la littérature on trouve des valeurs comprises entre 1,5 à 5% selon les matériels analysés. Les ARN poly(A)⁺ obtenus à partir de plusieurs lots sont rassemblés et précipités à -20°C par de l'éthanol absolu en présence d'acétate de Na (voir Matériel & Méthodes).

1.3. Fabrication des ADN complémentaires (ADNc)

1.3.1. Synthèse du 1^{er} brin

La synthèse des ADNc a été effectuée à l'aide du kit "ADNc synthesis system plus" d'Amersham (Amersham RPN1256).

La synthèse s'est faite à partir de 3 µg d'ARN poly(A)⁺. Les ARN sont dénaturés par un passage à 70°C pour 2 minutes; le tube est ensuite placé sur la glace. Les réactifs suivants y sont ajoutés dans l'ordre:

Tampon 1 ^{er} brin	8.50 µl
NaPPi	2.00 µl
Inhibiteur RNase	2.00 µl
Mélange dNTP	4.25 µl
OligodT ₁₂₋₁₈	4.25 µl
[α ³² P]dCTP	0.50 µl
mRNA	6.00 µl
H ₂ O stérile DEPC	<u>12.50 µl</u>
Volume total	40.00 µl

L'incubation se fait à 42°C pendant une heure puis la solution est placée sur glace. Le taux de radioactivité incorporée est évalué comme suit: sur une aliquote de 2µl sont ajoutés 18 µl d'eau. Sur les 20 µl, quatre aliquotes de 2 µl sont déposées chacune sur un papier Whatman DE81. Deux disques servent de contrôle. Les deux autres sont lavés trois fois 10 min par une solution 0.5 M de Na₂HPO₄, suivi par un lavage de 1 min à l'eau, puis par de l'éthanol à 95% pendant une minute. Après séchage, la radioactivité est mesurée par comptage Cerenkov.

Les pourcentages de radioactivité incorporée étant de 5.9 %, le rendement de la réaction de synthèse du 1^{er} brin est de:

$$\frac{5.9 \times 10 \times 4 \times 350}{3000} = 27.53 \%$$

où 10 est le facteur de dilution, 350 la masse molaire moyenne d'un nucléotide triphosphate, 4 le nombre de nucléotides incorporés au hasard et 3000 la quantité en ng d'ARN poly(A)⁺ de la réaction (Ce rendement est satisfaisant car comparé à la réaction témoin faite sur 1 µg d'ARN poly(A)⁺ de globine on obtient un rendement de 25%, ce qui est le résultat attendu selon le protocole Amersham). Donc, en utilisant 3000 ng d'ARN messenger, nous obtenons 825 ng d'ADNc 1^{er} brin.

1.3.2. Synthèse du 2nd brin

Le mélange suivant est préparé:

Milieu de réaction 1 ^{er} brin	38 µl
Tampon 2 nd brin	34 µl
[α ³² P] dCTP (10 mCi/ml)	3 µl
RNase H (2,4 U/µl)	2 µl
DNA polymérase I (3 U/µl)	30 µl
H ₂ O stérile DEPC	93 µl
Volume total	200 µl

Une première incubation est faite à 12°C pendant 1h pour favoriser l'activité de la RNase H, puis 1h à 22°C pour l'activité polymérasique. Finalement après 10 min à 70°C et 2 min sur glace, on ajoute 2 µl de T₄DNA polymérase (5 U/µl) et le tube est incubé pendant 10 min à 37°C. La réaction est arrêtée par l'addition de 8 µl de EDTA 0.25 M (pH 8,0).

Le taux d'incorporation de radioactivité (déterminé comme décrit au 3.1.) est de 12.50% (= x%). Le poids moléculaire moyen d'un nucléotide est de 350; 4 nucléotides sont incorporés au hasard; la quantité de dCTP 'froid' introduit dans la réaction est de 10 nmoles. La quantité de nucléotides incorporés est donc de $\frac{4 \cdot x\%}{10}$, d'où la masse d'ADNc synthétisée:

$$\frac{350 \cdot 4 \cdot 12,5\%}{10} = 1750 \text{ ng.}$$

Le rendement de la réaction est calculé par la formule:

$$\frac{1750}{z} \cdot 100\% = 58,33 \%$$

(où z = quantité de mRNA utilisée = 3000 ng)

La répartition de taille des ADNc est étudiée par électrophorèse en conditions dénaturantes (50mM NaOH) en gel d'agarose à 1.4 % (Sambrook *et al.*, 1989). La figure 1 montre que les ADNc synthétisés sont d'une taille variant de 0.3 à 9.0 kb.

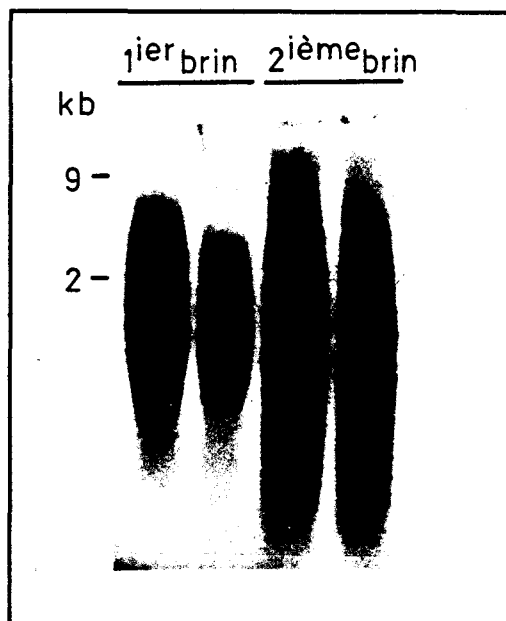


Figure 1: Autoradiographie de l'ADNc après électrophorèse en gel d'agarose.

On peut donc espérer dans la population d'ADNc, la présence de l'ADNc nitrate réductase dont la taille doit avoisiner les 3 à 4 kb.

1.4. Insertion de l'ADNc dans le λ gt11

Dans un premier temps les sites *EcoRI* internes de l'ADNc sont méthylés afin de les protéger. Un μ g d'ADNc est méthylé en présence de la S-Adénosyl-Méthionine. Ensuite les adaptateurs sont liés aux extrémités avec la T₄DNA ligase. Une fois l'adaptateur lié à l'ADNc, on procède à la libération du site *EcoRI* par une digestion *EcoRI*. Finalement on sépare les ADNc possédant les adaptateurs *EcoRI* des adaptateurs non liés par chromatographie sur une colonne Séphadex. On récolte des fractions de 200 μ l dont la radioactivité est déterminée par effet Cerenkov. Les fractions les plus 'chaudes'

sont rassemblées et précipitées par l'éthanol. L'ADNc est finalement inséré dans le phage λ gt11 selon le protocole suivant:

Tube	ADNc (50ng/ μ l)	λ gt11 (bras) (0.5 μ g/ μ l)	Tampon de ligation	H ₂ O	T ₄ DNA ligase (2.5 U/ μ l)
1	5 μ l (0.5 μ g λ gt11 comme contrôle)	0	1 μ l	1.5 μ l	2.5 μ l
2	2 μ l (ADN Témoin)	2 μ l	1 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l
3	2 μ l	2 μ l	1 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l
4	1 μ l	2 μ l	1 μ l	3.5 μ l	2.5 μ l
5	0.5 μ l	2 μ l	1 μ l	4.5 μ l	2.5 μ l

Le tube 1 contient donc 0.5 μ g de λ gt11 pour lequel il n'y a pas d'insert dans le gène *lacZ*. Le tube 2 contient de l'ADN témoin terminé par des adaptateurs *EcoRI* à chaque extrémité. Les tubes 3, 4 et 5 contiennent des teneurs variables d'ADNc terminés par les adaptateurs *EcoRI*. Après la ligation à 15°C pendant une nuit, l'encapsidation se fait selon le protocole *Amersham*.

La banque est finalement titrée. Une gamme de dilution de 10⁻⁴ à 10⁻⁷ des différents phages est effectuée. 100 μ l de témoins négatifs (sans inserts) et positifs (avec insert connu) ainsi que les phages recombinants (avec inserts d'ADNc de chicorée) sont mis à incuber en présence de 100 μ l d'une suspension d'*E. coli* (souche Y1090) pendant 15 min à 37°C. Ensuite ces cultures sont étalées (en présence de l'IPTG et du X-Gal) sur boîtes de Pétri et après une nuit à 42°C les plages de lyse sont comptées.

Comme prévu le témoin négatif formait 100% de plages bleues et le témoin positif 98% de plages blanches. En ce qui concerne les recombinants (ADNc de chicorée) le pourcentage de plages blanches était de 78% pour 100ng d'ADNc (tube 3), 79% pour 50 ng d'ADNc (tube 4) et 63% pour 25 ng d'ADNc (tube 5). Le titre de recombinants exprimé par le produit du nombre de plages blanches par la dilution (= plaque forming units[=pfu]), est donc:

100 ng: 0,36.10⁶ pfu/ml

50 ng: 0,47.10⁶ pfu/ml

25 ng: 0,33.10⁶ pfu/ml

Nous avons donc continué le travail avec la banque présentant le plus grand nombre de recombinants, c'est à dire celle fabriquée à l'aide de 50 ng d'ADNc. La taille

des inserts est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose (1,5%). 12 plages blanches sont prélevées au hasard; les phages sont multipliés par culture en milieu liquide agité à 42°C. L'ADN des phages est ensuite extrait, digéré par *EcoRI* et déposé sur gel. Neuf phages présentent des inserts dont la taille varie de 0.3 à 2.0 kb.

2. CRIBLAGE DE LA BANQUE

Les phages sont dilués de façon à obtenir entre $3 \cdot 10^4$ et $4 \cdot 10^4$ plages de lyse recombinantes. Le titre de la banque étant de $0,47 \cdot 10^6$ pfu/ml, nous prélevons 80 μ l de la suspension de phages qui sont introduits dans 120 μ l de tampon Tris.Cl pH 7,5 contenant 2% de gélatine. On doit donc obtenir théoriquement $3,75 \cdot 10^4$ plages de lyses. Ce mélange ajouté à 200 μ l de cellules d'*E. coli* est mis à incuber 15 min à 37°C, puis mélangé à 55 ml d'agarose maintenu à 45°C. Le tout est ensuite réparti sur un milieu de culture solide dans une boîte de Petri et mis à incuber une nuit à 42°C. Des répliques sont faites à l'aide de filtres en nylon. L'ADN transféré est dénaturé.

Le criblage s'effectue à l'aide de 2 sondes oligonucléotidiques. Leurs séquences ont été choisies à partir de séquences de nitrate réductase déjà publiées et sont situées dans la région 3' du gène *nia*.. Les deux sondes S1 présentant la séquence en acides aminés PEDDTEMY, et S2 présentant la séquence en acides aminés FRFALPSEDQ, sont homologues à une partie de la région flavinique du gène.

Ainsi, trois clones positifs ont été repérés, ils sont désignés par les termes W1, W2 et W3. Les plages correspondantes repérées sur la boîte sont excisées, les phages multipliés, titrés puis étalés sur un milieu solide. On obtient par dilution 200 plages de lyse par boîte. Puis on procède comme précédemment: multiplication des phages, transfert sur membrane de nylon, criblage par hybridation,...

Le W3 ne présentant que très peu de signaux positifs est éliminé. Le W1 et le W2 par contre produisent environ 60 à 65% de plages positives. Deux plages positives de W1 (W11, W12) et W2 (W21, W22) sont prélevées, amplifiées. Chacun de ces clones a été à nouveau criblé.

Nous avons sélectionné les clones W11, W21 et W22 qui produisent environ 100% de signaux positifs.

3. ANALYSE DE L'INSERT

Les clones W11, W21, W12 et W22 sont amplifiés à petite échelle dans une culture liquide (voir 'Matériel et Méthodes'). Après la lyse des 'plating cells' (Y1090), l'ADN des phages est isolé et purifié. Par digestion ($EcoRI$) trois fragments de taille différentes sont libérés: 3.0 kb (NRL), 1.7 kb (NRM) et 0.8 kb (NRS) (résultats non montrés). Par hybridation à l'aide des oligonucléotides S1 et S2 (voir plus haut), seulement les W21 et W22 donnent un signal positif au niveau du fragment NRS (voir Figure 2). Les autres signaux correspondent à un signal aspécifique sur l'ADN phagique. Le W22 est utilisé pour la suite du travail: analyse et séquençage de l'insert.

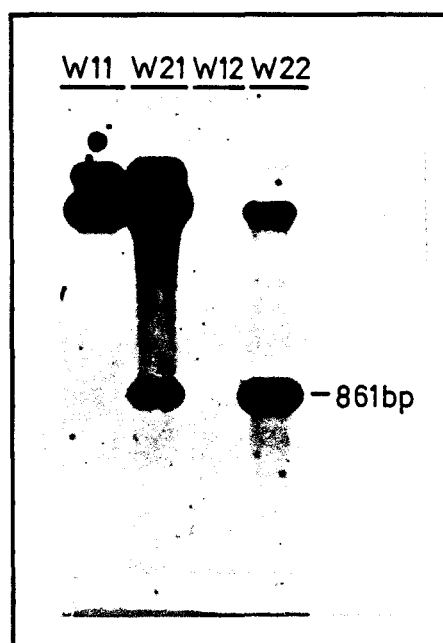


Figure 2: Hybridation avec les sondes S1 et S2 sur les phages purifiés et digérés par $EcoRI$.

La bande de 0.8 kb, nommé NRS, est isolée, purifiée et clonée dans un plasmide. Pour le NRL et le NRM, nous avons procédé à des sous-clonages afin de faciliter l'analyse. Tous les sous-clones ont été contrôlés et séquencés selon Sanger (1981).

Seul le NRS nous a donné une séquence homologue aux gènes NR clonés (Figure 3). Cette séquence est représentée ci-dessous (en nucléotides ainsi qu'en acides aminés):

ACC AGA AGC GTA GCC CTA ATC CCT AAA GAA ATT GCT CCG ACA AGA CGT GAA AAG ATC CCA
 T R S V A L I P K E I A P T R R E K I P
TGT AAA CTT ATC TCC AAA ACA TCG GTT TCT CAT GAC GTG AGG CTA TTC AGG TTC GCT CTC
 C K L I S K T S V S H D V R L F R F A L
CCA TCA CCG GAT CAA GTT CTT GGG TTA CCA GTA GGG AAA CAC GTC TTT GTA TGT GCC ACC
P S P D Q V L G L P V G K H V F V C A T
ATT GAC GAT AAG CTA TGC ATG AGG GCA TAC ACA CCA ACG AGC ACC ATT GAT GAA GTC GGG
 I D D K L C M R A Y T P T S T I D E V G
TAC TTT GAG TTG CTT GTC AAA ATC TAC TTC AAA GGC GTG GAA CCC AAG TTT CCG AAT GGA
 Y F E L L V K I Y F K G V E P K F P N G
GGG CTC ATG TCG CAA CAT CTG GAG TCA ATG GAA CTT GGC TCT TCA ATT GAA ATC AAA GGT
 G L M S Q H L E S M E L G S S I E I K G
CCT TTG GGC CAC ATC GAG TAC ATG GGC AGG GGG ACG TTT TCG GTG CAT GGT AAA CAA AAG
 P L G H I E Y M G R G T F S V H G K Q K
TTT GCC AGG AAG TTA GCC ATG TTT GCA GGT GGG ACG GGT ATC ACT CCG GAT CTA TCA AGT
 F A R K L A M F A G G T G I T P D L S S
GAT GCA AGC TAT TTA AAG GAT CCG GAA GAT GAT ACA GAG ATG TAT GTG GTG TAT GCA AAT
 D A S Y L K D P E D D T E M Y V V Y A N
CGT ACC GAA GAT GAT ATA TTG TTG AGG GAA GAA CTT GAT GCA TGG GCA GAC AAG TAT TCG
 R T E D D I L L R E E L D A W A D K Y S
GAC AGG GTG AAG GTA TGG TAT GTT GTT GCC AAG TCC ATA AGA GAA GGG TGG AAA TAC AGT
 D R V K V W Y V V A K S I R E G W K Y S
GAA GGT TTC ATC ACG GAG GAT ATT ATG AGG CCC GAA CAT GTA CCG GAG GTC TCT GAA GAT
 E G F I T E D I M R E H V P E V S E D T
ACA TTG GCT TTG GCT TGT GGA CCA CCA ATG ATT CAG TTC GCA ATC AAC CCT AAT TTA GAA
 L A L A C G P P P M I Q F A I N P N L E
AAG ATG GGG TAT GAT ATC AAG
 K M G Y D I K

Figure3: Séquence nucléotidique de l'ADNc et sa traduction en acides aminés (les séquences correspondantes aux deux oligos S1 et S2 sont encadrées)

Par comparaison avec des séquences du clone NRS (0.78 kb) et des séquences de riz et du tabac, il apparaît que cet insert correspond à l'extrémité 3' du gène et par conséquent au domaine flavinique. Cette séquence paraît être bien conservée puisque par alignement nous obtenons 79% d'homologie avec la séquence en acides aminés correspondant au gène *nial* de tabac et 68% avec celle de *Oryza sativa*.

Que nous n'ayons pas repêché des inserts du domaine molybdique et de la région N-terminale n'est pas pour nous étonner. En effet les oligonucléotides que nous avons utilisés comme sondes correspondent tous deux au domaine flavinique. Au moment où nous avons fait synthétiser ces sondes, les séquences complètes des ADNc NR n'étaient pas connues. N'étaient publiées que celles de l'orge (Cheng *et al.*, 1986) et du tabac

(Calza *et al.*, 1987). De plus les régions 5' (partie N-terminale) ne montrent que très peu d'homologie entre elles.

Concernant la construction de la banque d'ADNc, 75 % des phages sont recombinants et 3×10^6 des phages récombinants sont obtenus par μg d'ARN poly(A)⁺ ce qui est tout à fait satisfaisant.

Nous n'avons pas repêché l'ADNc 'full length', néanmoins le clone NRs représente un outil moléculaire nous permettant de continuer notre étude sur la régulation du gène de la NR chez la chicorée de Bruxelles.

ÉTUDE DE L'EXPRESSION DU GÈNE *NIA*
DANS LA JEUNE PLANTULE DE CHICORÉE

I. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DU GÈNE *NIA* DANS LA JEUNE PLANTULE

1. L'INDUCTION PAR LE NITRATE

La première étape dans la caractérisation de la nitrate réductase est d'étudier son inductibilité par le nitrate au niveau enzymatique et transcriptionnel. A cet effet nous avons mis des graines à germer sur un milieu MS, modifié par le remplacement équimolaire du nitrate par l'ammonium; notamment par $0,804 \text{ g l}^{-1}$ de NH_4Cl . Après 10 jours de culture les plantules sont repiquées sur un milieu MS contenant 5 mM de nitrate. Les mesures d'activités NR (*in vivo*) et l'extraction des ARN totaux s'effectuent 0, 0.5, 1, 2, 4 et 8 h après leur repiquage. Concernant les activités NR *in vivo* (figure 1), nous remarquons une induction par le nitrate après 30 minutes dans les racines. Par contre l'activité dans les feuilles n'est pratiquement pas induite par l'addition du nitrate.

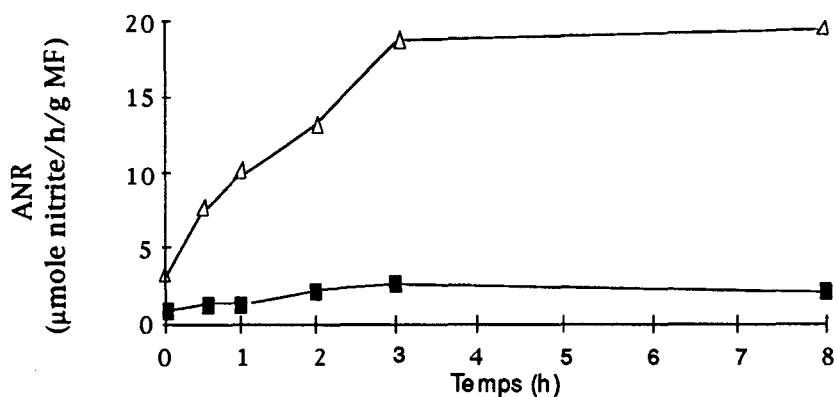


Figure 1: Etude cinétique sur l'activité NR *in vivo* dans les feuilles (■) et dans les racines (Δ).

Afin de vérifier si le nitrate induit la transcription du gène *nia*, nous avons procédé à une hybridation de la sonde NRS sur les ARN totaux extraits des racines après 0, 0.5, 1, 2, 4, et 8h de culture en présence de nitrate (figure 2).

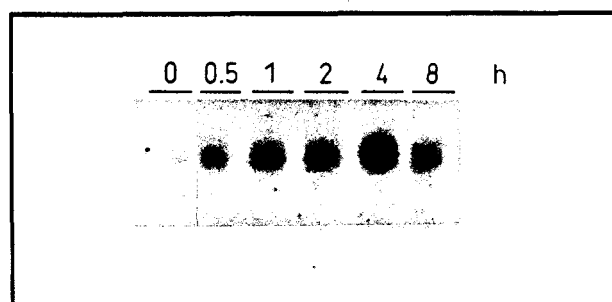


Figure 2: Autoradiographie de l'hybridation des ARN totaux extraits des racines après 0, 0.5, 1, 2, 4 et 8 h de culture en présence de 5 mM de nitrate. La sonde marquée correspond à l'ADNc de la NR de la chicorée.

Le nitrate induit le gène *nia* au niveau transcriptionnel comme nous l'indique la figure 2. Ainsi, l'augmentation de l'activité NR dans les plantules mises en contact avec le nitrate montre que celle-ci correspond à une synthèse *de novo* de la protéine comme chez la plupart des espèces (Somers *et al.*, 1983; Remmler et Campbell, 1986). Il est aussi intéressant de noter que même en absence de nitrate il existe une activité ainsi qu'une expression faible, probablement constitutive. Cette activité nitrate réductase constitutive et l'expression constitutive du gène *nia* sont retrouvées chez quelques espèces (pour revue, voir Solomonson et Barber, 1990 et Kleinhofs et Warner, 1990).

Après 30 minutes de contact avec le nitrate, la synthèse des ARNm est induite. On remarque un pic d'activité après 4h puis une diminution d'activité après 8 heures. La régulation du gène *nia* par le nitrate seul n'est pas encore totalement élucidée. Récemment Lin *et al.* (1994) ont pu déterminer deux régions situées à la proximité 5' du gène *nia* responsables de l'induction transcriptionnelle du gène par le nitrate.

2. EFFET DE LA CONCENTRATION DU NITRATE SUR LA RÉPARTITION SPATIALE DE L'ACTIVITÉ NR

Chez les non-légumineuses, la répartition de l'assimilation du nitrate varie selon l'âge du végétal et les concentrations de nitrate apporté. Chez la chicorée, selon l'âge de la plante la répartition de l'activité NR change: la racine montre une activité bien plus importante par rapport aux feuilles, comme nous l'indique la figure 1. Dès que la racine se met à tubériser, 6 à 8 semaines après la mise en germination, l'activité devient plus importante dans les feuilles (Dorchies et Rambour, 1985). Mis à part le facteur 'âge', le facteur 'concentration' en nitrate joue aussi un rôle important dans la répartition de l'activité entre la racine et les feuilles. Ainsi, quand la concentration du nitrate augmente, l'assimilation dans les feuilles devient plus importante (Andrews, 1986).

Aussi avons nous étudié l'effet de différentes concentrations en nitrate sur l'activité NR de jeunes plantules de chicorée, âgées de 2 semaines, c'est à dire avant que ne commence la tubérisation. Comme indiqué dans Matériel et Méthodes ces plantules sont d'abord cultivées sur un milieu ne contenant que du NH_4Cl comme seule source d'azote et ensuite elles sont transférées sur des milieux MS contenant différentes concentrations en nitrate: 0 mM, 0,2 mM, 5 mM, 20 mM et 50 mM. Après une incubation de 4h, correspondant au temps nécessaire pour obtenir une activité maximale (voir figure 1), les activités NR *in vivo* sont mesurées et les ARN totaux sont extraits.

Sur la figure 3, nous observons d'abord que la concentration en nitrate n'a aucune influence sur l'activité NR dans les feuilles. Par contre, les racines montrent une activité plus importante pour 5 mM de nitrate ($13,5 \mu\text{mole NO}_2^- / \text{h} / \text{g MF}$). Pour la concentration de 50 mM l'activité est pratiquement inhibée ($1,8 \mu\text{mole NO}_2^- / \text{h} / \text{g MF}$). Nous pouvons également noter qu'à 5 mM de nitrate, concentration pour laquelle l'ANR

est la plus importante dans les racines, l'activité dans les feuilles est plus faible (0,9 $\mu\text{mole NO}_2^- / \text{h} / \text{g MF}$) qu'en présence de 0,2 mM (1,8 $\mu\text{mole NO}_2^- / \text{h} / \text{g MF}$) ou de 20 mM (1,7 $\mu\text{mole NO}_2^- / \text{h} / \text{g MF}$).

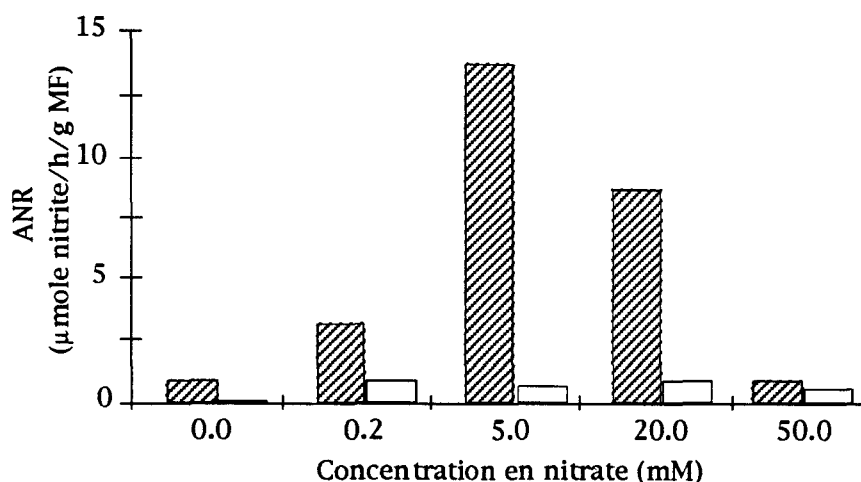


Figure 3: L'effet de la concentration du nitrate sur les ANR *in vivo* dans les feuilles (□) et les racines (▨).

L'hybridation moléculaire sur les ARN totaux a montré des résultats similaires aux profils d'activités (figure 4). Le taux d'ARNm nitrate réductase est maximal dans les racines de plantules en présence de 5 mM de nitrate. Nous pouvons aussi remarquer que la quantité de nitrate fournie ne modifie pratiquement pas le taux d'expression du gène *nia* dans les feuilles.

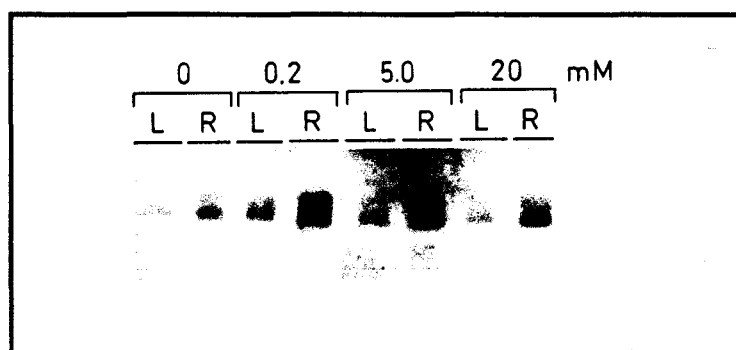


Figure 4: Northern blot d'ARN totaux issus de racines (R) et de feuilles (L) mises en culture à 0, 0.2, 5, 10 et 20 mM de nitrate, hybridés avec la sonde NRS.

3. ÉTUDE AU NIVEAU CELLULAIRE

3.1. Expression du gène *nia* dans la racine de la jeune plantule

Jusqu'à présent peu d'études ont été réalisées sur le site d'expression du gène *nia* dans les plantes supérieures et en plus particulier sur des plantes où la racine est le lieu

principal de l'assimilation du nitrate. Un seul rapport utilisant la technique du 'tissue printing' a montré la présence d'ARNm NR à 1-2 cm au dessus de l'apex racinaire chez le maïs (Long *et al.*, 1992). Plusieurs études ont déjà été menées sur l'immunolocalisation de la protéine nitrate réductase au niveau cellulaire mais n'ont jamais abouti à un résultat concluant (Kamachi *et al.*, 1987; Rufty *et al.*, 1986; Vaughn et Campbell, 1988). Plus récemment Fedorova *et al.* (1994) ont localisé la protéine nitrate réductase dans les racines de maïs. Rufty *et al.* (1986) ont montré que la répartition de certains ions absorbés par les racines n'est pas homogène dans cet organe. A faible concentration de nitrate (200 μ M), la protéine NR est détectée dans l'épiderme, tandis qu'à forte concentration (20 mM) la protéine est aussi retrouvée dans les cellules du cortex. Cette étude a été réalisée sur le maïs, où l'activité NR principale se situe dans les feuilles. Dans notre cas particulier nous avons essayé de localiser l'expression du gène *nia* dans la racine.

Nous avons choisi l'hybridation *in situ* car cette technique permet d'utiliser des tissus intacts qui sont immédiatement fixés afin de préserver la morphologie et l'état physiologique de la plante. Ainsi, des plantules mises en culture en présence de 0,2 mM et en présence de 5 mM de nitrate ont été fixées et soumises à une hybridation avec la sonde NR de chicorée. Des coupes semi-fines ainsi que des racines entières sont utilisées pour l'hybridation *in situ*. La sonde utilisée est une sonde d'ARN synthétisée à partir de l'ADNc cloné dans un plasmide pGEM7Z. A l'aide des promoteurs T7 ou SP6, il nous a été possible de synthétiser les sondes ARN antisens (AS) et ARN sens (S) séparément. La sonde S a été utilisée comme contrôle négatif ainsi qu'une sonde AS synthétisée à partir d'un clone codant pour la néomycine phosphotransférase (NPTII, gène bactérien). Ces deux sondes sont sensées ne présenter aucune hybridation.

La révélation de l'activité alcaline phosphatase se fait par l'addition du NBT et du BCIP (voir Matériel & Méthodes) et résulte en l'apparition d'une coloration bleue sur fond blanc, ou bien par une coloration rougeâtre sur fond noir.

En présence de 5 mM de nitrate (Figure 5) nous remarquons une très forte expression dans le système vasculaire (v), ainsi que dans l'apex racinaire (a) (figure 5C et E). Dans la région basale de la racine, l'expression devient moins importante dans le système vasculaire et se développe légèrement dans les cellules du cortex. Dans les racines secondaires (rs), l'activité se situe aussi principalement dans la stèle (v) (figure 5D et F). Dans les cellules du cortex (c) et dans l'épiderme (e), l'activité est faible ou totalement indétectable (5C, D, E et F).

Par contre, à de faibles concentrations de nitrate (200 μ M) (Figure 6), l'expression est moins importante; ceci confirme les résultats obtenus par hybridation sur les ARN totaux. Dans la racine principale l'activité est plutôt localisée dans les cellules du cortex (c), mais aussi dans l'apex racinaire (a) (figure 6C et 6E). Les racines secondaires

(rs) (figure 6D et 6F) montrent une expression homogène du gène *nia*. Ainsi, l'expression dans le système vasculaire (v) n'est pas plus importante que dans le cortex. Des contrôles négatifs utilisant la sonde sens (S) et la sonde NPTII n'ont révélé aucun signal après la révélation de l'activité alcaline phosphatase (Figure 5A, 5B et 6A, 6B).

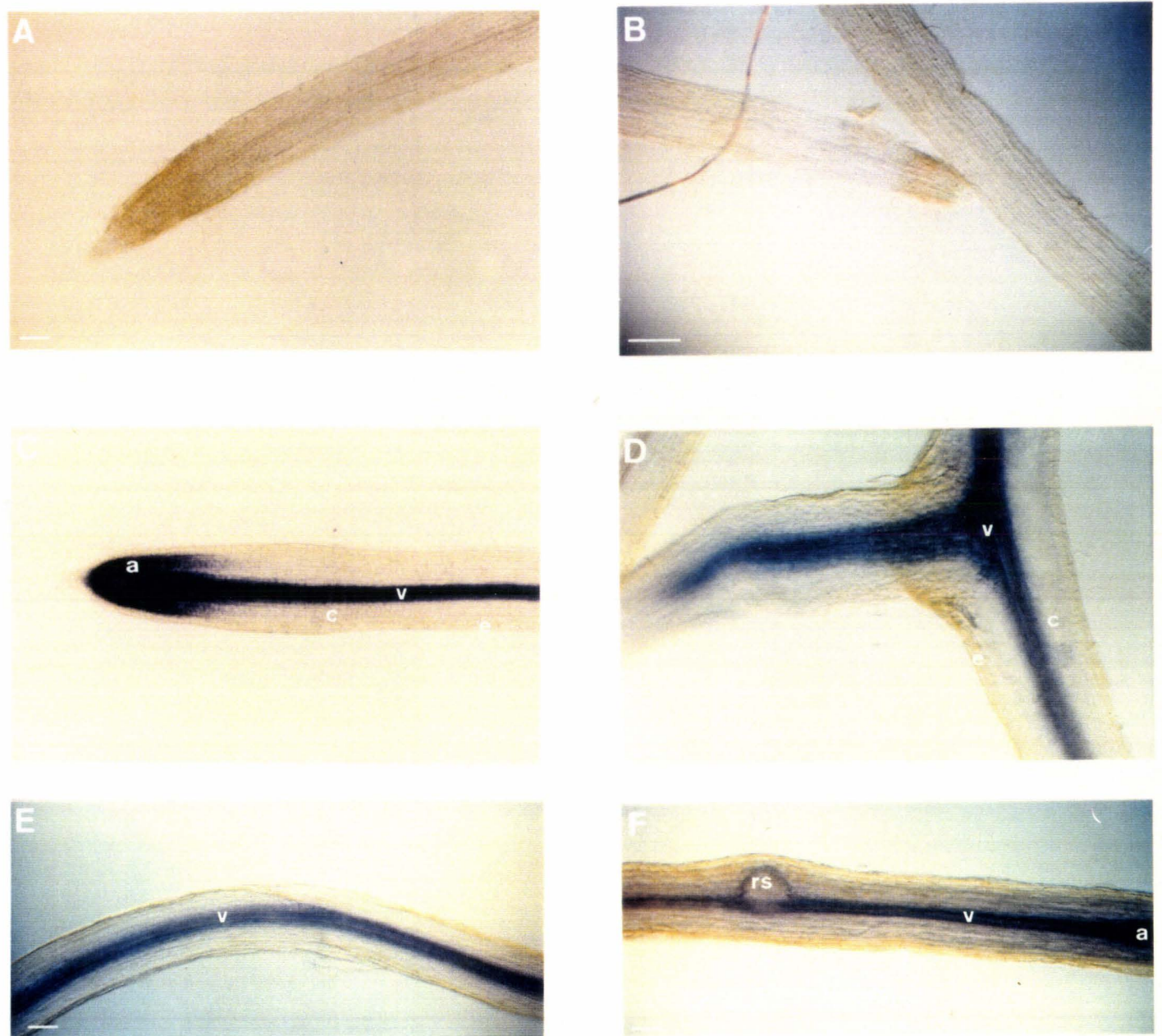


Figure 5: Hybridation *in situ* en 'whole mount' sur des jeunes plantules de chicorée mises en culture en présence de 5 mM de nitrate. Photos 5A et 5B nous montrent les contrôles par l'utilisation des sondes Neomycine et sens (voir texte). Les hybridations avec la sonde antisense NR sont présentées par les photos 5C, 5E et 5F (racines primaires) et la photo 5D (racine secondaire). Nous remarquons une expression du gène *nia* principalement dans l'apex et dans le système vasculaire (v) de la racine. (barre = 1 mm).

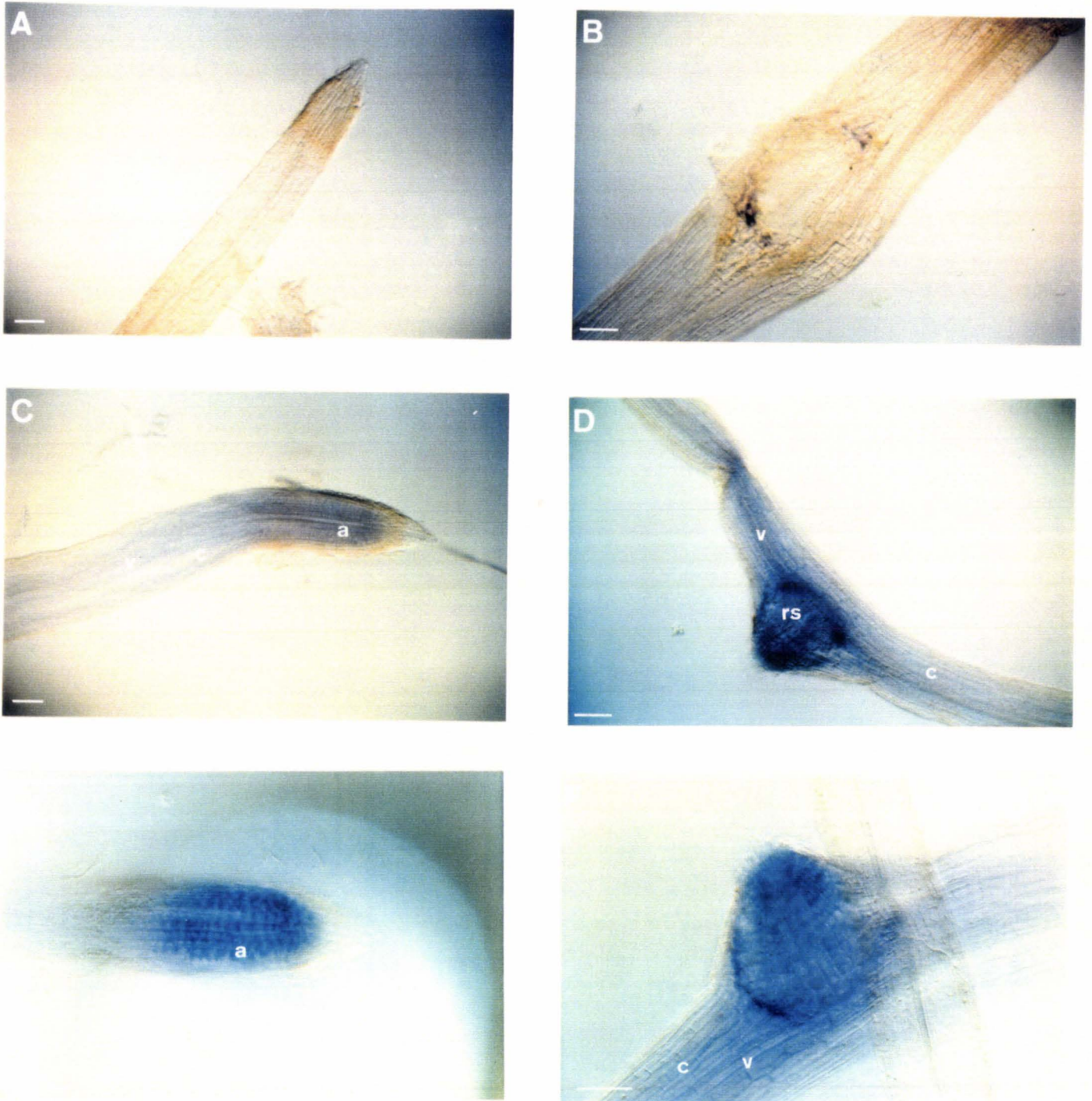


Figure 6: Hybridation *in situ* en 'whole mount' sur des racines de jeunes plantules de chicorée mises en culture en présence de 0,2 mM de nitrate. Photo 6A et 6B nous montrent les contrôles par l'utilisation des sondes Neomycine et sens (voir texte). Les hybridations avec la sonde antisense NR sont présentées par les photos 6C et 6E (racines primaires), 6D et 6F (racine secondaire). (barre = 1 mm).

Ces résultats d'hybridation *in situ* nous indiquent clairement que dans la racine de jeunes plantules de chicorée il existe une régulation spatiale du gène *nia* selon la dose de nitrate fournie à la racine. En résumé, comme nous l'indique la figure 7, l'expression du gène *nia* se situe principalement dans les tissus vasculaires des racines mises en culture en présence de 5 mM de nitrate, tandis que le gène *nia* est exprimé d'un manière plus homogène dans le parenchyme des racines mises en culture en présence de 0,2 mM de nitrate.



Figure 7: Comparaison de la localisation de l'expression du gène *nia* par une hybridation *in situ* en 'whole mount' sur des racines de jeunes plantules de chicorée. De gauche à droite nous remarquons une racine mise en culture en présence de 5 mM de nitrate puis une racine en présence de 0,2 mM de nitrate, hybridées avec la sonde antisens *nia*, suivie par le témoin hybridé avec la sonde sens *nia*. (L'accumulation d'ARNm NR se traduit par une coloration rougeâtre).

Dans l'apex racinaire nous remarquons que le gène *nia* s'exprime d'une façon très importante (figure 7).

Nous avons voulu vérifier si cette forte expression correspondait à une activité nitrate réductase aussi importante. Pour cela nous avons analysé des plantules de 2 semaines mises en culture sur un milieu MS à 5 mM de nitrate. L'activité NR *in vivo* a été mesurée d'une part dans les 5 premiers mm de l'apex racinaire et d'autre part dans le reste de la racine (± 5 cm). Cette étude nous montre que l'ANR de l'apex racinaire contribue pour 40 % de l'activité totale (Figure 8).

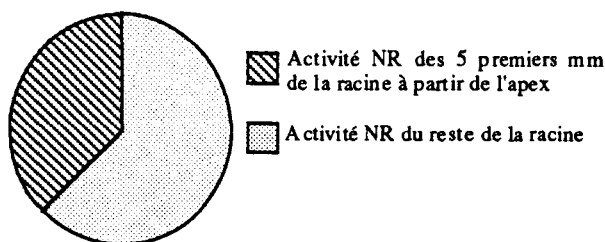


Figure 8: Répartition de l'ANR dans la racine d'une jeune plantule de chicorée

Nous pouvons donc conclure que le nitrate est réduit pour la plus grande partie dans l'apex racinaire, là où la demande en acides aminés est la plus grande et donc là où le métabolisme, la croissance et les divisions cellulaires sont les plus élevés.

3.2. Localisation de l'expression du gène *nia* par l'hybridation *in situ*

Afin de confirmer et de préciser la localisation de l'expression du gène *nia* nous avons procédé à des hybridations *in situ* sur des coupes semi-fines.

A 5 mM de nitrate l'expression NR est retrouvée principalement dans l'apex racinaire, comme nous le montre la figure 9F et 9H d'une coupe longitudinale au niveau de l'apex. La stèle de la racine et plus particulièrement les cellules de l'endoderme et du phloème montrent également une expression importante (figure 9C, 9E, 9G).

A 200 μ M nous remarquons également une coloration dans les cellules du cortex (figure 9B et 9I), confirmant ainsi les résultats obtenus par l'hybridation 'whole mount'.

Des contrôles négatifs utilisant les sondes sens *nia* et NPTII n'ont donné aucune coloration (figure 9A).

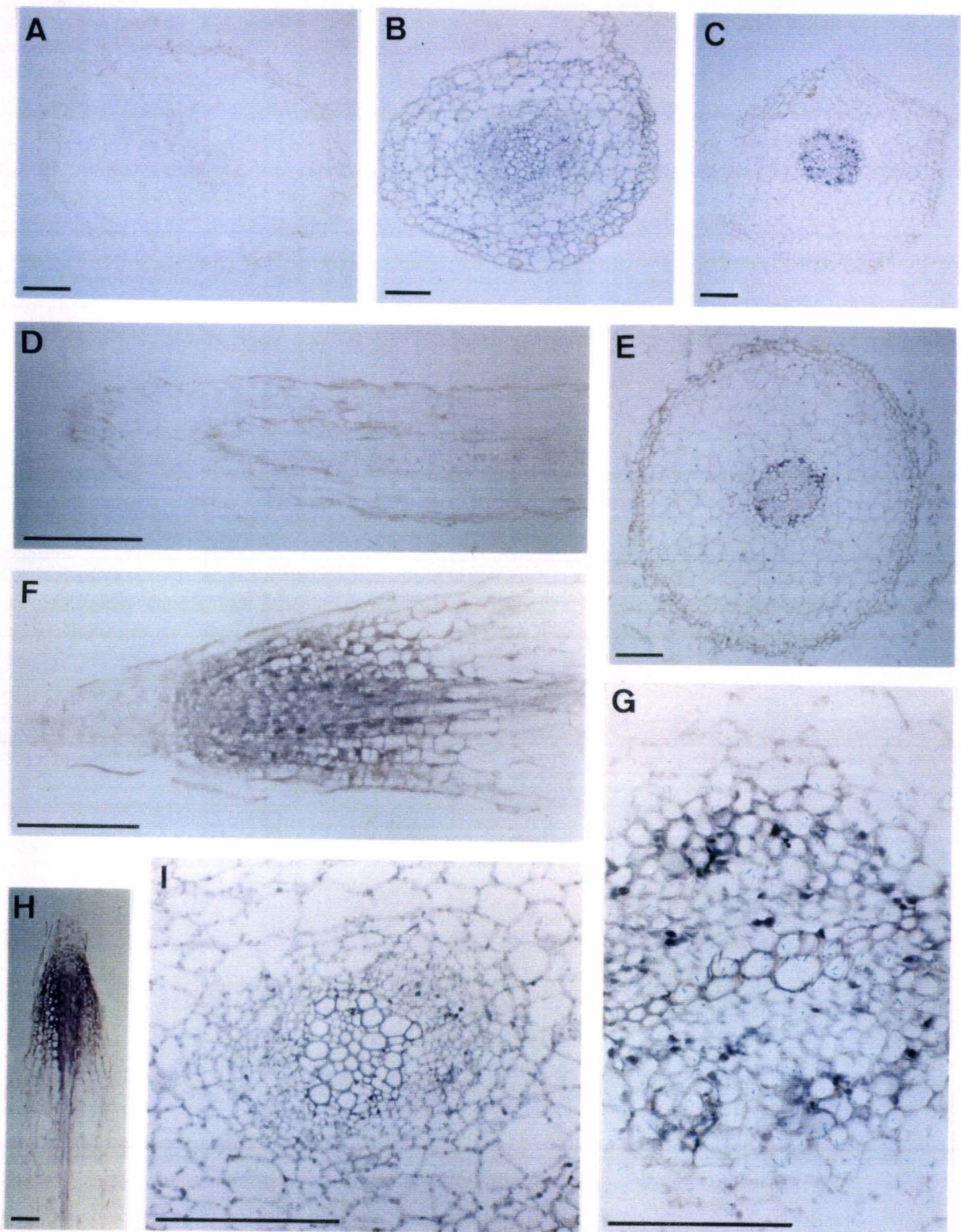


Figure 9: Hybridation *in situ* avec la sonde ARN NR antisens sur des coupes en méthacrylate semi-fines issues de racines de jeunes plantules mises en culture en présence de 5 mM (9C, E, F, G, H) ou en présence de 0,2 mM de nitrate (9B et I). Contrôles (sondes sens) 9A et 9D. (barre = 100 μ m).

3.3. Conclusion

Chez la chicorée le gène *nia* s'exprime différemment dans la racine selon la concentration du nitrate présent dans le milieu. A haute concentration le gène s'exprime principalement dans la stèle tandis qu'à faible concentration l'expression est localisée dans pratiquement toute la racine. Les résultats peuvent s'expliquer en termes de flux de nitrate, mais aussi en termes d'apport d'énergie nécessaire à la réduction du nitrate en ammonium. Le saccharose étant la forme la plus commune du transport des sucres, il apporte cette énergie par le phloème. Après hydrolyse, il libère du fructose et du glucose qui, métabolisés, permettent la production de NADH et d'ATP (voir discussion).

**ÉTUDE DE LA NITRATE RÉDUCTASE ET
DU MÉTABOLISME CARBONÉ
DANS LES SUSPENSIONS CELLULAIRES
EN PRÉSENCE D'ABA**

II. ÉTUDE DE LA NITRATE RÉDUCTASE ET DU MÉTABOLISME CARBONÉ DANS LES SUSPENSIONS CELLULAIRES EN PRÉSENCE D'ABA

1. INTRODUCTION DU PROBLÈME

Des travaux effectués au laboratoire ont montré que l'inhibition de croissance de suspensions cellulaires par l'acide abscissique (10^{-4} M) était curieusement accompagnée d'une augmentation de l'activité NR mesurée *in vivo* et *in vitro* (Chraïbi, 1988). D'autres observations fortuites ont montré que le ralentissement de la croissance des suspensions cellulaires de Silène et de Carotte, s'accompagnait d'une hausse de l'activité nitrate réductase (Rambour, 1986; Rambaud, 1986). Ces résultats sont surprenants dans la mesure où la nitrate réductase doit être active dans des jeunes tissus possédant un métabolisme élevé (Blahova et Segeta, 1980; Ngambi *et al.*, 1981; Dorchie et Rambour, 1985). Ce phénomène contradictoire a dû être étudié plus au détail. L'assimilation du nitrate exige un apport d'énergie et de pouvoir réducteur important qui peuvent provenir du catabolisme des sucres et c'est pourquoi il est nécessaire de comprendre où et comment l'ABA intervient dans le métabolisme azoté et la relation avec le métabolisme carboné.

En collaboration avec N. Druart, nous avons suivi l'évolution de l'expression de la nitrate réductase en liaison avec le métabolisme carboné. Pour cela nous avons mesuré les activités de la NR ainsi que celles de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme du saccharose dans des suspensions cellulaires de la chicorée de Bruxelles. Nous avons également utilisé les sondes d'ADNc de la NR et invertase, afin de voir si cette augmentation par l'ABA pouvait être liée ou non à une modification de l'activité transcriptionnelle du gène *nia* et/ou invertase.

1.1. Action de l'acide abscissique sur la croissance cellulaire

Les cellules sont prélevées en phase stationnaire (11^{ème} jour) de culture et transférées dans un milieu neuf en présence ou non d'ABA (10^{-4} M). Pendant une durée de 9 jours, la croissance cellulaire est évaluée par la mesure du poids de matière fraîche (MF) produit. Dès le deuxième jour, nous remarquons déjà une inhibition de 10% de la croissance en présence d'ABA (figure 10). Cette inhibition se poursuit pendant la phase de croissance exponentielle et atteint 36% d'inhibition le neuvième jour (12,63 g de MF pour le témoin comparé à 8,13 g de MF pour l'ABA). La variation de la matière sèche suit le même profil que la matière fraîche (résultats non montrés).

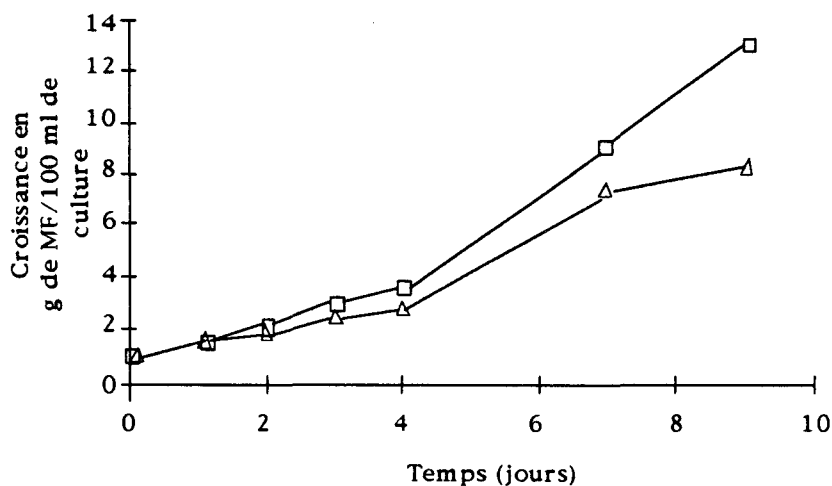


Figure 10: Mesure de la croissance des cultures cellulaires de chicorée en présence (Δ) ou en absence (□) d'ABA.

Dans nos études de cinétiques d'activité NR nous n'avons jamais excédé 7 jours de culture. La phase stationnaire n'a donc jamais été atteinte durant nos expériences. Ces observations ont mis en évidence l'un des rôles majeurs de l'acide abscissique observé chez la tomate (Takahashi *et al.*, 1993) à savoir un effet retardateur de croissance.

1.2. L'effet de l'ABA sur l'activité nitrate réductase

1.2.1. L'activité NR *in vivo*

Les activités NR sont mesurées aux jours 0, 1, 3, 5 et 7 (figure 11). L'activité NR ne devient importante qu'à partir du troisième jour, où elle atteint un maximum (0,832 $\mu\text{mole NO}_2^-/\text{min/g MF}$).

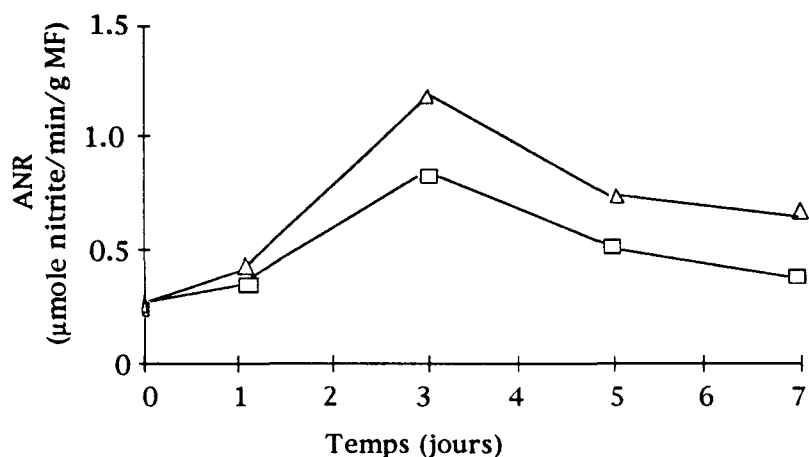


Figure 11: Activité NR *in vivo* dans les cultures cellulaires de chicorée en présence (Δ) et en absence (□) d'ABA.

L'addition d'ABA à 10^{-4} M a un effet d'activation ($1,182 \mu\text{mole NO}_2^-/\text{min/g MF}$), c'est à dire une augmentation d'activité de 42 % par rapport au témoin. Cette différence d'activité se maintient durant les jours suivants.

1.2.2. L'activité NR *in vitro*

Les mesures des activités NR *in vitro* sont faites aux jours 0, 2, 3 et 4 (figure 12). Un pic d'activité est observé le troisième jour pour les deux conditions. En présence d'ABA, l'activité NR reste globalement plus importante ($216 \text{ nmole NO}_2^-/\text{min/mg prot}$ pour le témoin et $281 \text{ nmole NO}_2^-/\text{min/mg prot}$ pour la condition ABA au jour 3) tout au long de la cinétique.

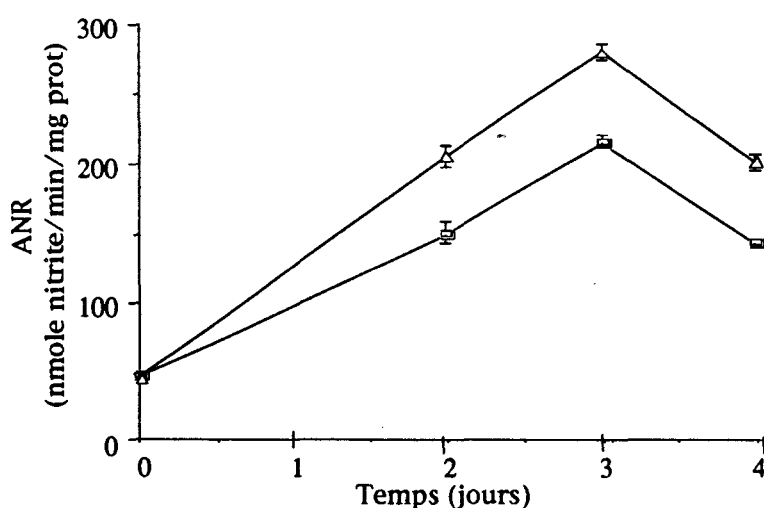


Figure 12: Activité NR *in vitro* dans les cultures cellulaires de chicorée en présence [Δ] et en absence [□] d'ABA

1.2.3. Conclusion

Des résultats similaires ont été obtenus pour les dosages *in vivo* et *in vitro* de l'activité NR. Il est clair que l'ABA augmente l'activité NR de ± 35 %, mais paradoxalement l'ABA a un rôle inhibiteur sur la croissance cellulaire ce qui confirme les résultats de Chraïbi (1988). Il nous reste à comprendre comment l'ABA influence l'activité NR.

1.3. Effet de l'ABA sur la transcription du gène *nia*

Afin d'étudier si l'effet de l'ABA sur le gène NR se situe au niveau transcriptionnel, nous avons procédé à l'extraction des ARN totaux de cellules en présence ou non d'ABA aux jours 0, 1, 3 et 6 de la culture. L'hybridation Northern avec la sonde NRS n'a montré aucune fluctuation significative quel que soit le jour du

prélèvement (prélèvements effectués toujours à la même heure) (Figure 13) par comparaison avec la figure 14.

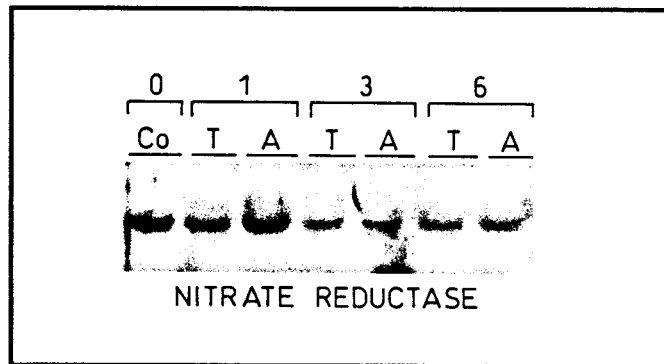


Figure 13: Hybridation avec la sonde $[^{32}\text{P}]$ -ADNc NRS sur les ARN totaux issus de cellules en présence ou non d'ABA aux jours 0, 1, 3 et 6.

Le taux d'hybridation a été comparé avec celui obtenu avec la même membrane et une sonde tubuline (figure 14).

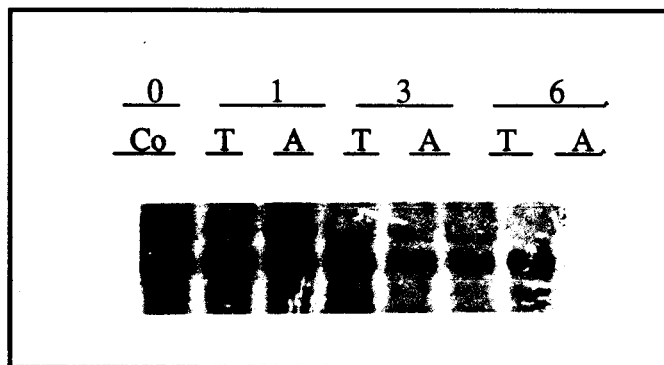


Figure 14: Hybridation avec la sonde $[^{32}\text{P}]$ -ADNc tubuline sur les ARN totaux issus de cellules en présence ou non d'ABA aux jours 0, 1, 3 et 6.

Un effet transcriptionnel de l'ABA sur certains gènes a déjà été largement montré dans la littérature (Muthukrishnan *et al.*, 1983; Galau *et al.*, 1986; Gomez *et al.*, 1988; Gultinan *et al.*, 1990; Mundy *et al.*, 1990). Dans notre cas aucun effet de l'ABA n'est observé sur l'activité transcriptionnelle du gène *nia* ; il semble donc que l'ABA n'exerce aucun effet sur la transcription du gène *nia* de la chicorée. Cependant on ne peut pas exclure que l'ABA modifie le turnover des ARNm NR. Un tel mécanisme de régulation peut être montré par des expériences run-off.

L'ABA pourrait également avoir un effet indirect sur les modifications de l'activité nitrate réductase et ceci au niveau post-transcriptionnel, ou post-traductionnel (voir discussion).

1.4. Effet de l'ABA sur l'activité de l'invertase acide (INV)

Les suspensions cellulaires utilisées proviennent de cultures racinaires. Les cellules blanches ne pouvant pas faire de photosynthèse sont approvisionnées en saccharose dans le milieu de culture. Le sucre est hydrolysé par l'action des invertases acides. L'activité de cette enzyme a été suivie durant 6 jours sur les cultures cellulaires supplémentées ou non en ABA 10^{-4} M (Figure 15).

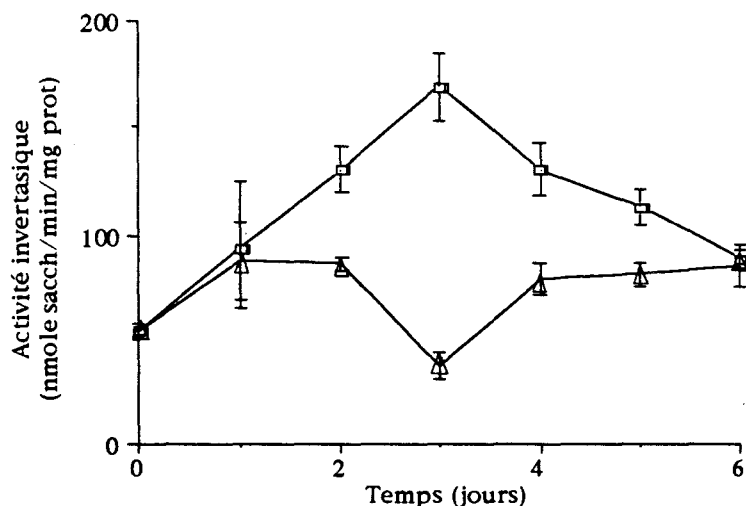


Figure 15: Effet de l'ABA sur l'activité invertasique acide après 0, 1, 2, 3, 4, 5 et 6 jours de culture en présence (Δ) et en absence (□) d'ABA.

Dans les cultures témoins nous observons tout d'abord une augmentation progressive de l'activité enzymatique qui atteint un pic au troisième jour (168,36 nmole saccharose/min/mg protéines) puis décline d'une façon régulière jusqu'au sixième jour.

La cinétique effectuée sur des cellules cultivées en présence d'ABA révèle un résultat opposé. En effet, même si l'activité augmente légèrement au premier jour (valeur presque similaire au témoin) et reste ensuite stationnaire au deuxième jour, elle diminue brusquement au troisième jour où l'inhibition est la plus importante (37,00 nmole saccharose/min/mg prot). Le pic d'activité maximale de la cinétique témoin (168,36 nmole saccharose/min/mg prot) est corrélé à cette inhibition maximale observée pour la cinétique effectuée en présence d'ABA. Au quatrième jour, l'activité invertasique augmente à nouveau, aussi rapidement qu'elle a chuté pour arriver à une légère stabilisation à partir du cinquième jour. Par ailleurs l'activité invertasique devient supérieure en condition ABA, à celle au témoin après le sixième jour (résultats non montrés). L'effet de l'ABA sur l'invertase a été analysé plus précisément au niveau transcriptionnel. Nous avons pour cela effectué des hybridations sur des ARN totaux de chicorée avec une sonde invertase (fournie par l'Institut de Recherche des Céréales à Dundee, G.B.). Comme nous l'indique la figure 16, aucune variation n'a été mise en

évidence entre la condition témoin et la condition ABA. Le taux d'hybridation a été comparé avec celui obtenu avec la même membrane et une sonde tubuline (figure 14).

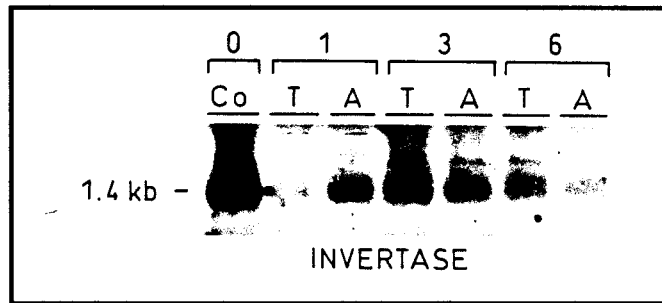


Figure 16: Hybridation avec une sonde invertase (au ^{32}P) sur les ARN totaux extraits de cellules en présence ou non d'ABA après 0, 1, 3, et 6 jours (Co= contrôle jour 0, T= témoin, A= ABA).

Ici encore il semble que l'ABA ne modifie pas la transcription du gène invertase, mais exercerait un effet indirect ou post-traductionnel sur l'enzyme (INV).

1.5. Effet de l'ABA sur l'activité Saccharose Synthase (SS)

Les dosages d'activité SS ont été effectués sur des cultures cellulaires supplémentées ou non en ABA aux jours 0, 2, 3, 5 et 6 (Figure 17).

Les deux cinétiques effectuées montrent une baisse de l'activité SS au jour 2. Cette baisse se maintient jusqu'au sixième jour pour les cellules supplémentées en ABA 10^{-4} M, jour pour lequel l'activité SS n'est pratiquement plus décelable. Par contre concernant les cellules témoins, nous observons une légère augmentation de l'activité SS le troisième jour (activité maximale de 20,92 nmol de saccharose hydrolysé/min/mg prot), suivie d'une nouvelle baisse jusqu'au sixième jour.

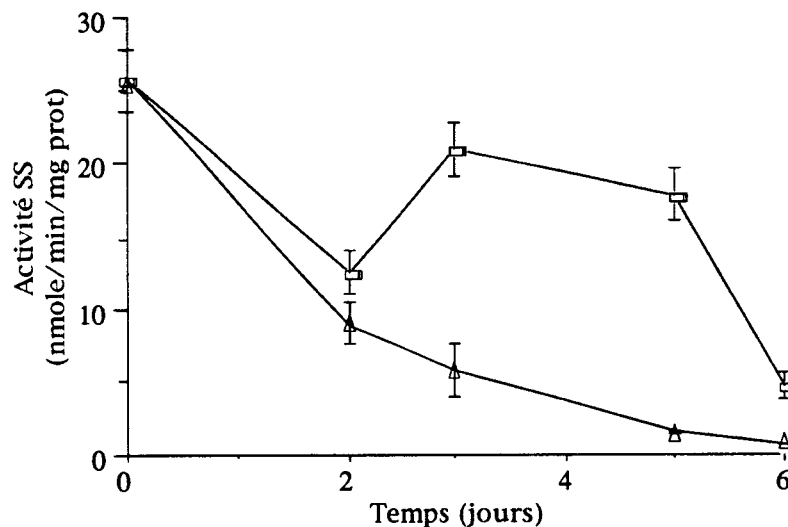


Figure 17: Cinétique de l'activité saccharose synthase dans les cellules témoins (□) et des cellules en condition d'ABA (Δ).

Il peut noter que l'activité SS reste faible comparée à l'activité de l'invertase, avec un maximum de ± 20 nmoles/min/g MF contre ± 200 nmoles/min/g MF pour l'invertase.

1.6. Effet de l'ABA sur l'activité Saccharose Phosphate Synthase (SPS)

Une cinétique a également été réalisée sur l'activité de la saccharose phosphate synthase (SPS). Dans les conditions témoins les activités SPS semblent suivre le même profil que l'activité invertase (Figure 18).

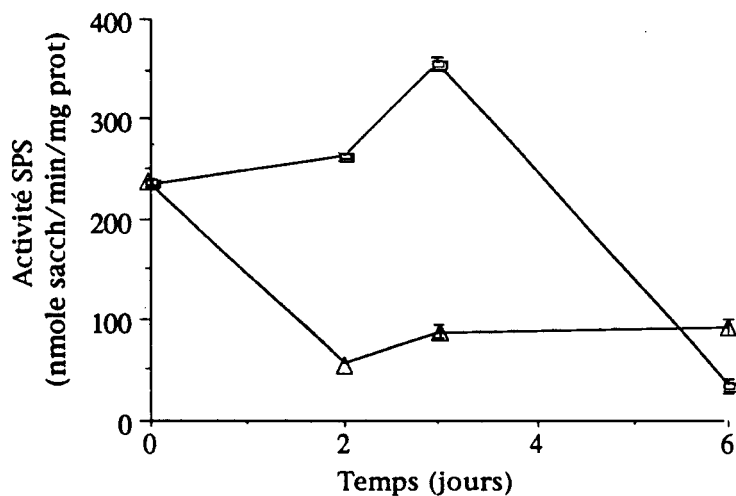


Figure 18: Cinétique de l'activité SPS sur des cultures cellulaires témoins (□) et des cellules mises en présence d'ABA (Δ).

En effet, une augmentation de l'activité est observée jusqu'au troisième jour avec un maximum d'activité correspondant à 356 nmol saccharose formés/min/mg prot. L'activité diminue ensuite jusqu'à n'être plus décelable à partir du sixième jour. En présence d'ABA, elle diminue fortement au deuxième jour, puis augmente légèrement jusqu'au sixième jour. L'inhibition maximale du jour 2 correspond à une activité de 55 nmol sacch. formés/min/mg prot. Il faut remarquer que l'inhibition de l'activité SPS par l'ABA s'exerce rapidement (dès le 2^{ème} jour). Les cellules témoins possèdent une activité est maximale au 3^{ème} jour de culture.

1.7. Conclusion

Lors des diverses analyses les profils d'activités enzymatiques des cellules cultivées en condition témoin sont généralement identiques. En effet, quelle que soit l'enzyme étudiée, l'activité augmente jusqu'au troisième jour puis décline.

Dans le cas des cinétiques effectuées en présence d'ABA, même si les mesures d'activité des différentes enzymes étudiées ne suivent pas toutes le même profil, nous avons malgré tout mis en évidence l'effet inhibiteur de l'ABA sur l'activité des enzymes du métabolisme du saccharose (voir discussion).

Il semble que l'ABA n'a aucun effet au niveau transcriptionnel sur l'expression des gènes invertase et nitrate réductase. L'ABA doit alors exercer ses effets à un niveau posttranscriptionnel et/ou post-traductionnel à moins qu'il n'ait un effet indirect sur l'activité de ces deux enzymes. En ce qui concerne la SS et la SPS, en absence de sondes spécifiques nous ne pouvons pas conclure sur l'effet de l'ABA sur la régulation des gènes codant pour ces deux enzymes.

2. ANALYSE DES GLUCIDES INTRA- ET EXTRA-CELLULAIRES

Afin de mieux comprendre comment les glucides ont évolué au cours des cinétiques des croissances de nos suspensions cellulaires, nous avons procédé à l'analyse des glucides intra- et extra-cellulaires.

L'analyse a porté sur 3 glucides particuliers représentant les intervenants principaux du métabolisme du saccharose et donc des activités enzymatiques INV, SS et SPS: le saccharose, le glucose et le fructose. Les dosages, effectués par HPLC, ont été réalisés sur des cellules dont les activités enzymatiques ont été mesurées en condition témoin et en condition ABA 10^{-4} M.

2.1. Caractérisation des glucides du milieu de culture

L'analyse des glucides présents dans les milieux de culture lors des repiquages a été effectuée après autoclavage afin de connaître précisément la quantité restante de saccharose ainsi que les quantités de sucres réducteurs apparus par dégradation abiotique.

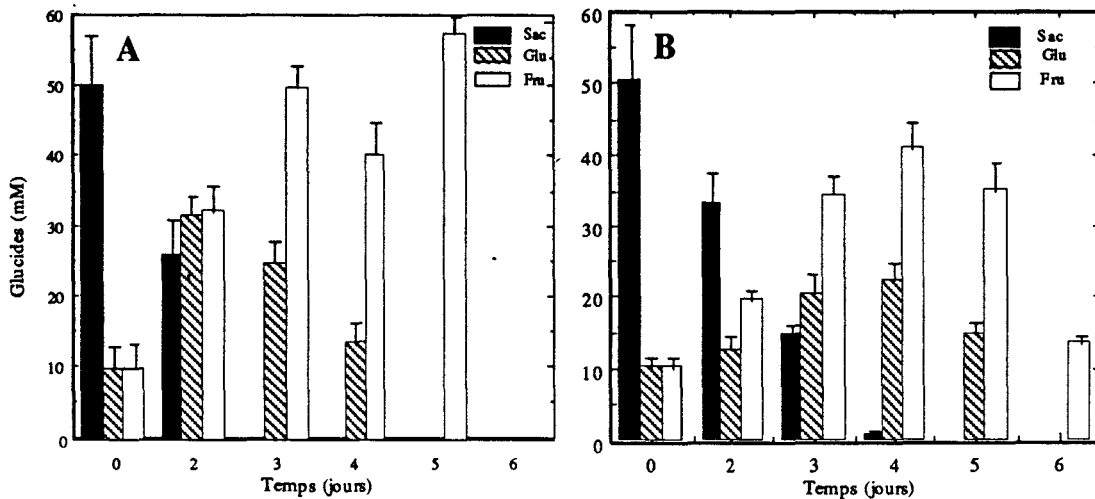


Figure 19: Evolution des glucides dans les milieux des cultures cellulaires en présence (B) ou non (A) d'ABA.

En début de culture, après autoclavage des milieux, les fioles (200 ml de milieu) contiennent 10,1 mmole de saccharose et 4,0 mmole de monosaccharides (glucose + fructose). Après l'initiation de la culture, le saccharose est converti en hexoses et est complètement épuisé après 3 jours de culture. Par contre 14,9 mmole de monosaccharides se sont accumulés transitoirement dans le milieu. Au jour 2, le glucose et le fructose sont en équilibre équimolaire. De ce fait l'absorption du glucose est favorisée ce qui résulte en une augmentation du rapport fructose/glucose jusqu'au jour 5

de la culture (figure 19A). Ces données indiquent clairement que le saccharose est hydrolysé dans le milieu en fructose et glucose et que le glucose est préférentiellement absorbé par les cellules.

Dans les milieux supplémentés en ABA 10^{-4} M (figure 19B) nous observons une hydrolyse du saccharose en monosaccharides où le glucose est préférentiellement absorbé par les cellules. Par ailleurs, l'hydrolyse du saccharose dans le milieu est plus lent que dans les milieux témoins; son épuisement ne se fait que le cinquième jour.

2.2. Caractérisation des glucides intracellulaires

Concernant les cellules témoins (figure 20A), la concentration en saccharose augmente en début de croissance atteignant un maximum de $54 \mu\text{mole/g MF}$ au jour 5, suivi par une diminution jusqu'à une concentration non-détectable au jour 7. La concentration en saccharose est égale à celle des hexoses les premiers jours de culture atteignant $30 \mu\text{moles/g MF}$ au jour 3. Ensuite la concentration en saccharose dépasse celle des hexoses. Du jour 1 au jour 3 la concentration en glucose et fructose augmente atteignant respectivement $27,0$ et $32,8 \mu\text{moles/g MF}$.

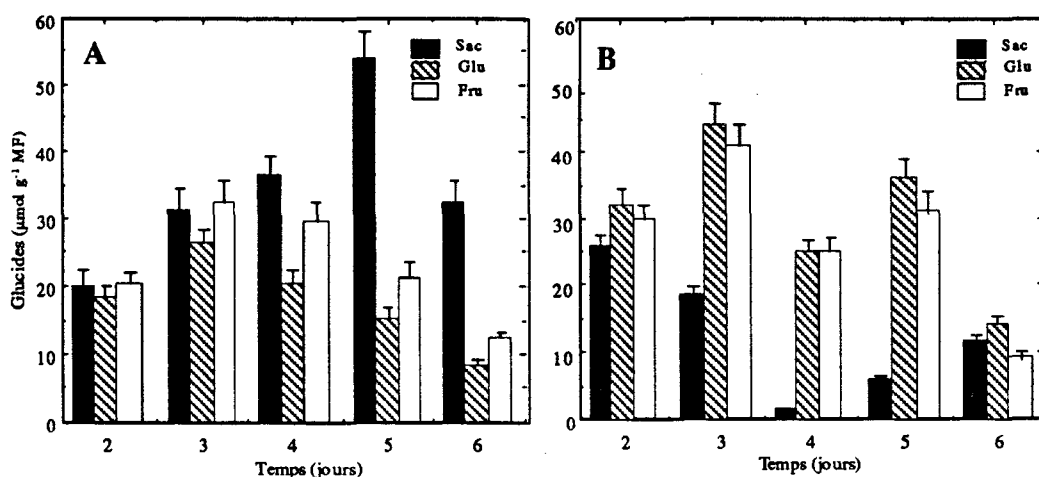


Figure 20: Evolution des glucides intra-cellulaires des cultures cellulaires en présence (B) ou non (A) d'ABA.

La comparaison quantitative et qualitative des sucres contenus dans les cellules traitées par l'ABA (figure 20B) et les cellules témoins indique une évolution différentielle des glucides au cours de la culture. En début de culture on observe une accumulation de glucides corrélée à une décroissance des teneurs en saccharose. Les concentrations de glucose et de fructose par contre sont plus élevées (figure 20B).

2.3. Conclusion

L'analyse des glucides intra- et extracellulaires semble montrer une corrélation entre leur présence et les activités enzymatiques mesurées dans les cellules cultivées en condition témoin: le troisième jour de culture semble être un moment important dans la modification des activités métaboliques. Le saccharose est ainsi métabolisé très rapidement par les cellules (disparition au troisième jour). Une comparaison de l'hydrolyse des glucides de la culture témoin (milieu et cellules) et de la culture traitée à l'ABA (milieu et cellules) entre le jour 0 et le jour 3 permet d'établir un bilan grossier de leur utilisation dans les deux conditions de culture.

Les données des dosages des glucides sont rassemblées dans le tableau suivant:

Jour de culture	Glucides	Témoin		ABA	
		M (mM)	C (μ M)	M (mM)	C (μ M)
0	S	10,1	n.d.	10,1	n.d.
	G + F	4	n.d.	4	n.d.
	Eq.monosacch.	24,2	n.d.	24,2	n.d.
2	S	5	20	7	25
	G + F	12	40	6	60
	Eq.monosacch.	22	80	20	110
3	S	0	30	3	16
	G + F	15	55	11	85
	Eq.monosacch.	15	115	17	117

Tableau 1: Teneurs en glucides (en mM) dans les milieux de culture (M) additioné ou non d'ABA. Teneurs en glucides dans les cellules (C) (en μ moles) (n.d. = non-déterminé; S = saccharose; G+F = glucose +fructose; Eq. monosacch. = équivalents de monosaccharides)

Considérant que par autoclavage qu'une partie du saccharose sera hydrolysé en Glc+Fru, au jour 0, les milieux de culture contiennent 10,1 mmoles de saccharose et 4 mmoles de Glc+Fru, soit l'équivalent de 24,2 mmoles de monosaccharides (tableau 1).

Dans les conditions témoins nous remarquons qu'au troisième jour le saccharose a été totalement hydrolysé et le milieu renferme 15 mmoles de monosaccharides. 9,1 mmoles d'équivalents monosaccharides ont donc été prélevées. Dans les conditions en présence d'ABA, le milieu contient après 3 jours de culture 3 mmoles de saccharose et 11 mmoles de Glc+Fru soit l'équivalent de 17 mmoles de monosaccharides. Donc 7,1 mmoles d'équivalents ont été utilisées (tableau 1).

Par conséquent, les cellules mises en présence d'ABA ont utilisé 22 % d'équivalents monosaccharides de moins que la culture témoin au troisième jour.

Si l'on compare la teneur en saccharose et en monosaccharides des cellules témoins et des cellules cultivées en présence d'ABA, au troisième jour nous obtenons les résultats suivants: un gramme de cellules témoins renferme 30 μ moles de saccharose et 55 μ moles de Glc+Fru, soit l'équivalent de 115 μ moles. Les cellules cultivées avec ABA renferment 16 μ moles de saccharose et 85 μ moles de Glc+Fru par gramme, soit l'équivalent de 117 μ moles. Or la diminution de croissance provoquée par l'ABA est d'environ 25 à 30 %. Autrement dit le bilan est identique après 3 jours de culture que les cellules aient été cultivées en présence ou en absence d'ABA.

Si l'on dresse le même bilan après 2 jours de culture on obtient les résultats suivants: le milieu de culture avec ABA renferme l'équivalent de 20 mmoles de monosaccharides (7 mmoles de saccharose et 6 mmoles de Glc+Fru). La culture a donc prélevé 4,2 mmoles de monosaccharides, soit approximativement 17 % de la quantité totale en monosaccharides, tandis que la culture témoin n'en a prélevé que 9 %. La teneur intracellulaire en équivalents de monosaccharides est de 110 μ moles (25 μ moles de saccharose + 60 μ moles de Glc+Fru) par gramme de cellules cultivées avec de l'ABA, tandis que pour les cellules témoins, la teneur en monosaccharides est de 80 μ moles. Comme l'inhibition de croissance de cellules cultivées avec de l'ABA n'est que d'environ 10 %, il apparaît donc que les cellules cultivées en présence d'ABA ont utilisé plus d'équivalents monosaccharidiques pendant les 48 premières heures de culture que les cellules témoins.

Dans ces conditions on peut émettre l'hypothèse que l'augmentation de l'activité NR qui culmine au 3^{ème} jour est en rapport avec les modifications du métabolisme du saccharose pendant les 2 premiers jours.

Les monosaccharides produits durant cette période ne seraient que partiellement utilisés pour la croissance cellulaire et seraient de ce fait disponibles pour fournir l'énergie et le pouvoir réducteur nécessaires à l'assimilation du nitrate.

De plus, cette étude permet de montrer que l'ABA ralentit l'hydrolyse du saccharose dans les milieux et plus légèrement dans les cellules et d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'ABA agit en inhibant les invertases pariétales acides des cellules de chicorée. Cela est d'ailleurs confirmé par les résultats obtenus lors des dosages de l'activité invertasique (pH 4,8) qui subit une inhibition maximale au troisième jour de culture.

3. ETUDE DES ÉTATS DE PHOSPHORYLATION ET DE DÉPHOSPHORYLATION

3.1. Etude de la protéine active NR

Si l'on admet que l'ajout d'ABA génère plus de monosaccharides et donc plus de sources potentielles d'ATP, on peut se demander si l'augmentation de l'ANR n'est pas due à des modifications d'un équilibre protéine phosphorylée-protéine déphosphorylée. En effet la réversibilité de la phosphorylation des protéines, les rendant actives ou inactives, est un aspect important de la régulation métabolique des plantes qui est le résultat de la transduction d'un signal externe en un changement biochimique interne. N'ayant pas observé d'effets de l'ABA sur l'activité transcriptionnelle du gène de la nitrate réductase ni sur l'activité transcriptionnelle du gène codant pour l'invertase, nous avons abordé l'aspect de la régulation post-traductionnelle de la NR et la SPS, précédemment décrite par Kaiser et Spill (1991) et Huber et Huber (1992 b) qui ont montré que le mécanisme de régulation de ces 2 enzymes était similaire pour la NR et la SPS.

Pour cela nous avons caractérisé les effets de la phosphorylation et déphosphorylation *in vitro* sur des extraits enzymatiques bruts. Après extraction et dessalage des protéines reprises dans un tampon Hepes contenant 5 mM de MgCl₂, l'addition d'un excès d'ATP (1 mM) provoque une baisse d'activité NR *in vitro* (Figure 21).

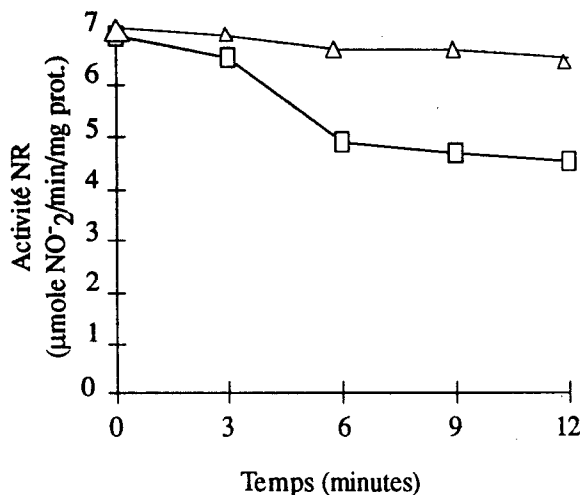


Figure 21: Inactivation de l'ANR *in vitro* par l'addition de 1 mM d'ATP à l'extrait dessalé (□) comparé au témoin sans ATP (Δ).

Cette perte d'activité indique qu'il existe une modification post-traductionnelle de la protéine NR *in vitro*. Ces résultats sont conformes à ceux déjà publiés (Kaiser et Spill, 1991; Huber *et al.*, 1992 a, b) où les auteurs ont montré que la protéine NR de l'épinard peut être modulée *in vitro* par l'addition de nucléotides triphosphates. Cette modulation

de l'activité peut s'expliquer par la présence d'enzymes secondaires, probablement des kinases, dans nos extraits bruts. Comme l'ont déjà proposé Kaiser et Spill (1991) nous pouvons supposer que la protéine est modifiée d'une façon covalente par une phosphorylation ou par une adénylation.

3.2. Etude de l'état de la protéine active SPS

Les expériences ont été réalisées sur des cultures cellulaires en présence ou non d'ABA: au jour 0 et au jour 2 de la culture, jour pour lequel l'inhibition hormonale de l'activité SPS par l'ABA est maximale.

Tout d'abord, nous avons voulu vérifier l'état de phosphorylation pour lequel la protéine est active. Pour cela, nous avons mis les extraits protéiques bruts des cellules témoins et traitées par de l'ABA en présence d'ATP durant 3, 8 et 12 minutes et nous avons mesuré l'activité de la saccharose phosphate synthase. Comme déjà décrit par Huber *et al.* (1989; 1991), nous remarquons une baisse de l'activité SPS en présence d'ATP (figure 22). La protéine à l'état déphosphorylé est active au temps zéro. L'addition d'ATP provoque sa phosphorylation par l'effet des kinases présentes dans l'extrait brut, ce qui la rend inactive. Cette phosphorylation est suivie par une déphosphorylation *in vitro* à l'aide de l'AMP. Celui-ci a été ajouté 12 minutes après l'addition de l'ATP et les mesures d'activité ont été effectuées 4 et 8 minutes plus tard (Figure 22 et 23).

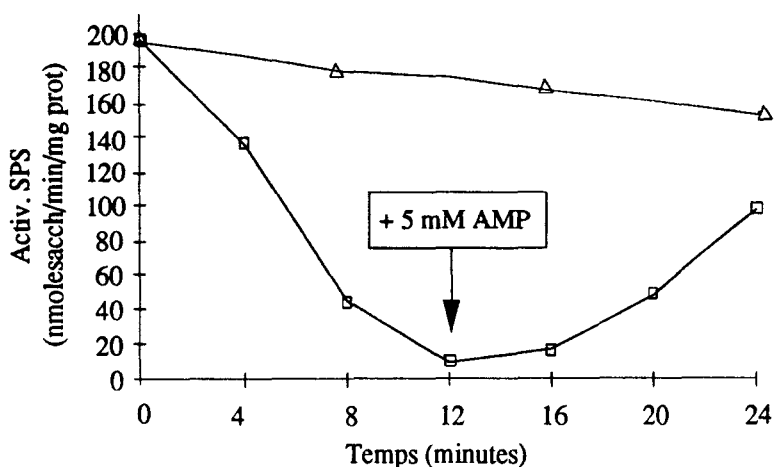


Figure 22: Effet phosphorylation et déphosphorylation (+ AMP) sur l'activité SPS des extraits bruts des cellules témoins du J0 (□) comparé aux extraits non-traités (Δ).

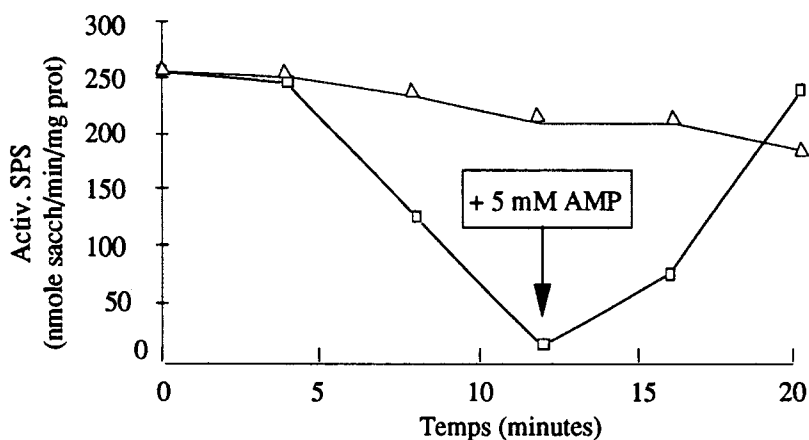


Figure 23: Effet de phosphorylation et déphosphorylation (+ AMP) sur l'activité SPS des extraits bruts des cellules témoins du J3 (□) comparé aux extraits non-traités (Δ).

Une remontée de l'activité enzymatique a été observée dans les deux cas ce qui nous a permis de conclure que chez la chicorée, la protéine SPS active correspond à la forme déphosphorylée.

Enfin, une dernière expérience a été menée sur un extrait issu de cellules ayant subi le traitement par l'ABA. L'extraction s'est faite le jour 2 où l'activité SPS est la plus faible (figure 18). Nous voulons ainsi voir si l'ABA a un effet post-traductionnel, par phosphorylation/déphosphorylation sur la SPS; autrement dit vérifier si la baisse d'activité SPS due à l'ABA correspond à l'état phosphorylé de la protéine SPS (figure 24).

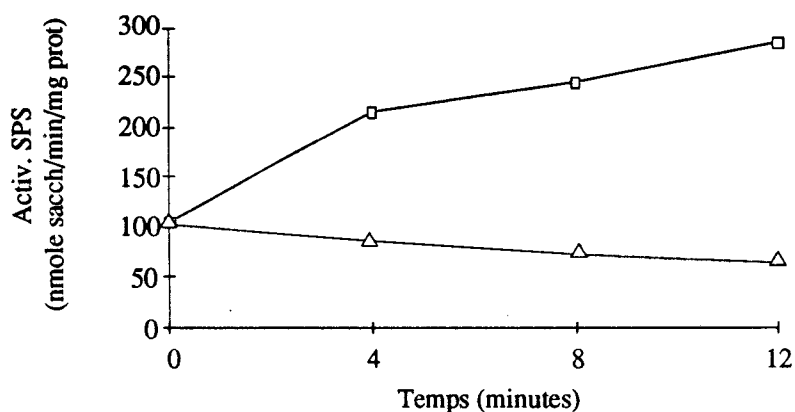


Figure 24: Effet de la déphosphorylation par l'ajout du AMP sur l'activité enzymatique de la SPS dans un extrait brut issu de cellules traitées par l'ABA du J3 (□) comparé aux extraits non-traités (Δ).

Les données ont montré que l'activité SPS peut augmenter *in vitro* par l'addition d'AMP. Ceci indique que la protéine SPS serait sensible à une modification covalente de type déphosphorylation, probablement par l'effet des activités des phosphatases

présentes dans l'extrait brut. Donc en présence d'ABA on peut supposer qu'une certaine quantité des protéines serait phosphorylée, c'est à dire inactive.

3.3. Conclusion

Nos résultats montrent que la SPS des cellules de chicorée peut être inactivée par phosphorylation et activée par des mécanismes de déphosphorylation. Par contre lorsque les manipulations sont effectuées sur des extraits enzymatiques provenant de cellules traitées par l'ABA, les résultats sont moins nets. Il en va de même pour la régulation de la NR par ce type de mécanisme.

Il nous est donc difficile de tirer des conclusions sur la régulation par les réactions de phosphorylation-déphosphorylation de la NR et de la SPS lorsque les cellules ont été cultivées en présence d'ABA.

4. INFLUENCE DE L'ABA SUR L'ACTIVITÉ NR DANS LA PLANTULE

Comme l'ont montré nos travaux effectuées sur les suspensions cellulaires, la corrélation entre le métabolismes azoté et carboné semble bien être accentuée et modifiée par l'ABA. Nous voulions voir quel serait l'effet de cette hormone sur l'activité NR dans la plante entière.

Ainsi, nous avons étudié l'effet dose sur l'ANR dans les racines et dans les feuilles de plantules de chicorée en utilisant des concentrations en ABA qui varient de 10^{-4} à 10^{-7} M. Une augmentation de l'activité nitrate réductase est nettement observée (figure 24). Pour les plantules témoins nous obtenons une ANR de $12,49 \mu\text{mole NO}_2^-/\text{h/g MF}$ et $17,14 \mu\text{mole NO}_2^-/\text{min/g MF}$ pour les plantules mises en présence d'ABA 10^{-6} M.

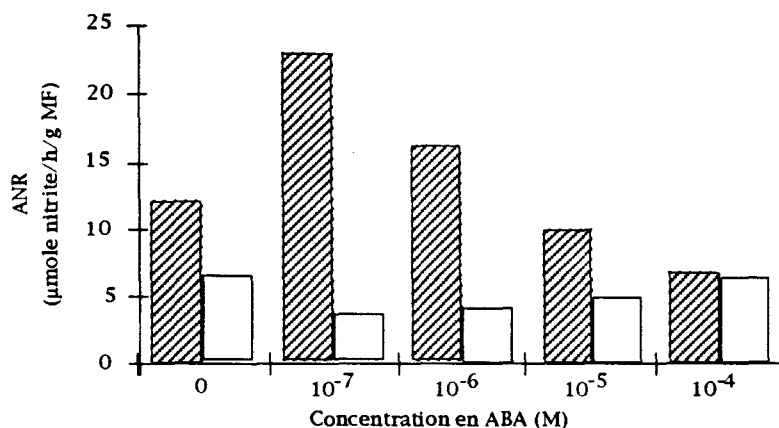


Figure 24: Activité NR *in vivo* des racines (▨) et des feuilles (□) après une incubation de 6 h sur un milieu à 5 mM de nitrate et à différentes concentrations d'ABA.

Nous remarquons qu'à 10^{-4} M, l'ABA a un effet inhibiteur dans les racines contrairement à ce qu'on observe dans les cultures cellulaires. Cependant à des concentrations plus faibles de 10^{-6} à 10^{-7} M, l'ABA stimule l'ANR dans les racines et inhibe celle des feuilles. Au plus l'activité augmente dans les racines au plus elle diminue dans les feuilles. Ceci peut s'exprimer par le rapport entre les deux activités NR Racine/Feuille:

sans ABA:	1,13
à 10^{-4} M:	1,05
à 10^{-5} M:	1,97
à 10^{-6} M:	2,93
à 10^{-7} M:	6,00

Mis à part l'augmentation de l'ANR dans la racine qui est observée en présence de 10^{-7} M d'ABA, nous ne pouvons conclure sur le système de régulation par l'ABA sur l'ANR dans la plantule. Dans le futur, il serait astucieux d'étudier les effets de l'ABA sur le métabolisme carboné au niveau enzymatique et transcriptionnel. Une étude sur le lieu d'expression de ces différents enzymes pourrait nous amener des résultats plus concluants. Parallèlement, il serait également intéressant de caractériser les glucides dans la racine et la feuille afin de voir si effectivement il existe un transport plus important des glucides de la feuille vers la racine en présence d'ABA.

CLONAGE ET SÉQUENÇAGE DU GÈNE *NIA*
CHEZ LA CHICORÉE

1. INTRODUCTION

L'approche ADN λ gt11 nous a permis d'isoler une partie du gène de la nitrate réductase de *Cichorium intybus*. Ce fragment (NRS) situé dans la région 3' du gène correspond à la partie flavinique de la protéine.

Dans le but de réaliser des constructions chimériques avec le gène nitrate réductase ou avec son promoteur et de les introduire dans la chicorée de Bruxelles via *Agrobacterium tumefaciens*, il nous était nécessaire d'isoler le gène et sa région régulatrice.

Etant donné que la construction d'une banque génomique est délicate, nous avons utilisé une technique plus rapide et efficace: la PCR (la réaction de polymérisation en chaîne) (Saiki *et al.*, 1988).

2. DÉTERMINATION DU NOMBRE DE GÈNES *NIA* CHEZ LA CHICORÉE DE BRUXELLES

Le nombre de gènes codant pour l'apoprotéine NR peut varier d'une copie à huit copies selon l'espèce (voir tableau 1, p. 10). Chez les *Solanaceae* (*L. esculentum*, *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *P. hybrida*) ainsi que chez l'épinard, le bouleau et la courge un seul gène par génome haploïde est retrouvé (Pelsy et Caboche, 1992). Chez le riz deux à huit copies par génome haploïde sont retrouvées selon le cultivar, et une à trois copies chez l'orge (Kleinhofs *et al.*, 1988).

Afin de déterminer le nombre de gènes *nia* dans le génome de la chicorée ($2n = 2x = 18$), l'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction *Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I et *Eco*RI puis hybridé avec la sonde NRS (Figure 1).

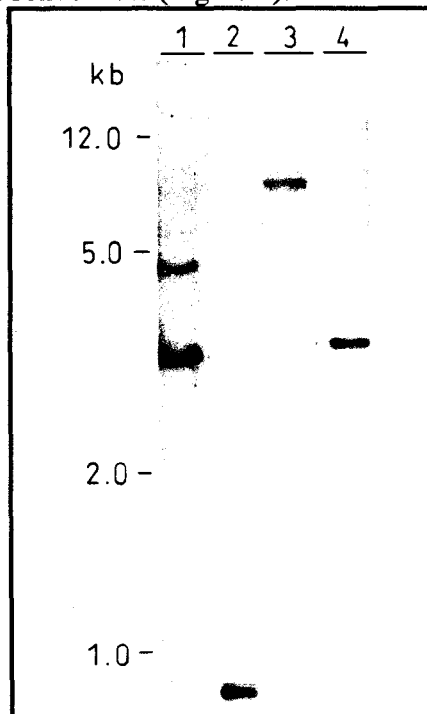


Figure 1: Hybridation de l'ADN génomique digéré par *Bam*HI (1), *Hind*III (2), *Xba*I (3) et *Eco*RI (4) avec la sonde NRS.

Ces enzymes ne coupent pas dans l'ADNc. Le nombre de gènes correspond au nombre de bandes qui apparaissent après hybridation avec l'ADNc. La digestion par *Bam*HI sert de contrôle pour l'hybridation; l'ADNc présente un site de coupure *Bam*HI dans sa séquence.

Le profil d'hybridation nous révèle une seule bande résultant des digestions enzymatiques (*Hind*III, *Eco*RI et *Xba*I). La digestion par *Bam*HI, enzyme présentant un site de coupure (voir figure 2, p. 90), nous révèle deux bandes comme prévu. La ploïdie de *Cichorium intybus* L. est de 2n (Darlington et Wylie, 1955; Dujardin *et al.*, 1979). Nous ne pouvons pas conclure que *Cichorium intybus* L. ne posséderait qu'un seul gène NR par génome haploïde, car la sonde utilisée a été isolée à partir d'une banque d'ADNc criblée avec deux oligonucléotides tous deux homologues d'une partie de la région flavinique. Cette région n'étant pas la plus conservée, il se peut que par hybridation génomique nous n'arrivons pas à révéler une deuxième bande correspondant à un deuxième gène *nia* potentiel ayant un taux d'homologie ne dépassant pas les 65 %. Ceci reste à vérifier.

3. UTILISATION DE LA PCR POUR LE CLONAGE DU GÈNE *NIA*

3.1. Approche utilisée

Ayant isolé un ADNc de la nitrate réductase de chicorée, nous avons utilisé cette séquence comme point de départ. En réalisant de la PCR à partir de cette région il nous était possible de remonter l'ensemble du gène en 4 étapes jusqu'au premier codon ATG. Ceci est représenté dans la figure 2:

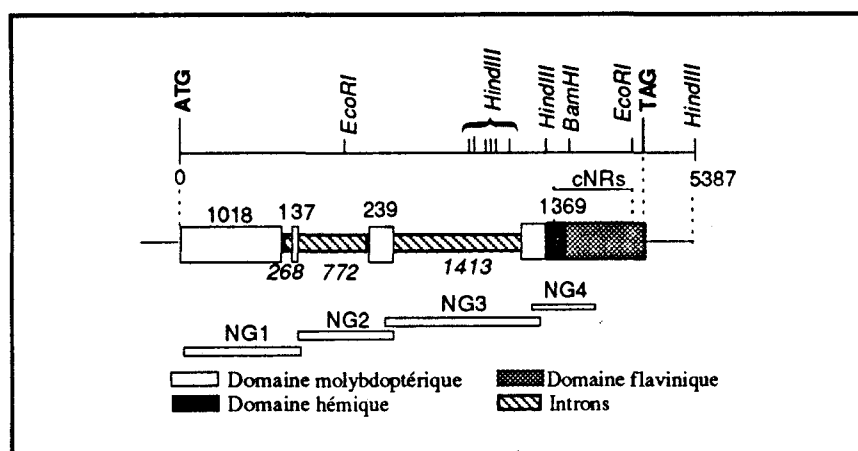


Figure 2: Schéma de l'approche utilisée pour le clonage du gène de la NR de la chicorée par PCR. La première réaction se fait à partir de l'ADNc NRS situé dans la région flavinique jusqu'au premier codon ATG dans la région molybdique. Les sites de restriction utilisés sont également indiqués ainsi que les tailles des exons et des introns (en italique).

L'avantage d'utiliser cette approche est d'une part que les fragments à amplifier ne sont pas de trop grande taille (de 0.8 à 1.8 Kb) ce qui facilite l'amplification et sa spécificité. D'autre part chaque amplification successive permettra le clonage de fragments chevauchants. Ceci permet de contrôler les séquences correspondantes aux oligonucléotides du fragment précédent.

3.2. Amplification et clonage des fragments: généralités

3.2.1. Optimisation de l'amplification par PCR

L'amplification s'est faite comme décrite dans 'Matériel et Méthodes'. Des premiers essais n'ont pas abouti à des résultats satisfaisants à cause d'une amplification faible et aspécifique (plusieurs bandes amplifiées); d'autre part les résultats n'étaient pas reproductibles.

Dans un premier temps le rendement de la réaction a été amélioré par une modification de la quantité d'ADN matrice (de 100 ng à 1 µg d'ADN génomique). Ensuite en augmentant la température d'hybridation (différente pour chaque fragment amplifié) nous obtenions une spécificité supérieure, mais non satisfaisante. Différentes *Taq* polymérases de diverses origines ont été testées (Boehringer, Bioprobe, Beckmann et Stratagène). Parmi ces enzymes celles fournies par Bioprobe et Beckmann ont donné les meilleurs résultats sur notre appareil PCR.

En modifiant le tampon 10 x PCR, la polymérase de chez Beckmann donnait les meilleurs résultats. Ainsi, le tampon classique (100 mM Tris.Cl pH 8,3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂; 0.1% gelatine) remplacé par un tampon contenant du sulfate d'ammonium (67,2 mM Tris.Cl pH 8,8; 166 mM (NH₄)₂SO₄; 67,2 mM MgCl₂; 100 mM β-mercaptoéthanol; 1,68 mg/ml gelatine) (Goblet *et al.*, 1989) a fourni la meilleure amplification.

Les amplifications ont été réalisées sur un appareil Techne (*Thermal Cycler* PHC-3) en gardant les mêmes conditions d'amplification (voir 'Matériel & Méthodes').

3.2.2. Techniques de clonage des fragments PCR

Les possibilités de clonage de produits PCR sont multiples:

1. Un clonage direct des produits PCR sans modification
2. Utilisation des extrémités 3'
3. Elimination des extrémités 3'

Une première approche utilisée est celle du clonage direct du fragment amplifié dans un vecteur coupé par *SmaI*, *HincII* ou *EcoRV*. Nous avons remarqué que les temps d'incubation pour une digestion *SmaI* doivent être de courte durée, car *SmaI* présente des activités exonucléasiques importantes. Ceci peut provoquer des délétions dans la région du "polylinker" et résulte dans la production de colonies blanches ne contenant pas d'inserts.

Ainsi, deux voies sont possibles: la première consiste à enlever ces extrémités 3' avec une enzyme ayant une activité exonucléasique 3'→5' pour obtenir des fragments PCR aux extrémités franches. Préférentiellement à l'enzyme Klenow, la T₄DNA polymérase est utilisée car elle possède une activité polymérasique 5'→3' mais aussi une activité exonucléasique 3'→5' plus importante que la Klenow. Ainsi, la T₄DNA polymérase peut remplir les extrémités 3' et 5'.

Cependant une meilleure efficacité de clonage de fragments à bouts francs peut-être obtenue sans modifier les fragments PCR. La deuxième approche utilisée pour le clonage consiste donc à utiliser l'activité terminale transférase (activité indépendante de la matrice) de la *Taq* polymérase qui provoque l'addition d'un seul nucléotide à l'extrémité 3' du fragment. Ce nucléotide est pratiquement toujours une adénosine, à cause de la préférence de la *Taq* polymérase pour le dATP (Marchuk *et al.*, 1991). Ainsi le vecteur aux extrémités franches (obtenu par digestion enzymatique par *EcoRV*, *HincII* ou *SmaI*) est incubé en présence de dTTP avec la *Taq* polymérase et ensuite lié avec le fragment PCR non-modifié (voir 'Matériel et Méthodes').

3.3. La région flavinique et hémique

3.3.1. L'amplification et clonage du fragment correspondant à la région flavinique et hémique

L'avantage d'utiliser le NRS comme point de départ est d'une part la possibilité d'utiliser un oligonucléotide parfaitement homologue au NRS et d'autre part, de repérer le fragment amplifié par une simple hybridation avec le NRS.

Un premier oligonucléotide (F676') homologue a été synthétisé (voir 'Matériel et Méthodes') à partir de la séquence du pNRS (voir Figure 3, p.56):

5' TTG ATC CGG TGA TGG GAG AGC GAA CC 3'

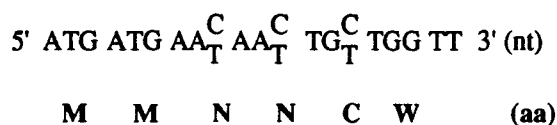
L'oligonucléotide se situe en région 3' du gène et est choisie de sorte que la synthèse d'ADN (5'→3') se fasse jusqu'à la deuxième amorce située plus en amont.

Le deuxième oligonucléotide a été choisi à partir de séquences NR déjà connues du tabac, de la tomate, du riz et d'*Arabidopsis* (Vaucheret *et al.*, 1989; Daniel-Vedele *et al.*, 1989; Choi-Hong *et al.*, 1989; Crawford *et al.*, 1988). Le choix de la séquence nucléotidique est basé sur la séquence en acides aminés en tenant compte de la dégénérescence du code génétique (voir tableau 1). Bien que méthionine et tryptophane soient codés par un seul codon, les autres acides aminés sont codés par 2 jusqu'à 6 codons.

Acides aminés	# de codons
M, W	1
C, D, E, F, H, K, N, Q, Y	2
I	3
A, G, T, P, V	4
L, R, S	6

Tableau 1: La dégénérescence des codons

Les acides aminés N et C peuvent être codés par 2 codons (l'asparagine est codé par AAC ou AAT et la cystéine par TGT ou TGC). Ainsi la séquence choisie de l'oligonucléotide *H463* est la suivante:



Le choix des oligonucléotides détermine souvent la réussite ou l'échec de l'amplification. Plusieurs règles doivent être respectées. Dans un premier temps il faut éviter des répétitions de bases (de purines ou de pyrimidines). Ensuite le pourcentage de GC (valeur Tm) doit être égal pour les deux oligonucléotides. Les séquences ayant des structures secondaires doivent être évitées. Finalement les deux oligonucléotides ne doivent pas montrer de complémentarités en 3' afin d'éviter l'effet du 'primer-dimer'. Pour contrôler tous ces paramètres le programme 'Oligo' de Rychlik et Rhoads (1990) a été utilisé.

L'utilisation de ces deux oligonucléotides (*F676'* et *H463*) a permis d'amplifier d'une manière spécifique un fragment d'ADN (de ±0.65 Kb) homologue à une région du domaine flavinique/hémique de la protéine.

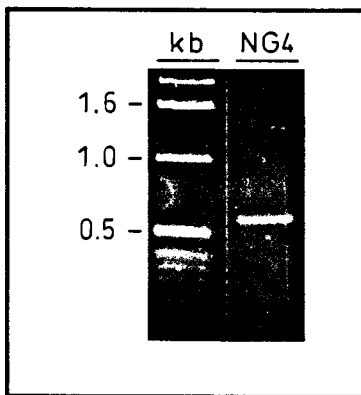


Figure 3: Electrophorèse en gel d'agarose du fragment 4 issu de l'amplification avec les oligonucléotides F676' et H463.

Ce fragment a été cloné en extrémités franches dans le vecteur pBleuscript KS(+) au site SmaI comme décrit dans 'Matériel et Méthodes' afin de procéder au séquençage.

3.3.2. Séquençage du NG4

Le séquençage s'est fait selon Sanger (1981). Par alignement avec la séquence du pNRS on retrouve la séquence chevauchante (Figure 4):

```

NG4 CCTGACATTACACTTAAGCTTAGCCACCATCAAAGAAATTGCTCCGACAA -550
NG4 GAAGAAGCGTAGCCCTAATCCCTCGTGAAAAGATCCCATGTAAACTTATC -600
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NRS GAAGAAGCGTAGCCCTAATCCCTCGTGAAAAGATCCCATGTAAACTTATC -49

NG4 TCCAAAACATCGGTTTCTCATGACGTGAGGCTATTTCAGGTTTCGCTCTCCC -650
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NRS TCCAAAACATCGGTTTCTCATGACGTGAGGCTATTCA GGTTCGCTCTCCC -99

NG4 ATCACCGGATCAA -663
   ||||||||||||
NRS ATCACCGGATCAA GTTCTTGGGTTACCAGTAGGGAAACACGTCTTTGTAT -149

NRS GTGCCACCATTGACGATAAGCTATGCATGAGGGCATAACACCAACGAGC -199
  
```

Figure 4: Alignement de la partie chevauchante des séquences nucléotidiques du NG4 et du NRS. Le complément inverse de l'oligonucléotide F676' est encadré.

Nous remarquons une homologie parfaite des deux séquences; ce qui indique le faible taux d'erreurs commis par la polymérase. A partir de ces résultats, il

nous était possible de synthétiser un nouvel oligonucléotide afin d'amplifier le(s) fragment(s) correspondants à la région molybdique.

3.4. La partie molybdique

L'approche utilisée pour l'amplification d'un deuxième fragment possédant la partie molybdique est la même que pour le fragment précédent: un oligonucléotide a été choisi à partir de la partie hémique du fragment précède et l'autre oligonucléotide à partir de séquences NR conservées chez d'autres organismes. Ne connaissant pas les tailles des introns inclus dans cette région, nous avons opté pour une amplification en trois étapes. Les oligonucléotides ont, pour cette raison, été choisis entre chaque intron.

3.4.1. Clonage du premier fragment molybdique NG3

La séquence de l'oligonucléotide *H550'* en extrémité 3'est la suivante:

5' CT TGG CCT TGT CGG AAT GGA TGG CAT 3'

Cet oligonucléotide est synthétisé à partir de la séquence du NG4. On retrouve le *H550'* à 396 nt de l'extrémité 5' du NG4 (l'oligonucléotide est encadré dans la figure 4). L'oligonucléotide choisi (=M410) en extrémité 5' possède la séquence suivante:

5' CGG GTG GAA GTG ACA ATG GAC GGA GGA G 3'
R V E V T M D G G

Après amplification nous avons obtenu un fragment de 1.9 Kb (=NG3) (voir la figure 5).

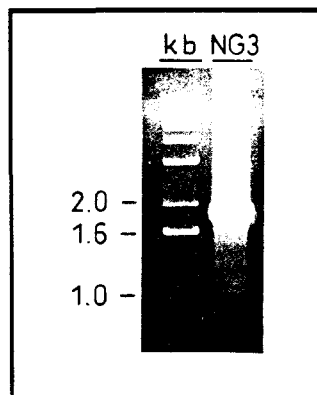


Figure 5: Electrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification avec les oligonucléotides *H550'* et *M410*

Ce fragment a été cloné dans le site SmaI du vecteur pBleuscript et ensuite séquencé. Environ 300 nucléotides du NG3 sont chevauchants avec le NG4 (voir la figure 6) ce qui confirme sa séquence.

```

NG3      - TAAGAAAACAAATTATTTCTTAAACCAAAGCTAATTAAGATTAAAAATAT -1600
NG3      - GCAGGGTATGATGAACAATTGTTGGTTCCGAGTGAAGACAAACATGTGCA -1650
          |||
NG4      - ATGATGAACAATTGTTGGTTCCGAGTGAAGACAAACATGTGCA -43

NG3      - AACCACACAAAGGCGAGATCGGCATCGTCTTCGAGCACCCAACGCAACCT -1700
          |||
NG4      - AACCACACAAAGGCGAGATCGGCATCGTCTTCGAGCACCCAACGCAACCT -93

NG3      - GGAAACCAGTCCGGTGGATGGATGGTTTCGTGAGAAACACCTCGAGATTTC -1750
          |||
NG4      - GGAAACCAGTCCGGTGGATGGATGGTTTCGTGAGAAACACCTCGAGATTTC -143

NG3      - ATCGGAACTAGCACACCCAACCTCTCAAGAAGAGTGTATCCTCCCCTTTCA -1800
          |||
NG4      - ATCGGAACTAGCACACCCAACCTCTCAAGAAGAGTGTATCCTCCCCTTTCA -193

NG3      - TGAACACCACCTCTTTAACCTTCACCATGTCGGAAGTCAAGAAACACAAT -1850
          |||
NG4      - TGAACACCACCTCTTTAACCTTCACCATGTCGGAAGTCAAGAAACACAAT -243

NG3      - TCCGCTGACTCAGCCTGGATCGTCCATGGCCATATCTACGACTGCAC -1900
          |||
NG4      - TCCGCTGACTCAGCCTGGATCGTCCATGGCCATATCTACGACTGCAC -293

NG3      - CTCCTTCCTCAAAGACCATCCCGTGGCAGTGACAGTATCCTCCTCAATG -1950
          |||
NG4      - CTCCTTCCTCAAAGACCATCCCGTGGCAGTGACAGTATCCTCCTCAATG -343

NG3      - CTGGAACCGACTGCACAGAAGAGTTCCG ATGCCATCCATTCGACAAGGCC -2000
          |||
NG4      - CTGGAACCGACTGCACAGAAGAGTTCCGATGCCATCCATTCGACAAGGCC -393

NG3      - AAG -2003
          |||
NG4      - AAGAACTCTTGAAGAGTATCGAGTTGGTGAGCTCATAACCATGGGATA -443
    
```

Figure 6: Alignement du NG4 avec le NG3.

Le fragment NG3 contient un intron. Les sites consensus de début et fin d'introns ont été retrouvés. La taille de l'intron est de 1,2 Kb et la position des introns est précisée dans l'annexe 1.

3.4.2. Clonage du deuxième fragment molybdique NG2

Ce fragment a été amplifié de la même façon que les fragments précédents. Ainsi l'oligonucléotide homologue a été choisi dans le fragment NG3 et l'oligonucléotide en 5' dans une région bien conservée du gène *nia*.

Les oligonucléotides en 3' (=H420') et en 5' (=M339) sont représentés ci-dessous:

5' CAA GCG ACC AAA AAC ACC AAC ACC 3' (=H420')

5' TGG TGG TA^TAA^ACCA GA^GTA 3' (=M339)
 W W Y K P E

Par PCR, nous avons obtenu une amplification bien spécifique d'un fragment de 1,2 Kb (Figure 7).

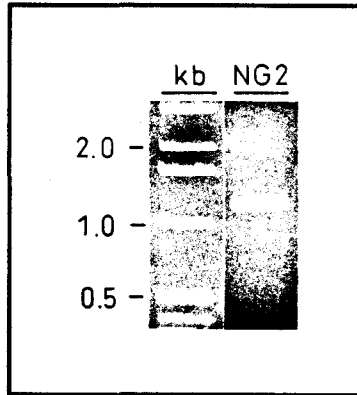


Figure 7: Amplification du clone NG2 par PCR.

Après clonage et séquençage de ce clone nous avons déterminé la séquence suivante chevauchante avec le clone NG3:

```

NG3      -                               CGGGTGGAAGTA -12
                                         |||
NG2      - ATACGTCGTCGTTTACAGGAGGTGGGAAGAAAGTGACACGGGTGGAAGTA -950
NG3      - ACAATGGACGGAGGAG AGACGTGGAACGTTTGTACACTGGATCATAAAGA -62
                                         |||
NG2      - ACAATGGACGGAGGAGAGACGTGGAACGTTTGTACACTGGATCATAAAGA -1000
NG3      - GAAGCCAACAAGATACGCCAAATATTGGTGTGGTGTMTTGGTCGCTTG -112
                                         |||
NG2      - GAAGCCAACAAGATACGCCAAATAT GGTGTTGGTGTMTTGGTCGCTTG -1050
NG3      - AAGTTGAAGTTCCTTGACCTTCTTAGTGCCAAAGAGATCGGGTTCGAGCC -162
    
```

Figure 8: Alignement entre le clone NG3 et NG2. Les oligonucléotides M600 et H420' sont encadrés.

3.5. Clonage du fragment correspondant à la partie N-terminale du gène *Nia*

Le dernier fragment à amplifier correspond à la partie N-terminale du gène *Nia*. Pour cela nous avons choisi un oligonucléotide (=M380') en région 3' dont la séquence est homologue au NG2:

5' GGT GTA AGG CCT TTG AGT TGT CCA 3' (=M380')

L'oligonucléotide 5' (=M1) est un oligonucléotide dégénéré ayant la séquence suivante (en acides aminés):

5' ATG GCG GC^A_C TCT GTI GA^A_T AA 3' (=M1) (nt)
M A A S V E N (aa)

Un fragment de 1,40 Kb a été amplifié par PCR (Figure 9)

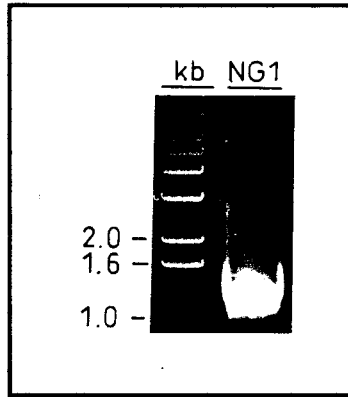


Figure 9: Amplification du clone NG1 correspondant à la partie N-terminale

Le clonage et le séquençage du fragment NG1 ont abouti à la séquence suivante chevauchante avec le NG2:

```

NG2-                                     TGGTGGTACAA -10
      |||
NG1- GATTTTGGATGTTGAGTTTCATTTGTTATGAATTAGGTTGGTGGTACAA -1300

NG2- ACCAGAGTA CATCATCAACGAACTCAACATAAACTCGGTGATTACAACAC -60
      |||
NG1- ACCAGAGTACATCATCAACGAACTCAACATAAACTCGGTGATTACAACAC -1350

NG2- CTTGTCATGAAGAGATTTTGCCTATTAATCTTTGGACAACCTCAAAGGCCT -110
      |||
NG1- CTTGTCATGAAGAGATTTTGCCTATTAATCT TGGACAACCTCAAAGGCCT -1400

NG2- TACACCTTGAGAGGCTATGCATATTCGGgtaattaattaataacttccatc -160
      |||
NG1- TACACC -1406
    
```

Figure 10: Alignement de la partie chevauchante des séquences du NG2 et du NG1. Les exons sont en majuscules, les introns en minuscules. Le complément inverse de l'oligonucléotide M380' utilisé pour l'amplification du NG1 est encadré, ainsi que le M339 utilisé pour l'amplification du fragment NG2.

4. LE CLONAGE DE LA RÉGION 3' NON-CODANTE DU GÈNE *NIA*

4.1. Principe de la technique PCR inverse

La PCR inverse permet d'amplifier des séquences inconnues adjacentes à des séquences connues. Ceci est schématisé dans la figure 11:

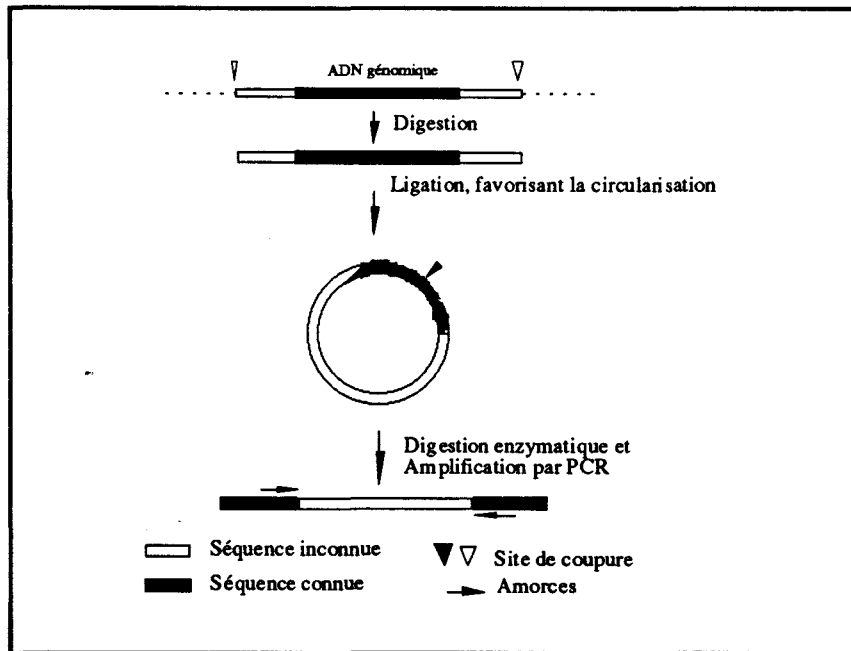


Figure 11 : Présentation schématique du principe de la PCR inverse

L'ADN génomique est digéré de telle façon que l'on obtienne une seule bande par hybridation avec une sonde voisine de la séquence inconnue. Cette bande qui contient la région inconnue et une partie de la séquence connue est circularisée par ligation. Ce fragment circularisé est éventuellement à nouveau linéarisé par coupure dans un site de restriction unique dans la séquence connue. L'amplification par PCR peut alors s'effectuer selon un protocole classique.

4.2. Amplification et clonage de la région 3' non-codante du gène

Pour compléter notre travail, ± 15 derniers nucléotides de la séquence codante ainsi que la partie 3' non-codante du gène restaient à cloner. Une approche par PCR inverse nous paraissait la meilleure solution pour les caractériser. Le choix de l'enzyme utilisée pour cette approche est HindIII. Ce site est retrouvé dans le NG4 en amont du NRS. Par hybridation sur l'ADN génomique digéré par HindIII on obtient une bande de 950bp en utilisant le NRS comme sonde (voir figure 1). Ceci est représenté dans la figure suivante:

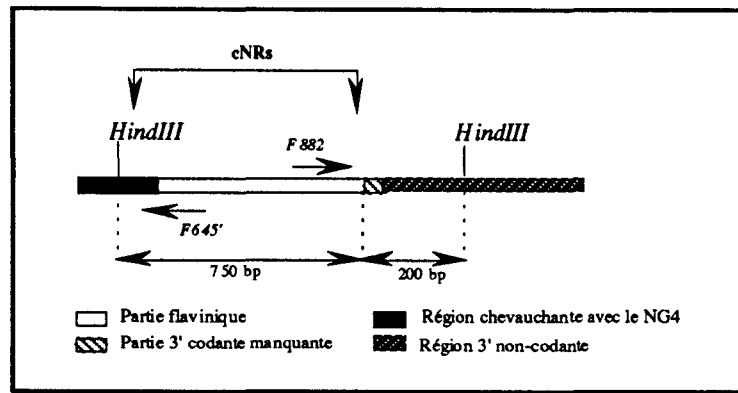


Figure 12: Présentation schématique de l'approche utilisée pour le clonage de la partie 3' du gène *nia*.

Après digestion, l'ADN est purifié et lié dans des conditions bien déterminées (voir 'Matériel & Méthodes, p. 35). Elles conditions doivent être telles que $10i < j$, avec j calculé selon la formule suivante:

$$j = \frac{63.4}{[Kb]^{1/2}} \mu\text{g/ml} \text{ où Kb est la taille du fragment à circulariser}$$

ce qui nous donne l'équation $j = 71 \text{ ng}/\mu\text{l}$, d'où $i = 4 \text{ ng}/\mu\text{l}$. La ligation est faite avec 1 μg d'ADN génomique dans un volume final de 250 μl . L'incubation a été faite en présence de 400 U de T₄DNA superligase à 12°C pendant 12 h.

Après une purification et une précipitation, l'ADN circularisé est repris dans un volume final de 20 μl , dont 10 μl sont ajoutés au mélange suivant:

10.0 μl ADN
 5.0 μl Tampon 10 x
 0.5 μl Taq Beckman (5 U/ μl)
 2.0 μl F645' (200 ng/ μl)
 2.0 μl F882 (200 ng/ μl)
 30 μl MilliQ eau
 50 μl

Les conditions utilisées pour la PCR inverse sont les suivantes:

dénaturation	94° 1'	94° 30"	94° 30"
hybridation	52° 30"	53° 30"	55° 30"
extension	72° 1'	72° 1'	72° 3'
#de cycles	1 x	28 X	1 x

Une bande de 750 bp a ainsi été amplifiée (Figure 13) et clonée dans le pCRII™.

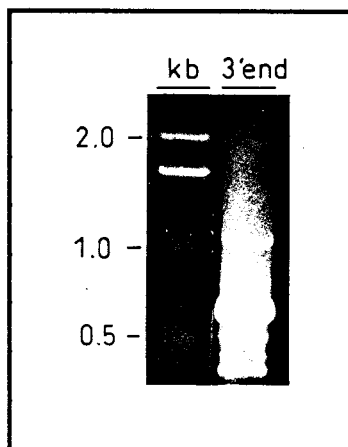


Figure 13: IPCR sur la partie 3' du gène et obtention d'une bande de 750bp.

Après clonage et séquençage du fragment de 750 bp, nous avons retrouvé la partie chevauchante avec l'ADNc (NRS) ainsi que le stop codon **TAG** (en gras), et deux sites potentiels de polyadénylation (AAUAAA) (encadrés ci-dessous). La séquence 3' du gène *nia* est représentée ci-dessous:

```

          5182          5192          5202          5212          5222
          |           |           |           |           |
AAT TTA GAA AAG ATG GGG TAT GAT ATC AAG AAT TCT TTG CTG GTG TTT TAG agg
  N  L  E  K  M  G  Y  D  I  K  N  S  L  L  V  F  -

```

atcgtgttacattattatatttgggatcggttacattttgatttcaaa **aataaaa** aaaaggggtcatat
atgtacatacttctagtattactatgtatttgtaatcatgtgtctacgcgagagagcttagatattaata
gaaaatcat **aataa** tttaagctt

5. La partie 5' régulatrice du gène *nia*

Afin d'isoler le promoteur par PCR, il était nécessaire de trouver les enzymes qui coupent dans la partie 5' du gène de telle sorte que le fragment obtenu recouvre tout le promoteur. Après hybridation de l'ADN génomique digéré par ces différentes enzymes une bande de 2,0 Kb a été obtenue. L'amplification par PCR inverse n'a malheureusement pas donné de résultats satisfaisants. Le clonage et la caractérisation de la région régulatrice du gène *nia* seront repris ultérieurement.

6. CONCLUSION

Par hybridation sur l'ADN génomique à l'aide de la sonde ADNc nous avons révélé la présence d'une bande. Nous supposons ainsi que la chicorée de Bruxelles ne contient qu'un seul gène *nia* par génome haploïde. Ensuite nous avons abordé le clonage du (d'un) gène *nia* par PCR. Le choix de cette technique s'imposait dans la mesure où nous n'avions pas de banque génomique à notre disposition. Ainsi, nous avons réussi à isoler et caractériser le gène *nia* de la chicorée de Bruxelles.

Afin d'éviter des amplifications de taille trop importante et aussi d'obtenir des fragments chevauchants permettant de s'assurer de la fidélité de la *Taq* polymérase, l'amplification et le séquençage ont été réalisés en quatre étapes.

Un gène de 5.2 Kb a été cloné du codon d'initiation ATG jusqu'au codon stop TAG. Le gène possède trois introns, tous situés dans la partie molybdique. La PCR inverse nous a permis de cloner la partie 3' non codante du gène *nia*.

DISCUSSION



1. LE CLONAGE DU GENE *NIA*

L'un des objectifs de notre travail était d'isoler et de caractériser le gène *nia* de la chicorée Bruxelles et sa région régulatrice en 5' afin de réaliser une première étude moléculaire sur la régulation du gène *nia* dans la jeune plantule ainsi que dans les cultures cellulaires.

Nous avons d'abord entrepris la construction d'une banque d'ADNc à partir d'une culture cellulaire. Plusieurs clones positifs ont été mis en évidence dans la banque construite à partir de 50 ng d'ADNc de chicorée. L'isolement et le séquençage d'un ADNc de 0,78 Kb a confirmé qu'il s'agissait du gène nitrate réductase. Même si nous n'avons pas eu la chance de pouvoir isoler un ADNc complet ('full-length'), ce dernier nous a été utile pour les études ultérieures d'expression du gène *nia*.

L'alignement de ce clone avec les ADNc NR d'*Arabidopsis* et de tabac, nous a révélé une homologie avec la région 3' du gène ce qui nous a confirmé que l'ADNc isolé correspond bien à la partie flavinique de la protéine. Cette séquence paraît être bien conservée puisque nous obtenons 79 % d'homologie avec la NR de tabac et 62 % avec celle d'*Arabidopsis*.

Deux autres clones de 1,7 Kb et de 3,5 Kb ont été analysés, mais n'ont pas montré d'homologie avec la nitrate réductase. Les premiers ADNc NR isolés chez d'autres espèces végétales n'étaient pas non plus de taille complète, en effet chez l'orge le 1^{er} cDNA NR isolé avait une taille de 1,1 Kb (Cheng *et al.*, 1986), alors que celui de tabac (Calza *et al.*, 1987) était de 1,5 Kb. La partie manquante de ces 2 ADNc correspondait au domaine molybdique. Que nous n'ayons pas repêché des inserts du domaine molybdique peut se comprendre. En effet les oligonucléotides que nous avons utilisés comme sondes (S1 et S2) correspondent tous deux au domaine flavinique. Au moment où nous avons fait synthétiser ces sondes, n'étaient publiées que des séquences incomplètes des ADNc NR comme celles de l'orge (Cheng *et al.*, 1986) et du tabac (Calza *et al.*, 1987). De plus, la région correspondante à la partie N-terminale constituée par les 80 premiers acides aminés de la protéine est la moins conservée du gène nitrate réductase. Il nous était donc impossible de synthétiser un oligonucléotide homologue à cette région, d'autant plus que cette séquence n'était pas encore connue.

Nous avons dans un premier temps, déterminé le nombre de gènes NR présents par génome haploïde de *Cichorium intybus* L. (qui est une plante diploïde selon Darlington et Wylie, 1955). L'hybridation du clone d'ADNc sur l'ADN génomique, préalablement digéré par une enzyme ne coupant pas dans l'ADNc n'a révélé qu'une seule bande nous faisaient supposer la présence d'un seul gène par génome haploïde de chicorée. Parmi les plantes analysées jusqu'à présents les *Solanaceae* comme *Nicotiana plumbaginifolia*, *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida* et *Lycopersicon esculentum* ne possèdent qu'un seul

gène par génome haploïde codant pour une nitrate réductase (NR:NADH) (Caboche et Rouzé, 1990; Salanoubat et Ha, 1993; Daniel-Vedele *et al.*, 1989), de même que l'épinard, la courge et le bouleau (Prosser et Lazarus, 1990; Hyde *et al.*, 1991; Friemann *et al.*, 1991). Nous ne pouvons malgré tout pas exclure la possibilité de la présence d'un deuxième gène *nia* chez la chicorée pour la bonne raison que l'ADNc utilisé comme sonde tout au long de ce travail correspond à une région moyennement conservée. L'existence d'un deuxième gène *nia* ayant un pourcentage d'homologie trop faible pour être révélé par hybridation dans des conditions stringentes est envisageable.

Dans un deuxième temps nous avons réussi à cloner un gène codant pour la nitrate réductase (*nia*) de *Cichorium intybus* par PCR.

Le clonage s'est fait en quatre étapes de telle façon que chaque fragment amplifié chevauche le suivant. Ceci nous a permis d'une part de contrôler la fiabilité de la *Taq* polymérase et d'autre part d'éviter l'utilisation d'amorces dégénérées. Concernant la fiabilité de la *Taq* polymérase, le nombre de nucléotides mal incorporés est de 1 toutes les 9000 bases polymérisées et un changement de cadre de lecture se produit tous les 41000 nucléotides par cycle d'amplification (Tindall et Kunkel, 1988). Donc après une moyenne de 30 cycles, nous obtenons théoriquement une erreur toutes les 300 bases et un changement de cadre de lecture toutes les 1365 bases. Ces erreurs peuvent être évitées ou réduites en réalisant du séquençage direct ou en comparant les séquences de plusieurs clones. Nous avons choisi cette dernière option. Ainsi, pour chaque fragment amplifié au moins deux clones ont été séquencés. Grâce aux alignements des différents clones et des parties chevauchantes entre les différents fragments, les erreurs commises par la polymérase ont pu être largement atténuées voire éliminées. La PCR nous a donc permis d'obtenir la séquence complète du gène *nia* de *Cichorium intybus* L. var. Witloof. L'amplification par PCR des différents fragments (NG1, NG2, NG3 et NG4) produisait chaque fois une amplification spécifique et les régions chevauchantes entre deux fragments successifs montraient une homologie parfaite. La présence d'un deuxième gène aurait certes pu aboutir à une amplification de fragments chevauchants mais n'ayant pas des degrés d'homologie aussi importants. Dans un futur proche nous devons vérifier l'existence d'un deuxième gène par des hybridations sur l'ADN génomique de chicorée à l'aide de différentes sondes provenant des différentes régions du gène *nia* sous des conditions peu stringentes.

2. LA SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE

Concernant la séquence nucléotidique, le gène *nia* de la chicorée de Bruxelles contient trois introns de taille différente, tous situés dans la région molybdique du gène. La taille et la position des trois introns ont été déduites par homologie avec des séquences d'ADNc NR connues (Programme PCGENE de Intelligenetics®, Genève, Suisse, 1989-

1991) et par un report du % GC (G+C en fonction de la position des nucléotides) de la séquence entière (Annexe 3). Les introns contiennent en règle générale un % plus élevé de A+T que les exons (Goodall et Fillipowicz, 1989). Ainsi, nous observons que le taux de A+T des introns est de 74%, et celui des exons de 53%.

D'une façon générale les introns sont les régions qui ont subi la plus forte modification lors de l'évolution, puisqu'ils présentent de faibles pourcentages d'homologie. Les introns du gène *nia* de la chicorée de Bruxelles ont une taille comparable à ceux d'autres gènes *nia*, sauf le troisième intron qui est le plus long des gènes *nia* clonés jusqu'à présent. Ainsi, l'intron 1 possède 270 nucléotides, le deuxième 779 et le troisième 1411 nucléotides.

Le codon stop UAG (encadré et en gras dans la figure 1) est assez rare, car seuls 18 % des dicotylédones utilisent ce codon ambre, tandis que 46 % utilisent le codon ambre UAA, et 36 % le codon opale UGA. Comme le codon UAG est le moins utilisé (non seulement par les plantes, mais aussi par *E. coli*) et que les plantes contiennent des tRNA incapables de reconnaître UAG; ce codon d'arrêt est généralement observé dans un contexte puissant, notamment en présence d'une guanine en position -1 et une adénine en position +1 (Angenon *et al.*, 1990). Nous remarquons que ceci n'est pas tout à fait le cas chez le gène *nia* de la chicorée: pour la position -1, nous retrouvons une thymidine (dans 28 % des cas cités), tandis que dans 40 % des cas on retrouve une guanine. En position +1, il y a une adénine, ce qui correspond à la majorité des cas décrits (59 %) dans la littérature.

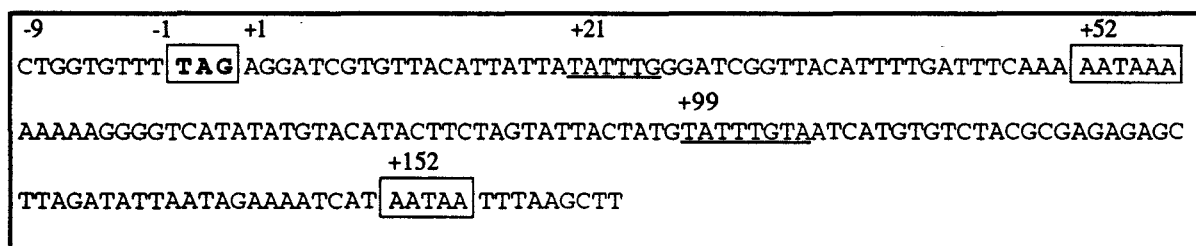


Figure 1: Séquence en 3' du stopcodon du gène *nia*. Les régions soulignées correspondent aux éléments Far Upstream Elements; celles encadrées en caractères standards aux signaux de polyadénylation.

En règle générale, chez les monocotylédones et les dicotylédones la région en aval du stop codon est plus riche en AT que la région en 5'. Dans le cas de la chicorée nous trouvons 56% de AT en amont du stopcodon (de -1 à -9) et 45 % en aval (de +1 à +9) ce qui est légèrement comparable aux 65 % en amont et 54 % en aval du stop codon chez les dicotylédones.

Le gène *nia* est le premier gène nucléaire cloné de la chicorée de Bruxelles, de ce fait nous ne pouvons pas l'existence de séquences équivalentes chez d'autres gènes de la chicorée. Des signaux potentiels de polyadénylation sont situés aux positions +52 et +152 (encadrés dans la figure 1) du codon TAG du gène *nia* de la chicorée de Bruxelles. Ces signaux de polyadénylation chez les végétaux sont souvent accompagnés par la présence

d'éléments dits éléments FUE ('Far-Upstream Elements') en amont des motifs AAUAAA (Hunt, 1994). Nous retrouvons ces séquences 'UAUUUGUA' (soulignées dans le tableau) à 40-150 nucléotides en amont du signal de polyadénylation (encadré dans la figure 1).

Dans le gène *nia* de la chicorée, deux éléments (soulignés dans la figure 1) sont retrouvés respectivement à 30 bases du premier signal de polyadénylation et à 53 bases du deuxième signal. Ces éléments ne sont pas présents dans les séquences *nia* de tabac, du riz et de la tomate. Il est établi que la délétion de ces éléments aurait un effet négatif sur le fonctionnement du signal de polyadénylation, et l'introduction de ces motifs à proximité d'une séquence AAUAAA augmente la fonction de polyadénylation ce qui indique l'importance de ces signaux dans le domaine végétal (Hunt, 1994).

3. L'ANALYSE DE LA STRUCTURE PROTÉIQUE DE LA NITRATE RÉDUCTASE DE LA CHICORÉE

La nitrate réductase de *Cichorium intybus*, comme celle d'autres végétaux, est une enzyme ayant un centre d'oxydo-réduction multiple qui catalyse la réduction du nitrate en nitrite en utilisant deux électrons à l'aide d'un nucléotide pyridinique, le NADH. La seule NR caractérisée chez la chicorée de Bruxelles est une nitrate réductase du type NR:NADH (EC 1.6.6.1.) (Chraïbi, 1988). L'enzyme est un homodimère dont chaque sous-unité est composée d'un polypeptide de 103 kDa et de trois cofacteurs, le FAD, l'hème-Fe et le MoCo.

L'analyse de la séquence du gène nous a montré après traduction en acides aminés que la protéine est constituée de 920 acides aminés. La taille de la NR chez les végétaux peut varier de 881 acides aminés pour le pois jusqu'à 926 pour l'épinard (voir tableau annexe 2). Cette variation s'observe principalement dans la région N-terminale qui peut atteindre 68 résidus pour la NADPH:NR d'*Aspergillus*, 145 pour la NADPH:NR de *Neurospora*, 104 chez le tabac et jusqu'à 116 chez la courgette qui possèdent la NADH:NR (pour revue voir: Kinghorn et Campbell, 1989). La comparaison des homologies de séquences des nitrate réductases de différentes espèces avec celle de chicorée montre une variation pour la région N-terminale entre 38 % et 47 % comme nous l'indique le tableau 1. Ce faible taux de conservation indique que la région N-terminale n'est probablement pas impliquée dans les processus catalytiques. La fonction réelle de cette région n'est pas connue. La protéine NR est constituée de trois domaines catalytiques, mais de plusieurs régions définies selon des critères de structure secondaire principale (Daniel-Vedele *et al.*, 1989).

Comme l'indique le tableau 1, six régions sont ainsi observées: la région N-terminale, la région ptéro-molybdique, suivie de la première charnière, la région hémique suivie de la deuxième charnière et finalement la région flavinique. Les deux charnières avec la partie

N-terminale sont les régions les plus hydrophiles (voir annexe 3). Elles correspondent probablement aussi aux régions sensibles aux traitements par les protéases (Kubo *et al.*, 1988; Notton *et al.*, 1988).

L'alignement des séquences en acides aminés des différentes nitrate réductases (Annexe 2), nous montre que les séquences nitrate réductases sont globalement et généralement bien conservées parmi les différentes espèces (tableau, annexe 2).

Comme nous l'indique le tableau 1, la région molybdique est la plus conservée (en moyenne 86,1 %) ensuite on retrouve la région hémique (81,5 %) et finalement la région flavinique qui est la moins conservée (77,2 %). Selon Daniel-Vedele *et al.* (1989) les charnières sont peu conservées, mais nous remarquons que la première charnière située entre la région molybdique et hémique révèle un degré de conservation atteignant 82 %.

Région	Séquence complète	N-terminale (1-106)	Molybdique (107-473)	Charnière1 (474-534)	Hémique (535-612)	Charnière2 (613-640)	Flavinique (641-920)
Homologie	78,1 %	42,5 %	86,1 %	82,0 %	81,5 %	37,2%	77,2 %

Tableau 1: Pourcentages d'homologies des différents domaines des nitrate réductases avec la nitrate réductase de la chicorée (les chiffres entre parenthèses correspondent aux positions des acides aminés chez la NR de la chicorée).

Plusieurs acides aminés, qui sont importants d'un point de vue de la structure enzymatique, sont bien conservés et nous les retrouvons également dans la séquence de la protéine NR de la chicorée de Bruxelles.

La région molybdique montre des homologies avec la sulfite oxidase du poulet (Suox P) (*Gallus gallus*) (Neame et Barber, 1989) et du rat (Suox R) (Crawford *et al.*, 1988) présenté ci-dessous:

```

      * * . . * . . * * * . * * * * . . . . . * * * * * . . . . .
Suox P  103 RHPGL-RVNSQKPPNAEPPAELLAER-FLTPNELFFTRNHLVPVAVEPSSYRRLRVDGPG 160
Suox R  125 RHPAL-RINSQRPFNAEPP-PELLTESYITPNPIFFTRNHLVPVNLDPDPTYRLHVVGAPG 182
Nia     101 RNPSMVRLTGKHFPNSEPPLNKLMQHGFITPDPLHYVRNHGVPVNPATWEDWTVEICGL-V 159

      .. * . * . * * . * * * * * * * * . . . * . * . . . * * * *
Suox P  161 GRTLSTSLAELRSRFPKHEVTATLQCAGNRRSEMSRVRPVKGLPWDIGAISTARWGGASL 220
Suox R  183 GQSLSTSLDDL-HKFPKHEVTVTLQCAGNRRSEMKNVKEVKGLEWRTGAISTARWAGARL 241
Nia     160 KRPARFSMTQLVNEFPSREFPVTLVQCAGNRRKEQNLTQKQIGFNWGAAGISTSVWKGVPL 219

      . * . * . . . . . * * * * . * * . * * * * . * . . . * * * * * *
Suox P  221 RDVLLHAGFPEELQGGHEHVCFEGLDADP-GGAP-YGASIPYGRALSPAADVLLAYEMNGT 278
Suox R  242 CDVLAQAGHRLRETEA-HVCFEGLSDP-TGTA-YGASIPARAMDPQAEVLLAYEMNGQ 298
Nia     220 VHILKRCGIYSRKKGALNVCFEGAEDLPGGGGSKYGTSIKIEAMPARDIILAYMQNGE 279

      * . * * . * * * . . . * . * * * * . * . * * * . . * . . . *
Suox P  279 ELPRDRHFPVRVVVPGVVGARSVKWLRRAVSPDESISRWQQNDYKGFSPVDWD-T-VD 336
Suox R  299 PLPRDHGFVVRVVVPGVVGARHVKWLGRVSESESYSHWQRDRDYKGFSPVDWDTVDFD 358
Nia     280 KLSPDHGFVVRMIIPGFIGGRMVKWLKRIIVTTPESSESYHFKDNRVLPVSHVDAELANSE 339

      * * * . * * * . . . . . . . . . * * * * * . * * * *
Suox P  337 ---YRTAPAIQELPVQSAVTQP-RPGA-AV-P-PGE--LTVKGYAWSGGGREVVRVDV 385
Suox R  359 ---LAPS--IQELPIQSAITQP-QDGT-TVES--GE-V-IKGYAWSGGGRAVIRVDV 405
Nia     340 GWWYKPEYIINELNINSVITTPCHEEILPINSWTTQRPYTLRGYAYSGGKKVTRVEV 397

```

```

      ..*** **      * . .      * . * * * *      * . * * . * ***
Suox P   386 SLDGGRTWKVARI-MGDKAPP-GRAWAWALWELTVPV-EAGTELEIVCKAVDSSYNVQPD 442
Suox R   406 SMDGGLTWQEAEELEGEEQHPR--KAWAWRIWQLKAHVPAEQKELNII CKAVDSSYNVQPD 463
Nia      398 TMDGGETWNVCTLDHKEKPTRYAKYWCWCFWSLEVEVLDLLSAKEIAVRAWDETLNTQPD 457

      .      **** * . . .      * * .
Suox P   443 SVAPIWNLRGVLSTAWHR 460
Suox R   464 TVAPIWNLRGVLSNAWHRV 482
Nia      458 KL--IWNLMGMMNNCWFRV 474

```

(* indique une conservation parfaite de l'acide aminé, . indique une conservation partielle)

Concernant le domaine molybdique, deux cystéines sont proposées dans l'association avec le cofacteur MoCo de la sulfite oxydase (Neame et Barber, 1989). Nous retrouvons ces deux cystéines parmi les NR ainsi que dans la NR de la chicorée (Cys-185, Cys-226 [indiqué en gras ci-dessus]). La Cys-424 étant bien conservée parmi les NR pourrait intervenir dans la stabilisation de la liaison disulfure impliquée dans la structure en dimères de la protéine NR (indiquées en gras) (Hyde *et al.*, 1989). La cystéine (Cys-185 dans la chicorée) potentiellement impliquée dans la liaison avec le cofacteur MoCo (Barber et Neame, 1990) se trouve dans une région très bien conservée du domaine molybdoptérique des nitrate réductases et des sulfite oxydases.

Chez *Arabidopsis* il apparait qu'une mutation de la Glycine en position 308 (position 299 chez la chicorée, voir ci-dessous) en une Aspartate réduirait le taux de phosphorylation jusqu'à 85 % (LaBrie et Crawford, 1994). Cette Glycine est également localisée dans une région bien conservée comme nous l'indique l'alignement ci-dessous. Cette mutation serait responsable d'une perte de la conformation structurale de la protéine NR. Cependant les sites (des Ser) susceptibles de phosphorylation qui sont probablement localisés dans le domaine molybdique, restent encore à déterminer.

L'alignement de ces régions des différentes nitrate réductases est représenté ci-dessous :

	175	*		207	280	*		313
<i>C. intybus</i>	PSREFPVTLVCAGNRRKEQNLTKQTIGFNWGAA				KLSPDHGPFVRMIIPGFIGGRMVKWLKRIIVTTP			
<i>C. maxima</i>	RF****A*****MV**S*****				Q*****PQ			
<i>P. hybrida</i>	***L*****MV*****				**T*****L*****Q			
<i>N. tabacum 2</i>	*C**L*****MV*****				**A*****I*****K			
<i>N. tabacum 1</i>	****L*****MV*****				**A*****I*****K			
<i>L. esculentum</i>	*****MV*****				M*****K			
<i>S. oleracea</i>	Q*****M**S*****S*				*****Y*****T			
<i>B. pendula</i>	*****MV*K*****				R*****K			
<i>A. thaliana 2</i>	AY**AA*****MV*KSK**S*				Y*T*****I*****K			
<i>A. thaliana 1</i>	*****MV*****S*				L*****V*V*****PQ			
<i>H. vulgare 1</i>	*AA*V*A*****MVQ**V*****				P*L***Y***VL**C*****VR**V**A			
<i>H. vulgare 7</i>	QAV*****MVR*SS**PG				P*A*****V*V*****V*ACN			
<i>O. sativa</i>	*AV*I*****MVQ**V*****				P*L*****A**C*****V*****A			
<i>V. carteri</i>	**IT*C*****E*ML*KS*****PC				W*T*****SE*T**EV			
<i>A. niger</i>	DQITA*I*****TVRKS**S**S*				D*R***R*L*AVV**Q***S*****KL*I*DA			
<i>A. nidulans</i>	DQITA*I*****VVRKTK**S**S*				D*R***R*L*AVV**Q***S*****KL*I*DA			
<i>L. maculans</i>	ENVTY*****VVRKSK**A**S*				N**L**K*L*AVV**Q***S*****KL*V*AE			
<i>N. crassa</i>	DNVTY*****VLRKSK**S**S**G				N*H***R***VVV**Q***S*****V**KG			
<i>U. maydis</i>	Y*HPQTI*****MVAKGL*****				D*****Y*L*LVV**Q*S*****E**E*SDR			
Suox RAT	*KH*VT**Q*****S*M*KV*EVK*LE*RTG				P*PR*****VVV**VV*A*H***G*VS*ESE			
Suox Poulet	*KH*VTA**Q*****S*MSRVRPVK*LP*DIG				E*PR**R***VVV**VVGA*S*****R*VA*SPD			

(* indique une conservation parfaite de l'acide aminé)

Les deux histidines (His-569 et His-592 chez la chicorée, indiquées en gras ci-dessous) impliquées dans la liaison du ligand avec le fer hémique (Guiard et Lederer, 1979) sont également retrouvées et bien conservées comme nous l'indique l'alignement entre la région hémique de la protéine NR et le domaine catalytique de la cytochrome b5 du poulet (Cytb5P) et du rat (Cytb5R).

```

      . . . * * * . . . . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
Cytb5P  17 YRLEEVQKHNSQSTWIIVHHRIYDITKFLDEHHPGGEEVLREQAGDATENFEDVGHSTD 76
Cytb5R  12 YRLEEVAKRNTAEEETWMMVIHGRVYDITRFLSEHHPGGEEVLLEQAGADATESFEDVGHSPD 71
Nia     537 FTMSEVKKHNSADSAWIVVGHGIYDCTSFLKDHHPGGSDSILLNAGTDCTEEFDAI-HSDK 595

      * . . * . * . * . .
Cytb5P  77 ARALSETFIIIGEL 89
Cytb5R  72 AREMLKQYYIGDV 84
Nia     596 AKKLLLEEYRVGEL 608
  
```

La région flavinique montre également une homologie importante avec la séquence en acides aminés de la cytochrome b5 réductase humaine (Yubisui *et al.*, 1984).

```

      * . . . * * . * . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
Cytb5r  29 STPAITLESPDIKYPLRLIDREIISHDTRRFRFALPSPQHILGLPVGQHIYLSARIDGNL 88
Nia     653 LIPKEIAPTRREKIPCKLISKTSVSHDVRFLFRFALPSPDQVLGLPVGKHFVVCATIDDKL 712

      . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
Cytb5r  89 VVRPYPTPISSDDDKGFVDLVIKVYFKDTHPKFPAGGKMSQYLESQIGDTIEFRGPPSGLL 148
Nia     713 CMRAYTPTSTIDEVGYFELLVKIYFKGVEPKFPNGGLMSQHLESMELGSSIEIKGPLGHI 772

      * . * . * . . * . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
Cytb5r  149 VYQGKGFAIRPDKSNPIIRTVKSVGMIAGGTGITPMLQVIRAIM-KDPDDHTVCHLLFA 208
Nia     773 EYMGRGTFSVH-GKQ-K-FAR--K-LAMFAGGTGITPDLSSD-ASYLKDPEDDTEMYVVYA 826

      * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
Cytb5r  209 NQTEKDILLRPELEELRNKHSARFKLWYTLDRA-PEAWDYGGFVNEEMIRDHLPPPEEE 267
Nia     827 NRTEDDILLREELDAWADKYSDRVKVVVVAKSIREGWKYSEGFITEDIMREHVPEVSED 886

      * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
Cytb5r  268 PLVLMCGPPPMIQYACLPNLDHVG 291
Nia     887 TLALACGPPPMIQFAINPNLEKMG 911
  
```

Des arginines (R) semblent être nécessaires à l'activité catalytique des domaines à FAD et MoCo (Baijal et Sane, 1988). Deux arginines sont bien conservées parmi les NR. Chez la chicorée nous les trouvons en positions 715 et 877 [indiquées en gras ci-dessus].

Une lysine et une cystéine jouent un rôle essentiel dans la liaison du NADH et la cytochrome b5 réductase (Hackett *et al.*, 1986; 1988). Cette lysine est bien conservée parmi les NR et se situe à la position 734 chez la chicorée. Par contre aucune des NR ne possède la cystéine de la cytochrome b5 réductase. La cystéine (Cys-892) située au bord d'une séquence bien conservée, **CGPPPMI** qui paraît constituer le résidu thiol impliqué dans la liaison de la nitrate réductase avec le NADH, comme l'ont proposé Barber et Solomonson (1986) et plus récemment Dwivedi *et al.* (1994). Cette Cys ne semble pas être essentielle, mais est probablement importante pour un transfert efficace d'électrons (Lu *et al.*, 1994).

Plus récemment Lu *et al.* (1994) ont, par cristallographie, analysé la structure du domaine à FAD de la nitrate réductase de maïs. Ils ont ainsi pu déterminer les acides aminés et

leurs interactions impliqués dans la liaison avec les cofacteurs NADH, NADPH et FAD. Ces sites sont bien conservés parmi les NR de différentes espèces.

Les NR:NADH possèdent un acide aminé ayant une charge négative (Asp, Glu) qui serait impliqué dans la liaison avec le cofacteur NADH. Par contre, les NR:NADPH possèdent un acide aminé ayant une charge positive (Lys, Arg, His), tandis que chez les NR:NAD(P)H bispécifiques le résidu impliqué dans la liaison serait soit une sérine soit une thréonine suivies par une lysine ou une glutamine (Lu *et al.*, 1994).

Le tableau ci-dessous résume les données de Lu *et al.*.

Enzyme	Résidu		Charge totale
	205*	206*	
NADH:NR	D, E	neutre	négative
NADPH:NR	K, R, H	neutre	positive
NAD(P)H:NR	S, T	K, Q	évitent une charge négative

(* Les numéros correspondent aux acides aminés Asp205-Gln206 de la nitrate réductase de maïs, selon Lu *et al.* (1994).)

Une analyse de la nature de ces résidus dans différentes NR, dans des cytochrome b5 réductases NADH spécifiques, ainsi que dans l'oxydo-réductase FAD/NADPH spécifique de la levure, nous a fourni les résultats suivants:

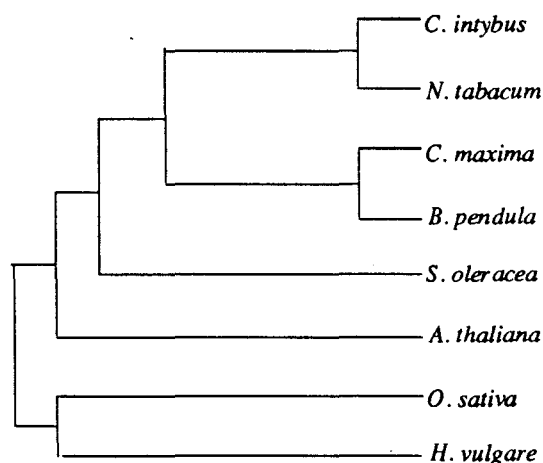
ESPÈCE	ENZYME	RÉSIDUS/POSITIONS
<i>C. intybus</i>	NADH:NR	Lys 858 - Ser 859 *
<i>C. maxima</i>	NADH:NR	Glu 856 - Ser 857
<i>P. hybrida</i>	NADH:NR	Asp 847 - Ser 848
<i>N. tabacum</i>	NADH:NR	Asp 842 - Ser 843
<i>L. esculentum</i>	NADH:NR	Glu 849 - Ser 850
<i>S. oleracea</i>	NADH:NR	Glu 864 - Lys 865 **
<i>B. pendula</i>	NAD(P)H:NR	Glu 836 - Ser 837
<i>A. thaliana (nia 2)</i>	NADH:NR	Glu 854 - Ser 855
<i>A. thaliana (nia 1)</i>	NADH:NR	Gln 855 - Ile 856
<i>H. vulgare (nia 2)</i>	NADH:NR	Asp 847 - Gln 848
<i>H. vulgare (nia 7)</i>	NAD(P)H:NR	Ser 825 - Lys 826
<i>P. vulgaris (nia 1)</i>	NAD(P)H	Gln 818 - Ala 819
<i>O. sativa</i>	NADH:NR	Asp 851 - Gln 852
<i>L. japonicus</i>	NADH:NR	Glu 837 - Thr 838
<i>Z. mays</i>	NADH:NR	Asp 555 - Gln 556
<i>V. carteri</i>	NADH:NR	Ser 801 - Gln 802 **
<i>E. niger</i>	NADH:NR	Thr 813 - Lys 814 *
<i>A. nidulans</i>	NADH:NR	Thr 808 - Lys 809 *
<i>L. maculans</i>	NADH:NR	Thr 835 - Gln 836 **
<i>N. crassa</i>	NADPH:NR	Ser 920 - Arg 921 *
<i>U. maydis</i>	NADH:NR	Ser 834 - Asn 835 **
<i>rat</i>	NADH:cytb5réd	Asp 839 - Lys 840**
<i>bovin</i>	NADH:cytb5réd	Asp 239 - Lys 240**
<i>humain</i>	NADH:cytb5réd	Asp 239 - Lys 240**

[* indique une charge positive, ** = neutre]

La lecture du tableau montre que les conceptions de Lu *et al.* ne sont pas toujours vérifiées. Ainsi, la nitrate réductase de la chicorée qui est une NADH:NR (Chraïbi, 1988), devrait donc selon Lu *et al.*, posséder un acide aminé ayant une charge négative suivi d'un résidu neutre, au site de liaison. Cependant nous retrouvons une lysine suivie d'une sérine. La présence de cette charge positive indiquerait une NADPH:NR. La nitrate réductase de l'épinard, qui est également une NADH:NR, possède effectivement un acide glutamique, mais il est suivi par une lysine. Par alignement de la NR bispécifique (NAD(P)H:NR) du bouleau nous trouvons un acide glutamique suivi d'une sérine, indiquant plutôt une spécificité envers le NADH et éliminant la probabilité d'une NR bispécifique. Un décalage dans l'alignement permettrait de corréliser la spécificité bispécifique de la NR du bouleau avec la présence d'une sérine suivie d'une lysine. De même, la nitrate réductase de *Volvox carteri* est une NADH:NR et nous ne trouvons pas de charge négative dans le site impliqué dans liaison avec le cofacteur, mais une Ser et une Gln qui seraient caractéristiques d'une NR bispécifique.

Chez les champignons *Aspergillus niger* et *Emmericella nidulans* les NR sont également spécifiques pour le NADH alors que selon les critères définis par Lu *et al.*, elles seraient des NADPH:NR. Concernant les NR de *Leptosphaera maculans* et d'*Ustilago maydis* aucune charge (négative ou positive) n'est présente, elles devraient donc être bispécifiques alors qu'elles sont toutes deux spécifiques pour le NADH. Les cytochrome b5 réductases NADH spécifiques présentent toutes une Asp, donc une charge négative, comme proposé par Lu *et al.*, mais elle est suivie par une Lys ayant une charge positive indiquant une spécificité pour le NADPH. Toutes ces exceptions indiquent que les données de Lu *et al.* (1994) établies à partir de l'étude de la structure de la NR de maïs ne doivent être généralisées et demandent à être vérifiées chez d'autres espèces.

En conclusion, on peut dire que les caractéristiques des différents domaines ainsi que l'alignement des nitrate réductases de différentes espèces (Annexe 2, p. 127) indiquent une bonne conservation au cours de l'évolution. La comparaison des homologies des NR de différentes espèces peut être représentée par le dendrogramme ci-dessous:



Par comparaison des séquences en acides aminés, la NR de *Cichorium intybus* (Asteridae, Asteraceae, Asterales) se rapproche le plus de la NR de *Nicotiana tabacum* (Asteridae, Polemonales, Solanaceae), elles appartiennent toutes deux au même ordre: celui des Asteridae. Les NR des Poales (*Oryza sativa* et *Hordeum vulgare*) sont le plus éloignées de celle de la chicorée. Ces résultats correspondent bien au diagramme phylogénique (Stebbins, 1974) présenté dans l'annexe 4.

4. LA RÉPARTITION DE L'ACTIVITÉ NITRATE RÉDUCTASE

4.1. L'apport énergétique à la réduction du nitrate

Comme nous l'avons mentionné dans l'étude bibliographique, la croissance des plantes supérieures est corrélée aux activités assimilatrices et à la localisation de la réduction du nitrate. Les plantes à croissance rapide ont généralement une capacité d'absorption du nitrate élevée (Garnier *et al.*, 1989). L'assimilation d'une mmole de nitrate en 1 mmole glutamate consomme 1 mmole NADH, 8 mmoles ferredoxines réduites et 1 mmole d'ATP, soit l'équivalent de 20 mmoles d'ATP; ce qui représente environ le double de l'énergie nécessaire à la réduction d'une mmole de CO₂ qui nécessite 3 mmoles d'ATP + 2 mmoles de NADPH+H⁺ soit l'équivalent de 11 mmoles d'ATP. Chez les plantes à croissance rapide l'ANR est donc très souvent localisée dans les organes photosynthétiques et n'entre pas en compétition avec la réduction du CO₂ (Robinson, 1988).

Chez les plantes à croissance lente, comme les ligneux, la localisation de la réduction est matière à controverse. Selon certains auteurs, les activités de réduction sont élevées dans les feuilles (Klepper et Hageman, 1969; Smirnoff *et al.* 1984), pour d'autres, la réduction a lieu dans les racines (Gojon *et al.*, 1994). Selon Gutschick (1981) le coût énergétique de la réduction et de l'assimilation dans les feuilles ne représente que 25 à 50% de celui nécessaire à la réduction et à l'assimilation dans la racine. En effet, dans les feuilles, l'ATP et le pouvoir réducteur sont fournis directement par les réactions lumineuses; dans les racines, l'énergie et le pouvoir réducteur dont une partie sera utilisée pour assimiler le nitrate, dépendent de l'import des assimilats photosynthétiques qui doivent être déchargés puis transportés dans les différents compartiments cellulaires où ils seront oxydés. Ces différences métaboliques, pourraient expliquer le ralentissement de la croissance lorsque le nitrate est assimilé dans les racines.

Bien que la plupart des plantes expriment la NR dans les tissus photosynthétiques, la répartition de l'assimilation du nitrate entre la racine et les feuilles varie de façon importante selon l'âge et la concentration externe en nitrate chez les non-légumineuses des régions tempérées. Ainsi, quand la concentration externe en nitrate est grande, l'assimilation devient plus importante dans les racines (Andrews *et al.*, 1986).

Contrairement à d'autres *Asteracea* comme la laitue ou la scarole (*C. endiviae* L.), la chicorée de Bruxelles n'accumule pas de nitrate dans ses feuilles et sa croissance initiale est relativement lente. Jeunes, les feuilles accumulent du saccharose, et des fructosanes lorsqu'elles vieillissent. Pendant sa première année de végétation, la chicorée développe un appareil végétatif réduit à une rosette d'une vingtaine de feuilles, une racine tubérisée qui au cours de sa maturation accumule des fructosanes de type inuline et de l'arginine (70-75% de l'azote aminé en fin de végétation, Limami *et al.*, 1993). Au stade

jeune plantule, elle présente, quant à la réduction du nitrate, des caractéristiques d'une plante à croissance lente. Puis lorsque un cambium se forme et provoque le grossissement du pivot qui acquiert des fonctions de stockage, l'activité NR apparaît dans les feuilles (Dorchies et Rambour, 1985). Il est donc possible que l'expression du gène *nia* soit régulée au cours du développement de la chicorée.

Dans nos conditions expérimentales, les jeunes plantules mises en culture sur un milieu contenant de l'ammonium comme seule source azotée, présentent de faibles activités NR ainsi qu'une faible expression du gène *nia* dans les feuilles et dans les racines. Cette expression constitutive du gène *nia* a également été observée chez quelques espèces (pour revue, voir Kleinhofs et Warner, 1990). Après transfert sur un milieu avec nitrate, l'activité NR dans les racines ainsi que l'expression du gène *nia* sont déjà induites après 30 minutes. Les activités transcriptionnelles et enzymatiques les plus élevées sont trouvées pour une concentration de 5 mM de nitrate. De plus la modification de la concentration en nitrate n'influence pas l'activité NR dans les feuilles et corrélativement le nitrate n'induit pas le gène *nia* dans les feuilles. Nous pouvons donc conclure que quelle que soit la dose de nitrate fournie aux jeunes plantules, l'activité NR reste principalement localisée dans la racine. Ceci ne ressemble pas à la situation observée chez le haricot (Hoff *et al.*, 1991) où deux gènes NR sont présents, l'un étant spécifique des feuilles et l'autre des racines.

Chez la chicorée de Bruxelles nous avons identifié un gène *nia* par génome haploïde, régulé chez la jeune plantule d'une façon spatio-temporelle. Ensuite, l'activité enzymatique se déplace de la racine vers les feuilles au cours de la tubérisation de la racine (Dorchies et Rambour, 1985). De plus il existe, dans la racine, une expression spatiale du gène *nia* en fonction de la concentration en nitrate. L'hybridation *in situ* effectuée dans les tissus racinaires de jeunes plantules mises en culture sur un milieu à faible concentration en nitrate (200 μ M) permet de mettre en évidence, une expression du gène *nia* dans toutes les cellules du cortex, ainsi que dans l'apex racinaire. Par contre, en présence de 5 mM de nitrate, l'expression est principalement localisée dans la stèle et dans l'apex racinaire. Bien que nous n'ayons pas procédé à des essais d'immunolocalisation de la protéine NR, il est vraisemblable qu'une synthèse importante de NR est induite dans ces conditions. Même si dans certains cas, il a été démontré que seulement 2% de l'activité NR potentielle mesurée *in vitro* est utilisée *in planta* (Warner et Kleinhofs 1981; Pace *et al.* 1990) l'augmentation globale de l'ANR dans les racines de chicorée peut raisonnablement être liée à une augmentation d'une synthèse de la protéine NR. Ces résultats sont en accord avec ceux de Long et Oaks (1990) qui ont montré chez le maïs une forte activité NR dans la stèle et se rapprochent également des observations de Fedorova *et al.* (1994) qui, par immunocytochimie, montrent que la NR est localisée dans l'épiderme, les cellules corticales mais aussi dans le péricycle et le parenchyme

vasculaire de racines de maïs cultivés en présence de 10 mM de nitrate. Rufty *et al.* (1986) ont par contre observé une concentration extrêmement importante de la protéine NR dans les cellules épidermiques. Selon Federova *et al.*, les différences entre leurs résultats et ceux de Rufty *et al.* s'expliquent par des différences dans l'approche expérimentale: en effet Rufty *et al.* enlèvent les feuilles avant de procéder au traitement par le nitrate et déposent sur la surface coupée de la racine un coton sec destiné à absorber les exsudats; dans ces conditions, les échanges source-puits ainsi que l'expression de la NR seraient perturbés. Les conditions expérimentales que nous avons utilisées sont similaires à celles employées par Federova *et al.* (1994) qui travaillent également sur des plantes entières, ce qui expliquerait la concordance entre nos résultats et les leurs. Par ailleurs, la localisation de l'expression du gène *nia* dans la stèle est en accord avec les résultats de Rastogi *et al.* (1993). Ces auteurs ont transformés des plantes de tabacs par une construction comprenant le gène *uidA* contrôlé par le promoteur de la nitrite réductase et montré que l'expression GUS était surtout présente dans les cellules du cortex et du cylindre central. Or on sait que la NR et la NiR sont corrégulées et que le nitrate induit également le gène NiR (Faure *et al.*, 1991).

Par contre nos résultats ne concordent pas avec les observations de Oaks (1994), qui rapporte que, dans les plantes qui assimilent le nitrate dans la racine, la réduction du nitrate et son assimilation se déroulent dans les régions différenciées et non dans l'apex de la racine. Chez la chicorée, l'apex racinaire des jeunes plantules contribue pour 40 % de l'activité NR racinaire globale et l'expression du gène *nia* y est intense.

Cependant la répartition des activités de réduction du nitrate est différente chez le maïs et le chicorée. En effet chez cette dernière, l'activité NR est localisée dans la racine de la jeune plantule alors que dans les plantules de maïs âgées de 6 jours, la racine ne participe que pour un tiers de l'activité NR lorsque le traitement est effectué avec une solution de nitrate à 0,5 ou 1 mM; elle atteint par contre 50% de l'activité totale en présence de 5 ou 10 mM de nitrate (Federova *et al.*, 1994). Par conséquent, l'apport de nitrate à forte concentration pourrait engendrer un flux accru de nitrate dans le symplasme de la racine et induire un mécanisme primaire identique: une synthèse de NR. Cette hypothèse émise dès 1976 par Shaner et Boyer, sur l'induction de l'ANR par le flux de nitrate a été reprise depuis par de nombreux auteurs (Li et Oaks, 1993; pour revue voir Touraine *et al.*, 1994). Ceci impliquerait l'existence d'un "senseur" de nitrate qui, par transduction, activerait les gènes *nia* (Redinbaugh et Campbell, 1991). Si ce senseur fonctionne essentiellement dans les cellules apicales et dans la stèle il faudrait admettre que son affinité pour le nitrate n'est pas particulièrement élevée.

Cependant chez la chicorée, l'accroissement de la teneur en nitrate du milieu de culture n'entraîne pas d'augmentation de l'activité NR dans la feuille. On peut donc se demander si en plus des flux de nitrate, d'autres facteurs n'induisent pas une augmentation de l'activité NR et de l'expression du gène. L'afflux de saccharose dans la racine, pourrait

constituer un signal inducteur *per se*. En effet, des effets de stimulation de la transcription des gènes *nia* par le saccharose ou par le glucose et le fructose ont été décrits chez *Arabidopsis thaliana* (Cheng *et al.*, 1992) et chez *Nicotiana plumbaginifolia* (Vincentz *et al.*, 1993). Ou bien le saccharose constitue un potentiel énergétique, fournissant les squelettes carbonés ainsi que le pouvoir réducteur nécessaires à la réduction et à l'assimilation du nitrate.

Synthétisé dans les feuilles, le saccharose qui est la forme la plus commune de transport des sucres dans la plante, est transféré vers l'apoplasme puis activement chargé dans le phloème (Van Bel, 1993) acheminant ainsi le potentiel énergétique et les squelettes carbonés vers les puits. Ce transport est en relation directe avec la force d'appel des puits, donc avec les cinétiques de déchargement du saccharose des vaisseaux phloémiens dans les cellules parenchymateuses voisines. Ces effets de chargement et de déchargement du saccharose des vaisseaux conducteurs sont déterminés par les concentrations et/ou les gradients osmotiques (Willmitzer *et al.*, 1993). Dans les jeunes plantules de chicorée, il faudrait vérifier que ce gradient chimique et osmotique est créé par la métabolisation et/ou par le stockage du saccharose dans les vacuoles. Le glucose catabolisé par la voie de la glycolyse fournirait le pouvoir réducteur dans le cytoplasme à la NR, soit directement soit indirectement par des systèmes navettes (Lee, 1980).

Il est parfaitement concevable que la fourniture d'une concentration élevée en nitrate induise, dans la stèle, une synthèse de la protéine NR là où l'ensemble de la voie d'assimilation disposerait localement d'une source importante de pouvoir réducteur, d'énergie et de squelettes carbonés. Ce schéma est en accord avec des résultats obtenus par Pace *et al.* (1990) qui ont montré que, chez le maïs, l'absorption et la réduction du nitrate sont essentiellement régulés par la fourniture en squelettes carbonés et en énergie. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait doser les modifications de la teneur en mono- et disaccharides, ainsi que les activités des enzymes du métabolisme glucidique dans la racine. D'autre part l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique couplée à l'utilisation de $^{15}\text{NO}_3^-$ permettrait de voir si le flux de nitrate et la compartimentation de l'azote sont modifiés.

Des travaux récents montrent que l'activité NR est régulée par des réactions réversibles d'activation-désactivation de la NR, et non pas par sa synthèse *de novo*. En effet les travaux de Kaiser et Spill (1991) concernant la régulation de l'activité NR de feuilles d'épinard ont montré que la kination de la protéine la rendait inactive et que sa déphosphorylation la réactivait, les nucléotides adényliques étant les facteurs modulant l'activité lors de la transition lumière-obscurité (Huber *et al.*, 1992 a et c; Kaiser *et al.*, 1992). Ces réactions de phosphorylation-déphosphorylation semblent également opérer dans les racines de pois: mises en anaérobiose, leur teneur en ATP diminue et l'ANR augmente; par contre, un traitement par l'acide okadaïque, qui est un inhibiteur des phosphatases de type 1 et 2A, empêche l'augmentation de l'ANR. En aérobie

l'incubation de racines en présence de mannose qui piège les groupements phosphates, provoque également une augmentation de l'ANR. Par conséquent une modulation rapide de l'ANR lors du passage aérobie-anaérobie, passerait par des réactions réversibles d'activation-désactivation. Cependant les facteurs responsables de ce mécanisme de régulation ne sont pas connus et, dans les conditions normales, ne semblent pas être les nucléotides adényliques (Glaab et Kaiser, 1993). Ces réactions de phosphorylation-déphosphorylation modulent aussi l'activité de la SPS dans les feuilles d'épinard à la lumière (Huber et Huber, 1992 b).

Chez la chicorée, nous avons montré l'inactivation de l'activité SPS par phosphorylation. Les résultats concernant une possible régulation de la NR de chicorée par ce type de mécanisme sont moins convaincants. Cependant, dans la mesure où les hybridations *in situ* montrent une augmentation de l'expression du gène *nia* dans les racines mises en présence de nitrate 5mM, il est probable que l'accroissement de l'activité NR n'est pas pour l'essentiel, lié à des réactions de déphosphorylation de l'enzyme. Par contre l'influx de nitrate pourrait modifier le métabolisme glucidique. En effet le traitement de feuilles de blé préalablement carencé en nitrate par une solution 40mM de nitrate provoque une surproduction d'acides aminés, une inhibition de la synthèse de saccharose et une diminution de la teneur en phosphoénolpyruvate (Van Quy *et al.*, 1991a). Le nitrate induirait une phosphorylation de la SPS et de la PEPCase, la première devenant inactive, la seconde active (Champigny et Foyer, 1992). En plus des mesures de fluctuations des activités des invertases, SS, SPS dans les racines de chicorée soumises à divers régimes de nutrition azotée, il faudrait reprendre de façon plus systématique les expériences d'activation-désactivation de la NR.

4.2. Interaction ABA-ANR

L'addition d'ABA provoque une augmentation de l'activité NR dans la racine des jeunes plantules de chicorée et ne modifie pas celle des feuilles qui reste extrêmement faible.

Alors que selon Vreugdenhil (1983) l'ABA inhiberait le chargement du saccharose dans le phloème, de nombreux travaux montrent qu'au contraire il favorise le transport des sucres vers le puits, ainsi que leur absorption et leur stockage. Chez la betterave sucrière le transport des sucres vers la racine est accru et le stockage et l'absorption du saccharose sont augmentés par addition d'ABA exogène (Wyse et Saftner, 1982). De même l'absorption et le stockage du saccharose dans les graines de soja (Brun *et al.*, 1985; Gifford et Thorne, 1985), la vigne (During et Alleweldt, 1980), le pois (Ross *et al.*, 1987) et le haricot (Clifford *et al.*, 1986) sont augmentés dans des plantes traitées par l'ABA. Si le transport des sucres vers la racine est augmenté par l'ABA, on peut également envisager qu'une disponibilité accrue en substrats carbonés

oxydables induise une augmentation de l'activité NR dans les racines des jeunes plantules de chicorée.

De nombreux travaux effectués en particulier par les groupes de Aslam, Jackson et Champigny (voir par exemple Aslam et Huffaker, 1984; Pace *et al.*, 1990; Van Quy *et al.*, 1991b) ont montré une corrélation étroite entre la disponibilité en énergie, réducteurs et squelettes carbonés aussi bien dans des tissus photosynthétiques que non photosynthétiques comme les tissus racinaires.

Lorsque nous avons abordé l'étude de la régulation de l'activité NR par le nitrate et l'ABA, nous avons privilégié ce type d'hypothèse dans la mesure où des résultats obtenus dans le laboratoire avec des suspensions cellulaires de chicorée, pouvaient l'avérer. En effet des observations fortuites, avaient montré que des retards de croissance de suspensions cellulaires de *Silene alba* L., de carotte (Rambaud et Rambour, 1989) ou de chicorée étaient accompagnés d'une augmentation de l'ANR. Cette augmentation se retrouve lorsque la croissance de suspensions cellulaires de chicorée est inhibée par de l'ABA 10^{-4} M (Chraïbi, 1988).

Malgré l'inconvénient de l'utilisation d'une concentration importante d'ABA, on disposait alors d'un système dont la source carbonée unique est le saccharose, dans lequel les corrélations entre organes étaient supprimées et où la croissance n'exerçait pas de force d'appel sur le nitrate.

L'utilisation de $^{15}\text{NO}_3^-$ a montré que l'ABA diminuait l'absorption du nitrate et que les activités NR mesurées *in vivo* et *in vitro* étaient augmentées (Chraïbi, 1988). Dans ces conditions, une induction de l'ANR par le flux de nitrate était improbable et l'hypothèse d'une régulation de l'assimilation du nitrate par la disponibilité en pouvoir réducteur et en énergie devenait plausible. Nous avons voulu reprendre certains aspects de ce travail et analyser d'une part les activités des enzymes du métabolisme du saccharose et, d'autre part l'expression des gènes *nia* et invertase pour lesquels nous disposions d'une sonde. Contrairement aux résultats obtenus chez l'orge par Lu *et al.* (1992) qui ont montré une baisse de l'activité transcriptionnelle du gène *nia* par un apport exogène d'ABA, aucune intervention de l'ABA au niveau transcriptionnel n'a pas pu être mise en évidence dans les cellules de chicorée. On peut supposer qu'il existe une régulation différente des gènes *nia* selon les espèces comme c'est le cas pour ceux codant pour la SPS (Huber et Huber, 1992 a).

Divers travaux ont montré que l'acide abscissique peut avoir un effet inhibiteur de la production ou de l'utilisation du saccharose (Sharkey *et al.*, 1985). Chez la chicorée l'ABA (10^{-4} M) exerce une inhibition très prononcée sur les activités invertase, saccharose synthase et saccharose phosphate synthase. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec les variations des teneurs en sucres intra- et extracellulaires. En effet dans les cultures témoins, le saccharose est rapidement hydrolysé en glucose et fructose. Cette

réaction est parfaitement bien corrélée aux modifications de l'activité invertasique acide, qui atteint son maximum au troisième jour, pour diminuer ensuite. Ceci signifie que l'activité d'une invertase pariétale est importante en début de culture.

En présence d'ABA, l'hydrolyse du saccharose du milieu de culture est ralentie et là encore une nette diminution de l'activité invertasique rend parfaitement bien compte de cette diminution.

L'hydrolyse du saccharose peut aussi être le résultat de l'activité SS. Dans les cellules de chicorée les profils de l'activité SS sont semblables à ceux de l'activité invertasique et présentent également un maximum au troisième jour de culture. Cependant cette activité est environ huit fois moindre que celle de l'invertase; elle pourrait catalyser le clivage du saccharose dans le cytoplasme. En présence d'ABA cette activité est également inhibée de façon durable. Cette inhibition est logique dans la mesure où la saccharose synthase produit de l'UDP-Glucose qui sera utilisé dans la synthèse des polysaccharides pariétaux (ap Rees, 1988). Que l'activité SS soit diminuée n'est donc pas étonnant puisque la croissance cellulaire est ralentie et que le besoin en polysaccharides est diminué.

La SPS catalyse la réaction de synthèse du saccharose-P à partir de l'UDP-Glc et du fructose intracellulaire et l'on observe également une accumulation transitoire de saccharose dans les cellules témoins. Dans la mesure où l'ABA ralentit la croissance, et que la teneur en saccharose intracellulaire baisse, on assiste donc à une diminution logique de l'activité de la SPS ce qui semble être corrélé à la baisse de l'activité de la SS qui produit de l'UDP-Glc. Par conséquent l'ajout d'ABA au milieu de culture induit une diminution de toutes les activités enzymatiques concernées par le catabolisme aussi bien que l'anabolisme du saccharose, alors que paradoxalement l'ANR est augmentée. On peut donc se demander comment l'ANR est augmentée, lorsque le métabolisme du saccharose est apparemment réduit.

Nous avons montré l'existence d'un certain parallélisme entre les variations de l'ANR et celles de l'invertase, de la SS et de la SPS en absence d'ABA.

Considérant les mesures des teneurs en sucres intra- et extracellulaires, on peut essayer d'établir un bilan grossier de l'utilisation des sucres en relation avec la croissance. Au troisième jour, le bilan est approximativement identique, que la culture ait été faite en présence ou en absence d'ABA. Par contre il semble que pendant les deux premiers jours de la culture, les cellules cultivées en présence d'ABA aient consommé plus d'équivalents de monosaccharides. On peut donc penser que le surplus de monosaccharides utilisés par les cellules cultivées en présence d'ABA fournit le pouvoir réducteur et l'énergie nécessaires à l'activité NR et à l'assimilation du nitrate. En présence d'ABA, il n'y aurait donc pas d'accumulation transitoire de saccharose, puisque les squelettes carbonés seraient utilisées pour incorporer l'azote ammoniacal produit. Si des expérimentations beaucoup plus précises confirmaient ce point, il serait sans doute

judicieux d'analyser les fluctuations de la fructose-1,6-bisphosphatase, qui joue un rôle important dans le métabolisme du saccharose (Daie, 1993; Harn *et al.*, 1993). Comme la NR, cette enzyme est cytosolique et est sensible à l'ABA dans certains tissus (Cheikh et Brenner, 1992). Il n'en reste pas moins vrai que le calcul d'un bilan vrai reste nécessaire et qu'il faudrait utiliser du saccharose marqué, afin d'évaluer les flux et les compartimentations des sucres.

Des dosages de la teneur en nucléotides adényliques n'ont pas permis de déceler de différences significatives dans les cellules cultivées en présence ou en absence d'ABA (Chraïbi *et al.*, 1994). Il ne nous est donc pas possible, pour l'instant, de nous prononcer sur une intervention éventuelle de l'ABA sur les mécanismes de phosphorylation ou de déphosphorylation de la NR de chicorée.

Nous serons donc amené à analyser de façon beaucoup plus fine le métabolisme carboné, et à corrélérer les fluctuations des flux de saccharose aux activités enzymatiques mesurées. Il est très probable que la régulation coordonnée des métabolismes carbonés et azotés est le résultat de plusieurs mécanismes intervenant au niveau transcriptionnel et/ ou au niveau post-traductionnel. Si certains mécanismes opérant après la traduction sont actuellement clairement identifiés, il n'en est pas de même pour ceux qui régulent la transcription; le clonage et la caractérisation du promoteur sont par conséquent plus que jamais nécessaires pour essayer de comprendre comment le gène *nia* est régulé chez la chicorée.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La nitrate réductase est une enzyme bien étudiée chez plusieurs espèces. Sa régulation par divers facteurs comme la lumière, le nitrate, a fait l'objet de nombreuses recherches. Par contre sa régulation par les hormones a été beaucoup moins abordée. Comme ce dernier aspect est l'un des thèmes de recherche développé au laboratoire, le clonage et la caractérisation du (des) gène(s) de la nitrate réductase de *Cichorium intybus* L. var. Witloof et plus particulièrement de son (leurs) promoteur(s) a été entrepris.

Dans un premier temps nous avons isolé et séquencé un ADNc NR correspondant à la région flavinique de l'enzyme. Une hybridation moléculaire sur l'ADN génomique en utilisant la sonde ADNc nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un seul gène *nia* par génome haploïde de *Cichorium intybus* L. var. Witloof. Nous ne pouvons cependant pas statuer définitivement sur l'existence d'un gène *nia* unique, car la sonde utilisée pourrait avoir un taux d'homologie trop faible par rapport à un deuxième gène *nia* potentiel. Une confirmation de ce résultat, déterminant le nombre de gènes *nia* chez la chicorée, reste à effectuer.

Puis par réaction de polymérisation en chaîne, nous avons isolé le gène complet en quatre étapes. Cette approche a été utilisée afin d'amplifier des fragments de taille moyenne et surtout d'obtenir des fragments chevauchants.

Le séquençage du gène *nia* de la chicorée nous a révélé qu'il est constitué de 5222 bp, et qu'il possède trois introns, situés dans la partie molybdique de la protéine (Annexe 1). L'emplacement des introns est très bien conservé parmi les gènes *nia* des plantes supérieures, mais leurs tailles, ainsi que leur nombre peuvent varier. Chez la chicorée le premier intron du gène *nia* contient 268 bp, le deuxième 778 bp et le troisième 1410 bp. Ainsi par déduction la taille de la région codante est de 2,76 Kb codant pour une protéine de 920 acides aminés ayant un poids moléculaire de 103 kDa.

La PCR inverse nous a permis d'isoler la partie 3' non-codante du gène *nia*. Dans la région 3' deux signaux de polyadénylation ont été retrouvés aux positions +52 et +152. Les deux éléments FUE situés respectivement à 30 et à 53 bp des signaux de polyadénylation peuvent augmenter le signal de polyadénylation. Concernant le stop codon ambre TAG, il n'est observé que dans 18 % des cas chez les végétaux. Par contre la présence d'une adénine en position +1 pourrait accentuer l'action du stop codon.

La comparaison de la séquence en acides aminés avec celle de nitrate réductases d'autres espèces a révélé un pourcentage d'homologie de l'ordre de ± 76 %. Il apparaît également que parmi les trois régions de la protéine, la région molybdique est la mieux conservée.

L'étude que nous avons menée ouvre beaucoup de perspectives. Dans un premier temps l'isolement et l'analyse du promoteur *nia* nous paraît indispensable. Pour cela la construction et le criblage d'une banque génomique peuvent être envisagés ou bien l'utilisation de la PCR inverse permettra également l'isolement de la partie régulatrice du

gène *nia*. Ensuite la construction de gènes chimériques constitués de la région promotrice du gène *nia* et d'un gène marqueur (*uidA*) et l'introduction dans la chicorée via *Agrobacterium tumefaciens* permettra une analyse plus facile et plus précise de la régulation spatiale du gène *nia* chez la chicorée.

L'isolement de l'ADNc NR correspondant à la région flavinique de la protéine, nous a permis d'étudier la régulation transcriptionnelle du gène *nia* chez la chicorée. Dans un premier temps l'induction de la NR par son substrat a été étudiée. Ainsi, le nitrate induit la nitrate réductase tant au niveau enzymatique que transcriptionnel et ceci déjà après une incubation de 30 minutes en présence de nitrate. Contrairement aux observations faites chez la plupart des espèces végétales, cette induction n'est observée que dans les racines de la jeune plantule. Chez certaines espèces la teneur en nitrate du milieu peut modifier la localisation de la réduction du nitrate qui s'effectue alors principalement dans la racine. Ceci peut s'expliquer par l'activation d'un deuxième gène *nia* spécifique de la racine. C'est pour cette raison que nous avons étudié l'effet de diverses doses de nitrate sur des jeunes plantules de chicorée afin de voir si nous pouvions induire une activité de réduction du nitrate dans les feuilles. Quelle que soit la concentration en nitrate, l'activité NR reste localisée dans la racine et montre une activité maximale à 5 mM de nitrate. Des résultats similaires ont été observés au niveau transcriptionnel. Aucune activité transcriptionnelle n'a pu être mise en évidence dans les feuilles de jeunes plantules quelle que soit la teneur en nitrate dans le milieu.

Les hybridations *in situ* nous ont permis d'étudier la régulation spatiale de la nitrate réductase dans la racine en fonction de la concentration du nitrate. En présence de 200 μ M de nitrate, l'expression NR se développe essentiellement dans les cellules du cortex qui contiennent probablement un niveau d'hydrates de carbone suffisamment élevé pour satisfaire aux différentes étapes de l'assimilation du nitrate. En présence de 5 mM de nitrate le gène *nia* s'exprime principalement dans la stèle et également dans l'apex. Une augmentation du flux de nitrate dans la racine pourrait rendre compte de l'accroissement de l'ANR et de l'augmentation de l'expression, mais le mécanisme de l'induction reste inconnu. L'activité NR est maximale en présence de 5 mM de nitrate et donc la demande de pouvoir réducteur est plus importante. Aussi privilégions nous pour l'instant, l'hypothèse d'une régulation par la disponibilité en pouvoir réducteur et en énergie. Cette source énergétique est apportée par le déchargement du saccharose du phloème ce qui permettrait d'expliquer la localisation du site d'expression du gène *nia*. Il reste à déterminer si le déchargement du saccharose est capable d'induire la transcription du gène *nia* dans les cellules de la stèle. A moins que l'afflux de saccharose et/ou son catabolisme n'induisent un flux accru de nitrate. Concernant l'étude sur l'interaction de l'assimilation du nitrate et du métabolisme carboné, nous avons montré une interaction entre les feuilles (sources) et la racine (puits) des plantules. L'étude des fluctuations des activités enzymatiques de la SS, SPS, invertase et surtout de la fructose-1,6-

bisphosphatase dans la plante entière devrait apporter quelques contributions à la compréhension de l'interaction des deux métabolismes.

Des études concernant la relation entre la réduction du nitrate et la croissance de suspensions cellulaires de chicorée avaient été entreprises au laboratoire. En présence d'ABA qui ralentit la croissance, l'ANR était paradoxalement augmentée et des modifications de la teneur en saccharose avaient été observées. Nous avons repris une partie du travail afin de déterminer si l'augmentation de l'expression était liée à une modification de l'activité transcriptionnelle. La modification de l'activité NR en présence d'ABA, n'est apparemment pas due à une modification de la transcription du gène analysée par Northern. Pour s'en assurer, il faudrait procéder à des analyses plus précises en utilisant la méthode du "run-off". Nous avons aussi commencé à analyser certains aspects du métabolisme du saccharose: toutes les activités enzymatiques impliquées directement dans le métabolisme du saccharose évoluent parallèlement à l'activité NR; par contre en présence d'ABA elles sont atténuées mais la transcription du gène de l'invertase n'est pas modifiée. Dans ce système de suspension cellulaires où les corrélations entre organes sont supprimées, nous avons pu montrer un parallélisme entre les métabolismes du nitrate et celui du saccharose lorsque les cellules sont cultivées en absence d'ABA. Par contre en présence d'ABA, les activités NR et celles des invertases, SS et SPS varient en sens inverse. Un bilan très grossier de l'utilisation des sucres laisse penser que les 2 premiers jours de la culture sont importants: il semble que durant cette période les cellules cultivées en présence d'ABA absorbent plus de monosaccharides que les cellules témoins, se constituant ainsi une réserve énergétique qui pourrait être utilisée dans la réduction du nitrate. Cette hypothèse, basée sur des évaluations grossières qui ne peuvent pas tenir compte de la métabolisation du saccharose, demande à être vérifiée par des mesures effectuées sur des cellules qui seraient cultivées en présence de saccharose marqué. Dans la mesure où l'ABA diminue le flux de nitrate dans ces cellules (Chraïbi 1988), l'accroissement de l'activité NR ne peut pas être imputée à un flux de nitrate et ici encore, on peut pour l'instant retenir l'hypothèse d'une régulation "métabolique".

De plus, il existe apparemment une régulation post-traductionnelle qui s'effectue par des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation. Ce mécanisme est surtout valable pour la SPS mais de façon moins nette pour la NR.

Il n'est cependant pas certain que les mêmes types de régulations opèrent dans des suspensions cellulaires cultivées en présence de doses élevées de facteurs de croissance et des plantules qui croissent sur des milieux nutritifs plus simples.

Des résultats préliminaires ont montré que l'augmentation de l'ANR par l'ABA est encore plus élevée pour des concentrations en ABA de 10^{-6} à 10^{-7} M. Il serait alors intéressant de voir si dans ces conditions, qui ne modifient pas de façon sensible la

croissance, diverses activités des enzymes intervenant dans le métabolisme du saccharose sont également modifiées.

Par ailleurs des mesures des activités de la fructose-1,6-bisphosphatase enzyme clé de la régulation des sucres, mais aussi de la PEP carboxylase devraient être entreprises. Il serait également intéressant d'analyser l'effet de l'ABA sur les activités des enzymes du métabolisme du saccharose dans les plantes entières et comparer les résultats avec ceux qui seraient obtenus sur des plantes ayant subi des stress hydriques qui, chez certaines espèces induisent une diminution de l'ANR.

Pour suivre les relations entre les métabolismes du nitrate et du saccharose, il sera particulièrement intéressant de suivre la régulation spatio-temporelle de la NR et d'enzymes du métabolisme carboné au cours du développement de la chicorée. En effet lorsque la plante est tubérisée, l'activité NR n'est plus détectable dans les racines, mais elle apparaît dans les feuilles de la rosette. La tubérisation de la racine s'accompagne d'une accumulation d'inuline (polymères de fructose) dans les vacuoles. L'accumulation d'inuline dépend de la force d'appel des puits et donc des cinétiques de déchargement du saccharose qui sont déterminées par les gradients chimiques et osmotiques (Willmitzer *et al* 1993). Ces gradients sont générés par la métabolisation du saccharose en un composant chimique osmotiquement inerte. Dans les tubercules de pomme de terre, ceci est réalisé par la conversion du saccharose en amidon et chez la chicorée par la conversion du saccharose en fructosanes. La première étape de la biosynthèse des fructosanes produit une molécule d'isokestose et une molécule de glucose à partir de deux molécules de saccharose. Cette réaction est catalysée par la saccharose:saccharose fructosyltransférase vacuolaire (SST) (Pollock et Chatterton, 1988; Darwen et John, 1989), dont l'activité pourrait déterminer la force d'appel du puits. Il serait alors intéressant i) de déterminer le stade de développement de la racine où a lieu la modification de la localisation de l'ANR ii) d'analyser les activités enzymatiques des NR, SS, SST, SPS et invertase et la régulation des gènes correspondants.

ANNEXES

ANNEXE 1

Présentation de la séquence complète du gène *nia* de la chicorée:

<u>ATG GCG GCC TCT GTG GAA AAC CGC CAG TTC CGC CAC GAA CCT GGT CTA TCC GCC</u>	54
m A A S V E N R Q F R H E P G L S A	18
<u>GCC GGT GTT GTT CGT TCA TTC AGC CCT AAC CAC CGC CGT TCT GAT TCA CCC ATC</u>	108
A G V V R S F S P N H R R S D S P I	36
<u>CGG AAC TGT AAC TAC CCC GCG GCT GCT AGA GAG TTT ATG ACG CCT AAG AAA CTT</u>	162
R N C N Y P A A A R E F M T P K K L	54
<u>CCT CCT GAG ACG TAC GAT ACT AGT GAC GAT GAA GAA GAC GAA GCC GAT TAT CGT</u>	226
P P E T Y D T S D D E E D E A D Y R	72
<u>GAC GCC ATT AAA AAG TCG AAC TCC GAG TTG GAA AGC TCC GTT TTT GAC CCA AGA</u>	270
D A I K K S N S E L E S S V F D P R	90
<u>GAT CAG GGC ACT GCA GAT CAA TGG ATC GAG CGC AAC CCA TCA ATG GTT CGT CTC</u>	324
D Q G T A D Q W I E R N P S M V R L	108
<u>ACT GGA AAA CAC CCA TTC AAC TCC GAG CCA CCT TTG AAT AAG CTC ATG CAA CAT</u>	378
T G K H P F N S E P P L N K L M Q H	126
<u>GGG TTC ATC ACC CCT GAC CCT CTT CAT TAC GTC CGT AAC CAT GGT CCG GTG CCT</u>	432
G F I T P D P L H Y V R N H G P V P	144
<u>AAC GCC ACC TGG GAG GAT TGG ACG GTG GAG ATA TGC GGC TTG GTG AAA AGA CCT</u>	486
N A T W E D W T V E I C G L V K R P	162
<u>GCG CGT TTC AGT ATG ACC CAG CTT GTC AAC GAG TTT CCA AGC AGG GAG TTT CCG</u>	540
A R F S M T Q L V N E F P S R E F P	180
<u>GTG ACG TTA GTC TGC GCC GGG AAC CGC CGG AAG GAG CAG AAT CTG ACA AAA CAG</u>	594
V T L V C A G N R R K E Q N L T K Q	198
<u>ACG ATA GGG TTC AAC TGG GGC GCC GCC GGG ATA TCT ACT TCG GTT TGG AAA GGG</u>	648
T I G F N W G A A G I S T S V W K G	216
<u>GTG CCA TTG GTT CAT ATC CTG AAA AGA TGC GGG ATT TAC AGC CCG AAG AAA GGC</u>	702
V P L V H I L K R C G I Y S R K K G	244
<u>GCA CTC AAT GTG TGC TTC GAG GGG GCG GAG GAT CTT CCC GGC GGC GGA GGT TCC</u>	756
A L N V C F E G A E D L P G G G G S	262
<u>AAA TAC GGG ACC AGC ATA AAG ATC GAG ATG GCA ATG GAT CCG GCG AGG GAT ATC</u>	810
K Y G T S I K I E M A M D P A R D I	280
<u>ATA TTG GCG TAC ATG CAA AAC GGG GAA AAG TTG TCA CCT GAT CAC GGA TTC CCG</u>	864
I L A Y M Q N G E K L S P D H G F P	298
<u>GTG AGG ATG ATC ATT CCA GGA TTC ATC GGC GGT AGG ATG GTG AAA TGG TTG AAG</u>	918
V R M I I P G F I G G R M V K W L K	316
<u>CGT ATC ATA GTA ACG ACG CCG GAG TCG GAA AGT TAT TAC CAC TTC AAA GAC AAC</u>	972
R I I V T T P E S E S Y Y H F K D N	324
<u>CGC GTG TTG CCG TCG CAC GTG GAC GCC GAG CTA GCT AAC TCG GAA Ggtaaatcata</u>	1028
R V L P S H V D A E L A N S E	339
tagtatTTTTTACGTATATACCAAactTTTTatCGGCCagttatcatcttccaaaagataacgataatggtt	1100
tagaatcagtttctgataaatctgttacataactcataaatacatgcatatcatataactTTTTatgaatat	1172
gtgaaagcaatttgtgtctgtcacatcaggtagatgacgtacgcttctgtgacccaaaattaatgatttatg	1244
gattttgatttttgatggttgagtttcattttgttatgaattagGT TGG TGG TAT AAG CCA GAG TAC	1310
G W W Y K P E Y	347

ATC ATC AAC GAA CTC AAC ATA AAC TCG GTG ATT ACA ACA CCT TGT CAT GAA GAG 1364
 I I N E L N I N S V I T T P C H E E 365

ATT TTG CCT ATT AAT TCT TGG ACA ACT CAA AGG CCT TAC ACC TTG AGA GGC TAT GCA 1421
 I L P I N S W T T Q R P Y T L R G Y A 384

TAT TCC G gtaattaattaacttccatctgcgattcatatctatattaatcttctgacttaacaataaaa 1494
 Y S 386
 tcacataactaaatagcttttttgtaactcgattagaagatctaatgaattctatattatattttgggtcaata 1570
 atcactacttatttcggttcacaaaatatacgcaacacttttttattttatttgaaaaaaataaataaacggtata 1646
 gttttgtaagttgtgggctttaatattactaggtacttggtaaatattgattttaattgatgactttagtggttac 1722
 taacttataatgtttttttggacaaagatattttaagtagcttggtaagcgacagtggtttataaacagtt 1801
 ttagcagtagttagcccatcacatggcgacaacttgctcgaagactacttttctgatcaaaaggaatattttg 1874
 acttacataaacaattaagtagttgattattctaaacattagggtacctagcaataatataaactagtttaagtag 1950
 tttaaattcaaaagcatccagtggttaactaacagctacatatattttctctaaatcttctgtatctttcataa 2026
 acaaaacttaaacactaattaattaagttaacacttcataaaaaacagatgacgtatttactattgttgaacagaca 2102
 ttatataaaagtcaacaatatattataagctccaagtgtttaggattcgcactgactttaattaattaataat 2178

taattaattgaatacgtcgtcgtttacagGA GGT GGG AAG AAA GTG ACA CGG GTG GAA GTA ACA ATG 2245
 G G G K K V T R V E V T M 399

GAC GGA GGA GAG ACG TGG AAC GTT TGT ACA CTG GAT CAT AAA GAG AAG CCA ACA AGA TAC 2305
 D G G E T W N V C T L D H K E K P T R Y 419

GCC AAA TAT TGG TGT TGG TGT TTT TGG TCG CTT GAA GTT GAA GTT CTT GAC CTT CTT AGT 2365
 A K Y W C W C F W S L E V E V L D L L S 439

GCC AAA GAG ATC GCG GTT CGA GCC TGG GAT GAG ACA CTA AAC ACC CAA CCT GAC AAA CTC 2425
 A K E I A V R A W D E T L N T Q P D K L 459

ATT TGG AAT CTC ATG gtacgtacctaccaactagctttgttacttttttgaatacgtttcctattggcttata 2499
 I W N L M 464

tagaaaagtaacaacttattttcattgggttggtttgttacaatatcatatcttacttttggttttattatgacattgtag 2580
 ttaacttatataaatgtttatagaaatcaaaaagtaaatattgattgctatagtagagtcctataactagtttagagctttaa 2661
 agtatgatattttactaaaaagtgaaataaatttcataaataacgaaagttataaaaaatattgtaataatacgaataaa 2742
 tgaaaatagattttttttttggattttatcctttcatttttcttttaatttaaaacaccttagttattggactcca 2823
 tttctttttgtacactaaaaatagtaaatatagataggatttggtaactcattacatcattgaaattcgatgacgtca 2904
 tgagatatttgaacttggtgcttttgagggtgttcttaggatgacctatcgggtttgttctttcagcgatttcttttgac 2985
 tcgcttcttagagcatccacaatggtggagctttttacaagagcttttccaaaatttttatgatatatcattgcccacat 3066
 ataattatataaaaagcttataaatcttctactatagtaaaagttttttcataaatcttgatataatttaattattttata 3147
 taaatacaaatatacaataaaataataaataatataaaaagcttgaatgatagagctttttaatgacaaagttatatgaaa 3228
 aagctttgttaacaaaaagcttccactatggttgttgaagtttataaaaagcttttttaattaaaaaaactctaaaaaaagc 3309
 tttgaaaaagcaccatagtgatgctcttagcatcttcatgtgaacctcatgattgttttcataccaaatgccaattaaa 3390
 cttgtagatcactaactatgctatacatttttttattgataatcaacaatgaaattattatattcttctacatctaaaaa 3471
 aactcgtatccatattttccagtttaaaagtaaaagatacgtaaaaacaaaactatcattcatttagccacttaattatta 3552
 tattaacaattaatcggctgaatcgatgaaaagtaacatttcaattgttatttagataaaatgataacattatcatgtt 3633
 ttttagtattttgttgaatatacaaatcgggtgacgattataattttggggacgtatttaagaaagtaagatggtttaac 3714
 cagtctaaaaagtaattaataaattaattgataaaaaaaaatatttctagttatagtttgaagccacacagatatcaaa 3795

attaagaaaaaaattattttcttaaaccaaagctaattagatttaaaaatagcagGGT ATG ATG AAC AAT TGT 3869
 G M M N N C 470

TGG TTC CGA GTG AAG ACA AAC ATG TGC AAA CCA CAC AAA GGC GAG ATC GGC ATC GTC TTC 3929
 W F R V K T N M C K P H K G E I G I V F 490

GAG CAC CCA ACG CAA CCT GGA AAC CAG TCC GGT GGA TGG ATG GCT CGT GAG AAA CAC CTC 3989
 E H P T Q P G N Q S G G W M A R E K H L 510

AGA TTT CAT CGG AAC TAG CAC ACC CAA CTC TCA AGA AGA GTG TAT CCT CCC CTT TCA TGA 4049
 E I S S E L A H P T L K K S V S S P F M 530

GAC ACC ACT TCT TTA ACC TTC ACC ATG TCG GAA GTC AAG AAA CAC AAT TCC GCT GAC TCA 4109
 N T T S L T F T M S E V K K H N S A D S 550

GCC TGG ATC GTC GTC CAT GGC CAT ATC TAC GAC TGC ACC TCC TTC CTC AAA GAC CAT CCC 4169
 A W I V V H G H I Y D C T S F L K D H P 570

GGT GGC AGT GAC AGT ATC CTC CTC AAT GCT GGA ACC GAC TGC ACA GAA GAG TTC GAT GCC 4229
 G G S D S I L L N A G T D C T E E F D A 590
ATC CAT TCC GAC AAG GCC AAG AAA CTC TTG GAA GAG TAT CGA GTT GGT GAG CTC ATA ACC 4289
 I H S D K A K K L L E E Y R V G E L I T 610
ATG GGA TAC AGT TCC GAT TCT GCT GCG TCA TCA CCA AAT AAC TCC GTC CAT GGT GCC ACC 4349
 M G Y S S D S A A S S P N N S V H G A T 630
AAT TAC CTG ACA TTA CAC TTA AGC TTA GCC ACC ATC AAA GAA ATT GCT CCG ACC AGA AGC 4409
 N Y L T L H L S L A T I K E T A P T R S 650
GTA GCC CTA ATC CCT AAA GAA ATT GCT CCG ACA AGA CGT GAA AAG ATC CCA TGT AAA CTT 4469
 V A L I P K E I A P T R R E K I P C K L 670
ATC TCC AAA ACA TCG GTT TCT CAT GAC GTG AGG CTA TTC AGG TTC GCT CTC CCA TCA CCG 4529
 I S K T S V S H D V R L F R F A L P S P 690
GAT CAA GTT CTT GGG TTA CCA GTA GGG AAA CAC GTC TTT GTA TGT GCC ACC ATT GAC GAT 4589
 D Q V L G L P V G K H V F V C A T I D D 710
AAG CTA TGC ATG AGG GCA TAC ACA CCA ACG AGC ACC ATT GAT GAA GTC GGG TAC TTT GAG 4649
 K L C M R A Y T P T S T I D E V G Y F E 730
TTG CTT GTC AAA ATC TAC TTC AAA GGC GTG GAA CCC AAG TTT CCG AAT GGA GGG CTC ATG 4709
 L L V K I Y F K G V E P K F P N G G L M 750
TCG CAA CAT CTG GAG TCA ATG GAA CTT GGC TCT TCA ATT GAA ATC AAA GGT CCT TTG GGC 4769
 S Q H L E S M E L G S S I E I K G P L G 770
CAC ATC GAG TAC ATG GGC AGG GGG ACG TTT TCG GTG CAT GGT AAA CAA AAG TTT GCC AGG 4829
 H I E Y M G R G T F S V H G K Q K F A R 790
AAG TTA GCC ATG TTT GCA GGT GGG ACG GGT ATC ACT CCG GAT CTA TCA AGT GAT GCA AGC 4891
 K L A M F A G G T G I T P D L S S D A S 810
TAT TTA AAG GAT CCG GAA GAT GAT ACA GAG ATG TAT GTG GTG TAT GCA AAT CGT ACC GAA 4449
 Y L K D P E D D T E M Y V V Y A N R T E 830
GAT GAT ATA TTG TTG AGG GAA GAA CTT GAT GCA TGG GCA GAC AAG TAT TCG GAC AGG GTG 5009
 D D I L L R E E L D A W A D K Y S D R V 850
AAG GTA TGG TAT GTT GTT GCC AAG TCC ATA AGA GAA GGG TGG AAA TAC AGT GAA GGT TTC 5069
 K V W Y V V A K S I R E G W K Y S E G F 870
ATC ACG GAG GAT ATT ATG AGG CCC GAA CAT GTA CCG GAG GTC TCT GAA GAT ACA TTG GCT 5129
 I T E D I M R E H V P E V S E D T L A L 890
TTG GCT TGT GGA CCA CCA ATG ATT CAG TTC GCA ATC AAC CCT AAT TTA GAA AAG ATG GGG 5189
 A C G P P P M I Q F A I N P N L E K M G 910
TAT GAT ATC AAG AAT TCT TTG CTG GTG TTT TAG aggatcggttacattattatatttgggatcggt 5256
 Y D I K N S L L V F - 920
 tacattttgatttcaaaaataaaaaaaggggtcatatatgtacatacttctagttactatgtatttgtaatcatgt 5335
 gtctacgcgagagacttagatattaatagaaaatcataataatttaagctt 5387

Régions (en aa):	N-terminale: 1-106	Introns (en nt)	# Taille	Position
	Molybdique: 107-474	(en minuscules)	1: 268	(1019-1287)
	Charnière 1: 475-534		2: 778	(1429-2207)
	Hémique : 535-614		3: 1410	(2441-3851)
	Charnière 2: 615-640	Exons en majuscules		
	Flavinique: 641-920	Les signaux de polyadénylation sont soulignés		

ANNEXE 2

Alignement des séquences en acides aminés des nitrate réductases de différentes espèces:

<i>C. intybus</i>	mAASVENRQFRH-EPG-----LSAAGVVRFS--PNHRRSDSPIR-NCN	40
<i>N. tabacum</i>	mAASVENRQFSH-----IEAGLSRSFK--P---RSDSPVR-GCN	33
<i>C. maxima</i>	mAASVDNRQYGPLOPP-----LS--GVVRSFKNGPN-HRADSPVR-GCN	40
<i>B. pendula</i>	mAASVENRRFTHHEPA-----VN--GLVRTFKVPNSHRSDSPDL-G--	39
<i>S. oleraceae</i>	mAASVD-RQYHPAP-----MSGVVRT--PFSNHHRSDSPVRNGYT	37
<i>A. thaliana</i>	mAASVDNRQYARLEPG-----L--NGVVRSYKP-PVPGRSDSPKAHQ--	39
<i>O. sativa</i>	mAASVQPRQFGHLEPGSAPVVRGAASSNGAKAYPPANGIPRRADSPVRGCG	50
<i>H. vulgare</i>	mAASVE---YNRQVSAHPWPTNAQPKAAFDLFSSSGGRRRSGA-----	41
	***** *	
<i>C. intybus</i>	YPAAAR-E-----FMTPKKLPPETY-----DTSDD----EEDE	68
<i>N. tabacum</i>	FPPPSTN-----F--QKKPNSTIFLDYSSSEDDDD----DDEK	66
<i>C. maxima</i>	FPNSN-VD-----YNNRPLKSSVKIQEAAAEEMEDSCSEDENE	78
<i>B. pendula</i>	-----RQIPSSPKQVATGE---DSSSEDENE	63
<i>S. oleraceae</i>	FSNPPSSNGVVKPGEKIKLVDNNSNSNNGSNMNNNRYDSDSEEDDENEM	87
<i>A. thaliana</i>	-NQTTNQTVFLKPA--KVHDDDEDVSE-----DENETHNSNA	74
<i>O. sativa</i>	FPP-----LVSPPPR-----KPPSDGSDDEEEEQ	74
<i>H. vulgare</i>	-----DSDSDEEDSVP	52
	
<i>C. intybus</i>	ADYRDAIKKS-NSELESSVFDPRDQGTADQWIERNPSMVRLTGKHPFNSE	117
<i>N. tabacum</i>	NEYLQMIKKG-NSELEPSVHDSRDEGTADNWIERNFSLIRLTGKHPFNSE	115
<i>C. maxima</i>	NEFRDLIVKG-NRELEPSILDHRDEGTADNWIERNASMVRLTGKHPFNSE	127
<i>B. pendula</i>	NDYKELIQKG-NGELEPSILDPRDEATADNWERNATMVRLTGKHPFNSE	112
<i>S. oleraceae</i>	NVWNEMIKKG-NSELEPSSVDSRDEGTADQWIERNPSMIRLTGKHPFNSE	136
<i>A. thaliana</i>	VYYKEMIRKS-NAELEPSVLDPRDEYTADSWIERNPSMVRLTGKHPFNSE	123
<i>O. sativa</i>	EDWRELYGSHLQLEVEPPVRDARNEGTADAWTERNPSLIRLTGKHPFNSE	124
<i>H. vulgare</i>	PDWRSLYSPR--LDVEPSVKDPRDEATSDAWKRHPALVRLTGKHPFNSE	100
 * * * * * ***** * * *	
<i>C. intybus</i>	PPLNKLMOHGFIPTDPLHYVRNHGVPVNPATWEDWTVEICGLVKRPARFSM	167
<i>N. tabacum</i>	PPLNRLMHHGFIPTVPLHYVRNHGVPVKGTWDDWTVEVTGLVKRPMKFTM	165
<i>C. maxima</i>	PPLNRLMHHGFIPTVPLHYVRNHGVVVKAKWADWTVEVCGLVKRPKFTM	177
<i>B. pendula</i>	APLTRLMHHGFIPTAPLHYVRNHGVPVKARWEDWSVEVCGLVKRPARFTM	162
<i>S. oleraceae</i>	PPLTRLMHHGFIPTVPLHYVRNHGVPVNAKWEDWTVEVTGLVKRPIRFTM	186
<i>A. thaliana</i>	APLNRLMHHGFIPTVPLHYVRNHGVPKQAWAETVEVTGFVKRPMKFTM	173
<i>O. sativa</i>	PPLAELMHHGFIPTAALHYVANHGAVPRGDWSTWTVDTGLVKRPMRLTM	174
<i>H. vulgare</i>	PPLPRLMHHGFIPTVPLHYVRNHGAVPKADWSTWTVVTGLVKRPMKFTM	150
	. *	
<i>C. intybus</i>	TQLVNEFPSSREFPVTLVCAGNRRKEQNLTKQTIGFNWGAAGISTSVWKGV	217
<i>N. tabacum</i>	DQLVNEFPSSRELPTLVCAGNRRKEQNMVKQTIGFNWGAAGVSTTVWRGV	215
<i>C. maxima</i>	DQLLNEFRFRFEPATLVCAGNRRKEQNMVKQSIGFNWGAAGVSTSVWRRV	227
<i>B. pendula</i>	DRLVTEFRSREFPVTLVCAGNRRKEQNMVKKTIGFNWGAAGVSTSVWRGV	212
<i>S. oleraceae</i>	DQLVNDFQSREFPVTLVCAGNRRKEQNMVKQSIGFNWGAAGVSTSVWRGV	236
<i>A. thaliana</i>	DQLVSEFAYREFAATLVCAGNRRKEQNMVKKSKGFNWGSAAGVSTSVWRGV	223
<i>O. sativa</i>	DELVNGFPAVEIPVTLVCAGNRRKEQNMVQQTIGFNWGAAGVSTSVWRGA	224
<i>H. vulgare</i>	EELVTGFQAVEFPVTLVCAGNRRKEQNMVRQSSGFNWGPGAISTTVWRGV	200
	. *	
<i>C. intybus</i>	PLVHILKRCGIYSRKKGALNVCFEAEDLPGGGG---SKYGTSIKIEMAM	264
<i>N. tabacum</i>	PLRALLKRYGVFSKNKGALNVCFEAEDVLPGGGG---SKYGTSIKKEFAM	262
<i>C. maxima</i>	PLCDLLKRCGILSRKKGALNVCFEAEDLPGGGG---SKYGTSIKKELAM	274
<i>B. pendula</i>	PLRDVLKRCGIFSRGRGAFNVCFEAEDLPGGGG---SKYGTSVKYEMAM	259
<i>S. oleraceae</i>	PLRDVLKRCGVMSSLKALNVCFEAEDLPGGGG---SKYGTSVKREFAM	283
<i>A. thaliana</i>	PLCDVLRRCGIFSRKGGALNVCFEAEDLPGGAGTAGSKYGTSIKKEYAM	273
<i>O. sativa</i>	RLRDVLRRCGIMPSSKGGALNVCFEAEDLPGGGG---SKYGTSITRQWAL	271
<i>H. vulgare</i>	RLRDVLRRCGVM-GAGASNVCFEAEDLPGGGG---CKYGTSLRRSVAM	246
	. *	

<i>C. intybus</i>	DPARDIILAYMQNGEKLSPDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWLKRIIVTTPE	314
<i>N. tabacum</i>	DPARDII IAYMQNGEKLAPDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWKRIIVTTQE	312
<i>C. maxima</i>	DPARDIILAYMQNGEQLAPDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWLKRIIVTTKE	324
<i>B. pendula</i>	DPARDIILGYMQNGERLSPDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWLKRIIVTTKE	309
<i>S. oleraceae</i>	DPARDIILAYMQNGEKLSPDHGFPVRMIIPGFIGGRMVKWLKRIIVTTTE	333
<i>A. thaliana</i>	DPSRDIILAYMQNGEYLTDPDHGFPVRIIPGFIGGRMVKWLKRIIVTTKE	323
<i>O. sativa</i>	DPSRDIMLAYMQNGEPLLPDHGFPVRAIIPGFIGGRMVKWKRIIVTTAE	321
<i>H. vulgare</i>	DPARDVILAYMQNGEPLAPDHGFPVRVIVPGFIGGRMVKWLKRIVVACNE	296
	*. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *	
<i>C. intybus</i>	SESYHFKDNRVLP SHVDAELANSEGWWYKPEYIINELNINSVITTPCHE	364
<i>N. tabacum</i>	SDSYHFKDNRVLP PHVDAELANTEAWWYKPEYIINELNINSVITTPCHE	362
<i>C. maxima</i>	SENYHFKDNRVLP SHVDADVANA EAWWYKPEHIINELNINSVITTPCHE	374
<i>B. pendula</i>	SDNYHYNDNRVLP SHVDADVAKAEAWWYKPEHIINELNINSVITTPCHE	359
<i>S. oleraceae</i>	SDNYHYKDNRVLP SHVDAELANSEAWWYKQEYIINELNVNSVITSPCHE	383
<i>A. thaliana</i>	SDNFYHFKDNRVLP SLVDAELADEEGWWYKPEYIINELNINSVITTPCHE	373
<i>O. sativa</i>	SDNYHYKDNRVLP SHVDAELANADAWWYKPEYIINELNVNSVITTPGYD	371
<i>H. vulgare</i>	SESYHYRDNRVLP SHVDAELANAEAWWYKPECMINELNINSVITTPGHD	346
	*. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *	
<i>C. intybus</i>	EILPINSWTTQRPYTLRGYAYSGGGKVVTRVEVTMDGGETWNVCTLDHKE	414
<i>N. tabacum</i>	EILPINAWTTQRPYTLRGYSYSGGGKVVTRVEVTLDGGETWQVCTLDHPE	412
<i>C. maxima</i>	EILPINAWTTQRPYTLRGYSYSGGGKVVTRVEVTMDSGETWQVCTLDHPE	424
<i>B. pendula</i>	EILPINSWTTQRPYTLRGYAYSGGGRKVVTRVEITMNGGEKWRVCALDHPE	409
<i>S. oleraceae</i>	EILPINAWTTQRPYTMRGYAYSGGGRKVVTRVEVTMDGGDTWDICELDHQE	433
<i>A. thaliana</i>	EILPINAFTTQRPYTLKGYAYSGGGKVVTRVEVTVDGGETWNVCALDHQE	423
<i>O. sativa</i>	EILPINGITTQRGYTMKGYAYSGGGKRITRVEVTLDGGETWLVCVLDLPE	421
<i>H. vulgare</i>	EVLPIINALTTQKPYTMKGYAYSGGGRKVVTRVEVTLDGGETWQVCDLEHPE	396
	*. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *	
<i>C. intybus</i>	KPTRYAKYWCWCFWSLEVEVLDLLSAKEIAVRAWDETTLNTPDKLIWNLM	464
<i>N. tabacum</i>	KPTKYGKYWCWCFWSLEVEVLDLLSAKEIAVRAWDETTLNTPDKLIWNVM	462
<i>C. maxima</i>	KANKYGKYWCWCFWSLEVEVLDLLSAKEIAVRAWDETHNTQPEKLIWNLM	474
<i>B. pendula</i>	KPNKYGKYWCWCFWSLEVEVLDLLGAKEIAVRAWDEAHNTQPEKLIWNVM	459
<i>S. oleraceae</i>	RGSKYGKFWCWCWCFWSLEVEVLDLLGAKEIGVRAWDESNTQPEKLIWNVM	483
<i>A. thaliana</i>	KPNKYGKFWCWCWCFWSLEVEVLDLLSAKEIAVRAWDETTLNTPDKMIWNLM	473
<i>O. sativa</i>	KPTKYGKHWCWRFWPVEVEVFDLLGAKEIAARAWDQSHNTQPEKLIWNLM	471
<i>H. vulgare</i>	RPTKYGKYWCWCFWSVEVEVLELLGAKEMAVRAWDEALNTQPERLIWNLM	446
	. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *	
<i>C. intybus</i>	GMMNNCWFRVKTNMCKPHKGEIGIVFEHPTQPGNQSGGWMAREKHLEISS	514
<i>N. tabacum</i>	GMMNNCWFRVKNVCKPHKGEIGIVFEHPTQPGNQSGGWMAREKHLEISA	512
<i>C. maxima</i>	GMMNNCWFRVKTNMCKPHKGEIGIVFEHPTQPGNQSGGWMAREKHLEIST	524
<i>B. pendula</i>	GMMNNCWFRVKTNVCKAHMGEIGIAFEHPTVPGNESGGWMAREKNLETSS	509
<i>S. oleraceae</i>	GMMNNCWFRVKTNVCKPHKGEIGIVFEHPTQPGNKSGGWMAREKHLEISD	533
<i>A. thaliana</i>	GMMNNCWFRVKTNVCKPHKGEIGIVFEHPTLPGNESGGWMAREKHLEKSA	523
<i>O. sativa</i>	GMMNNCWFKVKNVCRPHKGEIGLVFEHPTQPGNQSGGWMARQKHLETA-	520
<i>H. vulgare</i>	GMMNNCWFRVKINVCPRPHKGEIGLVFDHPTQPGNQSGGWMARQKHLETS-	495
	*. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *	
<i>C. intybus</i>	ELAHPTLKKSVSPFMNTT-SLFTTMSEVKKHNSADSAWIVVHGHIYDCT	563
<i>N. tabacum</i>	E-APPTLKKSVSPFMNTA-SKMYSMSEVRKHSSADSAWIVVHGHIYDAT	560
<i>C. maxima</i>	E-SNQTLLKSVSPFMNTA-SNTYTLSEVKKHNSPQSAWIVVHGHIYDCT	572
<i>B. pendula</i>	D-ANQSLKSVSPFMNTS-SKMYSMSEVKKHNSAESAWIVVHGHIYDCT	557
<i>S. oleraceae</i>	--SGPTLKRSTSTPFMNTT-SKMYSMSEVKKHNTADSASWIVVHGHIYDCT	580
<i>A. thaliana</i>	D-APPSLKKSVSPFMNTT-AKMYSMSEVKKHNSADSCWIVVHGHIYDCT	571
<i>O. sativa</i>	EAAAPGLKRSTSTPFMNTT-DGKQFTMSEVRKHSSQDSAWIVVHGHIYDCT	570
<i>H. vulgare</i>	ETTQGTLLKRSTSTPFMNTT-DGKQFTMSEVRRHASKDSAWIVVHGHIYDCT	544
	. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *. *	

<i>C. intybus</i>	SFLKDHPGGSDSILLNAGTDCTEEFDAIHSDKAKKLLLEEYRVGELITMGY	613
<i>N. tabacum</i>	RFLKDHPGGSDSILINAGTDCTEEFDAIHSDKAKKLLLEEFRIGELLTTGY	610
<i>C. maxima</i>	RFLKDHPGGSDSILINAGTDCTEEFDAIHSDKAKKMLLEDYRIGELITMGY	622
<i>B. pendula</i>	HFLKDHPGGADSILINAGTDCTEEFDAIHSDKAKKMLLEDYRIGELITMGY	607
<i>S. oleraceae</i>	RFLKDHPGGSDSILINAGTDCTEEFDAIHSDKAKRLLLEDYRIGELISTGY	630
<i>A. thaliana</i>	RFLMDHPGGSDSILINAGTDCTEEFDAIHSDKAKKMLLEDYRIGELITMGY	621
<i>O. sativa</i>	AFLKDHPGGADSILINAGTDCTEEFDAIHSDKAKALLDITYRIGELITTG-	619
<i>H. vulgare</i>	AFLKDHPGGADSILINAGSDCTEEFDAIHSAKARGLLEMYRVGELIVTG- *.*****.*****.***.*****.*****.***.***.***.***.***.***.	593
<i>C. intybus</i>	SSDSAASSPNNSVHGATNYLTLHLSLATIKETAPT-RSVALIPKEIAPTR	662
<i>N. tabacum</i>	TSDS----PGNSVHGSSSFSSF---LAPIKELVPAQRSVALIP-----	646
<i>C. maxima</i>	ASDSSNSPNNSTHGASNFSH---LAPIRE-APVSRVALAPNE-----	662
<i>B. pendula</i>	VSDS----PNSTVHGASNTSH---LAPIKE-IAPLRNVALIPGA-----	643
<i>S. oleraceae</i>	TSDSSS--PGNSVHGSSVYSGLA-GLAPITEAVP-LRNVALNP-----	669
<i>A. thaliana</i>	SSDSSS--PNNSVHGSSAVFSL---LAPIGEATPV-RNLALV-----NP	659
<i>O. sativa</i>	----AGYSSDNSVHGASNLSQL---APIREAIAKAPAPVAL-----SSP	655
<i>H. vulgare</i>	----NDYSPQSSNADLAAIVEA---PAVVVPRLPASAVAL-----ANP	629
<i>C. intybus</i>	REKIPCKLISKTSVSHDVRVLRFRFALPS-PDQVLGLPVGKHFVFCATIDDK	711
<i>N. tabacum</i>	REKIPCKLIDKQISIPDVRKFRFALPS-EDQVLGLPVGKHFVFCATIDDK	695
<i>C. maxima</i>	--KIPCKLISKTSISHDVRVFRFALPGGQDQALGLPVGKHFVFCATVDGK	710
<i>B. pendula</i>	--KIPTKLVYKKSLSHDVRLFRFALPS-DDQVLGLPVGKHFVFCATIDDK	690
<i>S. oleraceae</i>	RVKIPCKLIEKVSLSHDVRRFRFALPS-EDQVLGLPVGKHFVFCANVDDK	718
<i>A. thaliana</i>	RAKVPVQLVEKTSISHDVRKFRFALPV-EDMVLGLPVGKHFVFCATINDK	708
<i>O. sativa</i>	RAKVPVQLVDDKELSRDVRFRFALPS-SDQVLGLPVGKHFVFCASIEGK	704
<i>H. vulgare</i>	REKVRCLVDDKSMHNVRFRFALPS-PDQKLGLPVGKHFVFCATIDDK *..*.*.*.....**.....**.....*****.....**.....*	678
<i>C. intybus</i>	LCMRAYTPTSTIDEVGYFELLVKIYFKGVEPKFPNGGLMSQHLSELMELGS	761
<i>N. tabacum</i>	LCMRAYTPTSTIDEVGYFELVVKIYFKGIHPKFPNGGQMSQYLDLQLGS	745
<i>C. maxima</i>	LCMRAYTPTSSIDEMGFFELVVKVYFKGVHPKFPNGGIMSQYLDSEMEVGS	760
<i>B. pendula</i>	LCMRAYTPTSTIDEVGYLDLVLVKIYFKNSNPRFPNGGLMSQHLDSLPIGS	740
<i>S. oleraceae</i>	LCMRAYTPSSTIDVVGYFDLVLVKVYFKDVHPRFPNGGVMSQHLDSLPLGS	768
<i>A. thaliana</i>	LCLRAYTPSSTVDVVGYFELVVKIYFGGVHPRFPNGGLMSQYLDLPIGS	758
<i>O. sativa</i>	LCMRAYTPTSMVDEVGHFLLIKVYFKNEHPKFPDGGMLTQYLDLPLVGA	754
<i>H. vulgare</i>	LCMRAYTPTSSVEEVGHVELLIKIYFKDEDPKFPAGGLMSQYLDLPLGA **.....*..*.*.....**.....**.....**.....**.....**.....*	728
<i>C. intybus</i>	SIEIKGPLGHI EYMGRGTF SVHGKQKFAKRLAMFAGGTGITPDLSSDASY	811
<i>N. tabacum</i>	FLDVKGPLGHI EYQKGNFLVHGKQKFAKRLAMIAGGTGITPVYQVMQAI	795
<i>C. maxima</i>	TLDVKGPLGHI EYTGRGNFMVHGKPRFARRLAMLAGGTGITPIYQVQAI	810
<i>B. pendula</i>	VLHVKGPLGHVEYTGRGNFLVHGEPKFAKRLAMVAGGTGITPIYQVIQAI	790
<i>S. oleraceae</i>	IVDVKGPLGHI EYLGKGNFTVHGKPKFAKRLAMISGGTGITPIYQVMQAI	818
<i>A. thaliana</i>	TLEIKGPLGHVEYLGKGSFTVHGKPKFADKRLAMLAGGTGITPVYQIQAI	808
<i>O. sativa</i>	YIDVKGPLGHVEYTGRGEFVINGKPRNARRLAMIAGGSGITPMYQVIQSV	804
<i>H. vulgare</i>	PVDIKGPVGHIEYAGRAFTVGGERRFARRLAMVAGGTGITPVYQVIQAV**.....**.....**.....*.....**.....**.....**.....*	778
<i>C. intybus</i>	LKD-PEDDTEMYVVYANRTEDDILLREELDAWADKYS DRVKVWYVVAKSI	860
<i>N. tabacum</i>	LKD-PEDDTEMYVVYANRTEDDILLKEELDSWAEEKIPERVKVWYVVDQSI	844
<i>C. maxima</i>	LKD-PEDETEMYVVYANRTEDDILLRDELDTWAKK-NQRLKVWYVVDQESI	858
<i>B. pendula</i>	LKD-PEDETEMFVVYANRTEDDILLREELDDWAKK-HEKLVWYVVKESK	838
<i>S. oleraceae</i>	LKD-PEDKTEMHVVYANRTEEDILLREELDKWADEFDRVKVWYVVEKA-	866
<i>A. thaliana</i>	LKD-PEDETEMYVIYANRTEEDILLREELDGWAEQY PDRLKVWYVVDQSI	856
<i>O. sativa</i>	LRDQPEDTTEMHVVYANRTEDDILLRDELDRWAAEY PDRLKVWYVVDQVK	854
<i>H. vulgare</i>	LRDQPDPTTEMHVVYANRTEDDMLLREEIDRWAAANPARLVWYVVDQVK *.*.*.*.*.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....*	828

<i>C. intybus</i>	R--EGWKYSEGFITEDIMREHVPEV-SEDTLALACGPPPMIQFAINPNLE	907
<i>N. tabacum</i>	K--EGWKYSLGFISEAILREHIPEP-SHTTLALACGPPPMIQFAVNPNE	891
<i>C. maxima</i>	R--EGWEYSVGFITENILREHIPAA-AEDTLALACGPPAMIQFAVQPNLE	905
<i>B. pendula</i>	R--EGWEYSVGYIRESILREHIPEG-SDDVLALACGAPSMIEEAVRLNLE	885
<i>S. oleraceae</i>	E--EGWKYDTGFISEKILRDHVPAV-GDDVLALTCGPPPMIQFAVQPNLD	913
<i>A. thaliana</i>	K--EGWAYSTGFISEAIMREHIPDGLDGSALAMACGPPPMIQFAVQPNLE	904
<i>O. sativa</i>	RPEEGWKYGVGFVTEEVLRHVPEGGD-DTLALACGPPPMIKFAVSPNLE	903
<i>H. vulgare</i>	RPEDAWEYGVGRVDEQVLRHLPLGGDGETLALVCGPPAMLECTVRPGLLE	878

. . * * . * . * . . * * * * . . . * * * * * * * * * . . . * .

<i>C. intybus</i>	KMGYDIKNSLLVF	920
<i>N. tabacum</i>	KMGYDIKDSLLVF	904
<i>C. maxima</i>	KMNYDTKNSLLVF	918
<i>B. pendula</i>	KMNYDTKNSLIIF	898
<i>S. oleraceae</i>	KMGFDIKEQLLIF	926
<i>A. thaliana</i>	KMQYNIKEDFLIF	917
<i>O. sativa</i>	KMKYDMANSFIVF	916
<i>H. vulgare</i>	KMGYDLDKDCLVF	891

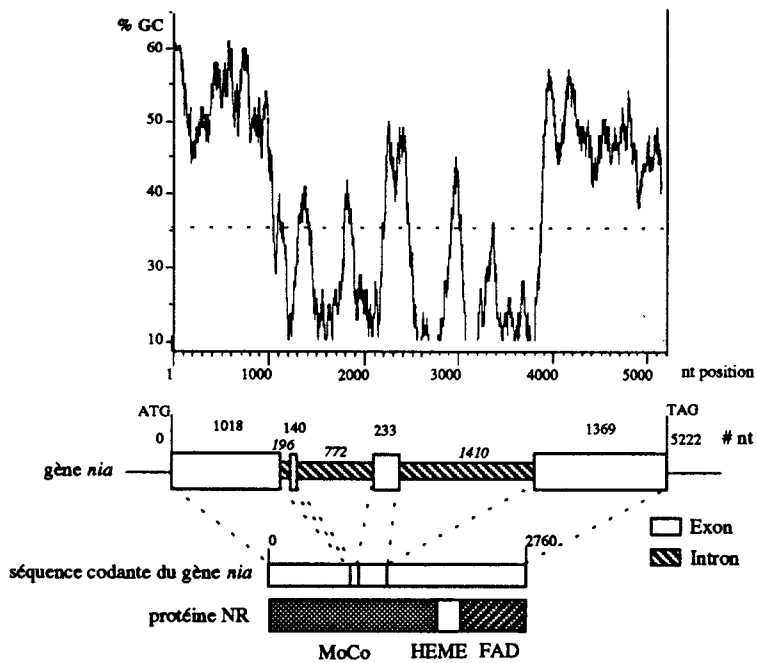
** *

Pourcentage d'homologie entre la NR de chicorée et celle de divers organismes :

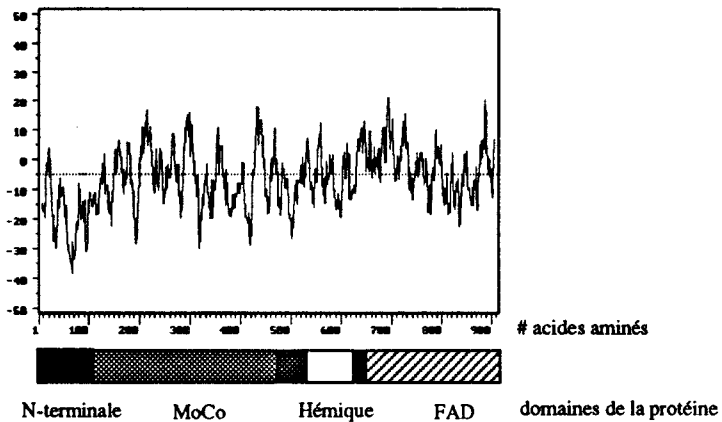
Organisme	Taille NR (en aa)	% d'homologie
<i>Petunia hybrida</i>	909	78,7
<i>Nicotiana tabacum 2</i>	904	78,7
<i>Nicotiana tabacum 1</i>	904	78,5
<i>Lycopersicon esculentum</i>	911	78,1
<i>Cucurbita maxima</i>	918	77,9
<i>Betula pendula</i>	898	76,3
<i>Spinacea oleracea</i>	926	75,5
<i>Arabidopsis thaliana 2</i>	917	74,4
<i>Arabidopsis thaliana 1</i>	917	73,3
<i>Hordeum vulgare 1</i>	915	67,4
<i>Hordeum vulgare 2</i>	912	67,1
<i>Oryza sativa</i>	916	66,7
<i>Hordeum vulgare 7</i>	891	64,0
<i>Zea mays</i>	617	50,2
<i>Volvox carteri</i>	864	38,9
<i>Aspergillus nidulans</i>	873	22,4
<i>Aspergillus niger</i>	867	22,4
<i>Leptosphaera maculans</i>	894	22,2
<i>Neurospora crassa</i>	982	20,6
<i>Chlorella vulgaris</i>	318	14,9
<i>Ustilago maydis</i>	908	14,9

ANNEXE 3

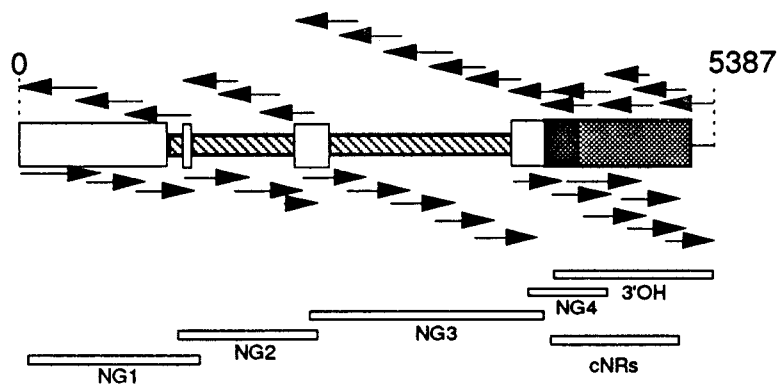
A. Report du % GC du gène *nia* de la chicorée



B. Report d'hydrophobicité de la protéine NR de la chicorée

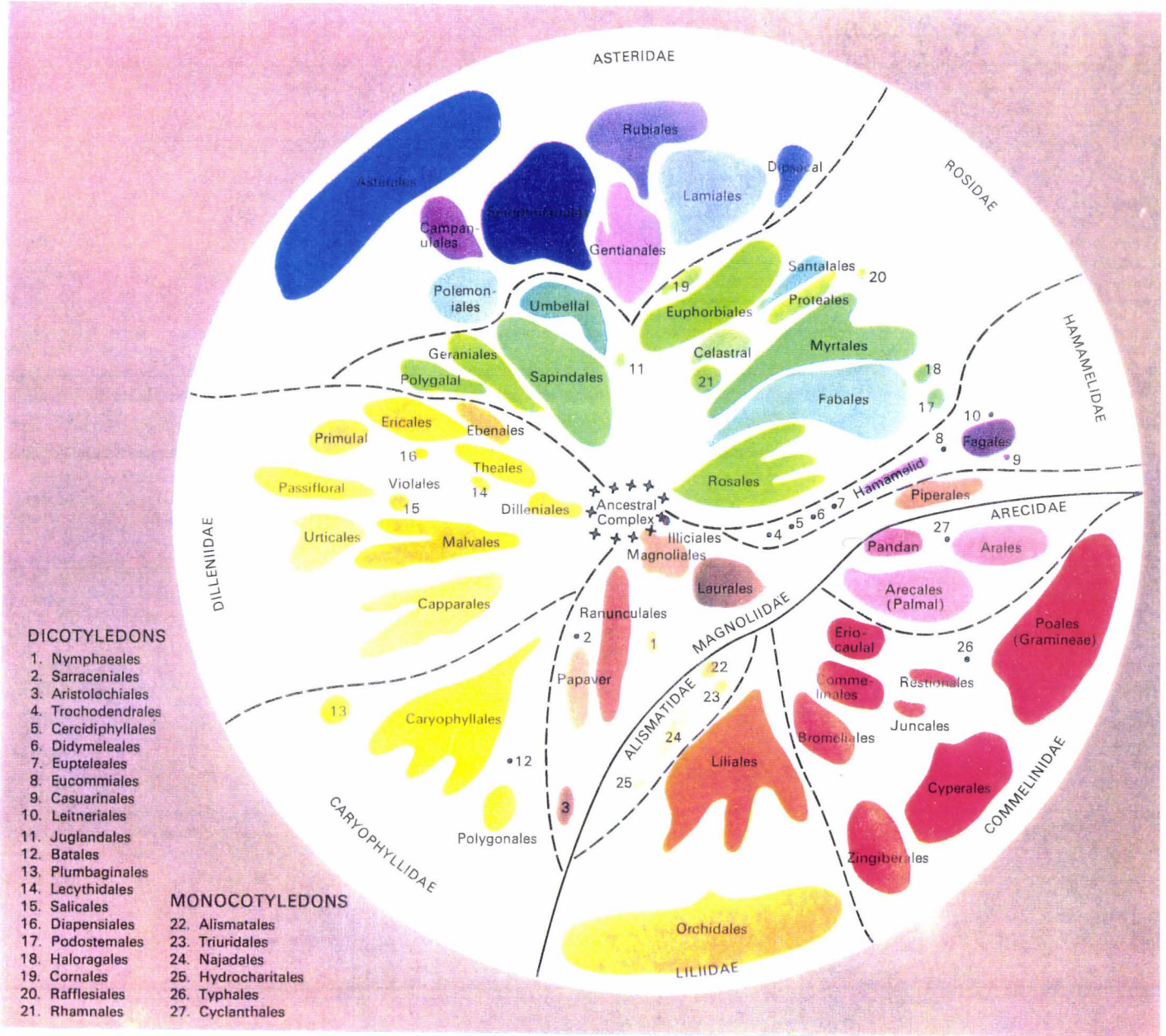


C. Schéma simplifié de la stratégie du séquençage:



ANNEXE 4

Diagramme évolutif montrant le degré relatif de spécialisation des Angiospermes



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aloni B., Daie J. et Wyse R. (1986) Enhancement of [¹⁴C] sucrose export from source leaves of *Vicia faba* by gibberellic acid. *Plant Physiol.* **82**, 962-966.
- Andrews M. (1986) The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environ.* **9**, 511-519.
- Angenon G., Van Montagu M. et Depicker A. (1990) Analysis of stop codon context in plant nuclear genes. *Febs Lett.* **271**, 144-146.
- ap Rees T. (1988) Hexose phosphate metabolism by nonphotosynthetic tissues of higher plants. In '*The Biochemistry of Plants*', pp.1-30, eds. Stumpf P.K., Conn E.E., Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Aslam M. et Huffaker R.C. (1984) Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. *Plant Physiol.* **75**, 623-628.
- Atkins C.A., Pate J.S. et Layzell D.B. (1979) Assimilation and transport of nitrogen in non-nodulated (NO₃⁻ grown) *Lupinus albus* L. *Plant Physiol.* **64**, 1078-1082.
- Avigad G. (1982) Sucrose and other disaccharides. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*: Pirson et Zimmermann eds, Springer-Verlag **13A**, 233-241.
- Baijal M. et Sane P.V. (1988) Arginine residue(s) at the active site(s) of the nitrate reductase complex from *Amaranthus*. *Phytochem.* **27**, 1969-1972.
- Banks G.R., Shelton P.A., Kanuga N., Holden D.W. et Spanos A. (1993) The *Ustilago maydis narI* gene encoding nitrate reductase activity: structural and transcriptional regulation. *Gene* **131**, 69-78.
- Bar-Akiva A. et Sagiv J. (1967) Nitrate reductase in the citrus plant: properties, assay conditions and distribution within the plant. *Physiol. Plant.* **20**, 500-506.
- Barber M.J. et Neame P.J. (1990) A conserved cysteine in molybdenum oxotransgenases. *J. Biol. Chem.* **265**, 20912-20915.
- Barber M.J. et Solomonson L.P. (1986) The role of the essential sulfhydryl group in assimilatory NADH:nitrate reductase of *Chlorella*. *J. Biol. Chem.* **261**, 4562-4567.
- Benzioni A., Vaadia Y. et Lips H. (1971) Nitrate uptake by roots is regulated by nitrate reductase products of the shoot. *Physiol. Plant.* **24**, 288-290.

- Birnboim H.C. et Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Ac. Res.* **7**, 1513-1523.
- Blahova M., Segeta V. (1980) Nitrate reductase activity in the course of cucumber leaf ontogenesis. *Biol. Plant.* **22**, 176-182.
- Bloom A.J., Caldwell R.M., Finazzo J., Warner R.L. et Weissabrt J. (1989) Oxygen and carbon dioxide fluxes from barley shoots depend on nitrate assimilation. *Plant Physiol.* **91**, 898-901.
- Borello U., Cecarelli E. et Giulano G. (1993) Constitutive, light-responsive and circadian clock responsive factors compete for the different *I* box elements in plant light-regulated promoters. *The Plant J.* **4**, 611-619.
- Brenner M.L. (1986) The role of hormones in photosynthate partitioning and seed filling. In P. J. Davies, ed, *Plant Hormones and Their Roles in Plant Growth and Development* Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, pp. 474-493.
- Brown J.W.S. (1986) A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from plant introns. *Nucl. Ac. Res.* **14**, 9549-9559.
- Brun W.A., Brenner M.L. et Schussler J.R. (1985) Hormonal communication between sources and sinks in soybean. *Br. Plant Growth Regul. Group Monogr.* **12**, 257-275.
- Caboche M. et Rouzé P. (1990) Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. *TIG* **6**, 187-192
- Calza R., Huttner E., Vincentz M., Rouzé P., Galangau F., Vaucheret H., Cherel I., Meyer C., Kronenberger J. et Caboche M. (1987) Cloning of DNA fragments complementary to tobacco nitrate reductase mRNA and encoding epitopes common to the nitrate reductase from higher plants. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 552-562.
- Campbell W. H., Smarelli J. (1986) Nitrate reductase: Biochemistry and regulation. in: *Biochemical Basis of Plant Breeding*, vol. pp 1-39 CA Neyra ed CRC Press Boca-Raton.
- Campbell W.H. et Kinghorn J.R. (1990) Functional domains of assimilatory nitrate and nitrite reductases. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 315-319.
- Cannons A.C. et Pendleton L.C. (1994) Possible role for mRNA stability in the ammonium-controlled regulation of nitrate reductase expression. *Biochem. J.* **297**, 561-565.

- Chaillou S. et Limami A. (1994) Le nitrate: un élément de choix pour la plante. *Culture Légumière* **11**, 18-20.
- Champigny M.-L. et Foyer C. (1992) Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. *Plant Physiol.* **100**, 7-12.
- Cheikh N. (1981) Effect of growth regulators on phloem exudation from excised tomato shoots (*Lycopersicon esculentum* Mill.). GA₃ effect on partitioning of labeled photoassimilates. Master's Thesis. University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Cheikh N. et Brenner M. (1992) Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves. *Plant Physiol.* **100**, 1230-1237.
- Cheng C.-L., Dewdney L., Kleinhofs A. et Goodman H.M. (1986) Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **83**, 6825-6828.
- Cheng C.-L., Acedo G., Dewdney J., Goodman H.M. et Conkling M.A. (1991) Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol.* **96**, 275-279.
- Cheng C.-L., Acedo G., Cristinsin M. et Conkling M.A. (1992) Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **89**, 1861-1864.
- Chérel I., Gonneau M., Meyer C., Pelsy F. et Caboche M. (1990) Biochemical and immunological characterization of nitrate reductase-deficient *nia* mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* **92**, 659-665.
- Choi H. K., Kleinhofs A. et An G. (1989) Nucleotide sequence of rice nitrate reductase genes. *Plant Mol. Biol.* **13**, 731-733.
- Chraïbi A. (1988) Régulation de l'activité nitrate réductase dans des suspensions cellulaires de Chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* var. Witloof). Thèse de Doctorat Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois.
- Chraïbi A., Palms B., Druart N., Goupil P., Gojon A. et Rambour S. (1994) Influence of abscisic acid on nitrogen partitioning, sucrose metabolism and nitrate reductase activity of chicory suspension cells. *J. Exp. Bot.* (soumis).
- Clifford P.E., Offler C. E. et Patrick J. W. (1986) Growth regulators have rapid effects on photosynthate unloading from seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **80**, 635-637.

- Clifford P.E. (1992) Understanding the source sink concept of phloem translocation. *J. Biol. Ec.* **26**, 112-115.
- Collins F.S. et Weissman S.M. (1984) Directional cloning of DNA fragments at a large distance from an initial probe: A circularization method. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **81**, 6812-6816.
- Cooper H.D., Clarkson D.T., Johnson M.G., Whiteway J.N. et Loughman B.C. (1986) Cycling of amino-nitrogen between shoots and roots in wheat seedlings. In: Lambers H., Neeteson J.J. et Stule I. (eds.), *Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants*, pp. 97-100. Martinus Nijhoff, Dordrecht, Pays-Bas.
- Cox K.H., De Leon D.V., Angerer L.M. et Angerer R.C. (1984) Detection of mRNAs in sea urchin embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev. Biol.* **101**, 485-502.
- Crawford N.M., Campbell W.H. et Davis R. (1986) Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. *Proc. Natl. Ac. Sc. USA* **83**, 8073-8076.
- Crawford N.R., Wilkinson J.Q. et LaBrie S.T. (1992) Control of nitrate reductase in plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**, 377-385.
- Crawford N.M. et Arst Jr.H.N. (1993) The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 115-146.
- Crawford N.M., Smith M., Bellissimo D. et Davis R.W. (1988) Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional domains. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **85**, 5006-5010.
- Daie J. (1986) Hormone-mediated enzyme activity in source leaves. *Plant Growth Regul.* **4**, 287-291.
- Daie J. (1993) Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: a key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. *Photosynth. Res.* **38**, 5-14.
- Daniel-Vedele F., Dorbe M. F., Caboche M. et Rouzé P. (1989) Cloning and analysis of the nitrate reductase gene from tomato: a comparison of nitrate reductase protein sequences in higher plants. *Gene* **85**, 371-380.
- Darlington C.D. et Wylie A.P. (1955) *Chromosome Atlas of Flowering Plants*, ed. 2: XIX+, Allen et Unwin, Lodon, 519 p.

- Darwen C.W.E. et John P. (1989) Localisation of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiol.* **89**, 658-663.
- Davies W.J. et Jones H.G. (1991) Abscisic acid: physiology and biochemistry. *BIOS Scientific Publishers Ltd.* W.J. Davies ed.
- de Almeida J., Van Montagu M. et Engler G. (1994) Whole mount *in situ* mRNA hybridization in plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* (sous presse).
- Decker C.J. et Parker R. (1994) Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. *TIBS* **19**, 336-340.
- de la Torre A., Delgado B. et Lara C. (1991) Nitrate-dependent O₂ evolution in intact leaves. *Plant Physiol.* **96**, 898-901.
- Dellaporta S. L., Wood J. et Hicks J. B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**, 19-21.
- Deng M., Moureaux T., Leydecker M.T. et Caboche M. (1990) Nitrate reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* **180**, 257-261.
- Dijkshoorn W. (1962) Metabolic regulation of the alkaline effect of nitrate utilization of plants. *Nature* **194**, 165-167.
- Diolez A., Langin T., Gerlinger C., Brygoo Y. et Daboussi M.-J. (1993) The *niaD* gene from *Fusarium oxysporum*: isolation, sequence and development of a homologous transformation system. *Gene* **131**, 61-67.
- Dorchies V. et Rambour S. (1983) Activité nitrate réductase mesuré *in vivo* chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) au cours du forçage. *Physiol. Vég.* **21**, 705-713.
- Dorchies V. et Rambour S. (1985) Activité nitrate réductase chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) à différents stades de développement et dans les tissus cultivés *in vitro*. *Physiol. Vég.* **23**, 25-35.
- Dubois T., Dubois J., Guedira M. et Vasseur J. (1988) Embryogénèse somatique directe sur les styles de *Cichorium*: effets de la température et origine des embryoides. *C. R. Ac. Sci. Paris* **307**, 669-675.
- Dujardin M., Louant B.-P. et Tilquin J.-P. (1979) Détermination du caryogramme de *Cichorium intybus* L. *Ann. Amélior. Plantes* **29**, 305-310.

- During H. et Alleweldt G. (1980) Effects of plant hormones on phloem transport in grapevines. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **93**, 339-347.
- Dwivedi U.N., Shiraishi N. et Campbell W.H. (1994) Identification of an essential cysteine of nitrate reductase via mutagenesis of its recombinant cytochrome *b* reductase domain. *J. Biol. Chem.* **269**, 13785-13791.
- Emes M.J. et Fowler M.W. (1979) The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. *Planta* **144**, 249-253.
- Evans H.J. et Nason A. (1953) Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.* **28**, 233-254.
- Faure J.-D., Vincentz M., Kronenberger J. et Caboche M. (1991) Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases. *The Plant J.* **1**, 107-113.
- Federova E., Greenwood J.S. et Oaks A. (1994) In-situ localization of nitrate reductase in maize roots. *Planta* **194**, 279-286.
- Fernández E., Schnell R., Ranum L., Hussey S., Silflow C. et Lefebvre P. (1989) Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **86**, 6449-6453.
- Ferrari T.E. et Varner J.E. (1969) Induction of nitrate reductase on barley aleurone layers. *Plant Physiol.* **51**, 423-431.
- Ferrari T.E. et Varner J.E. (1971) Intact tissue assay for nitrate reductase in barley aleurone layers *Plant Physiol.* **47**, 790-794.
- Fiala V. et Jolivet E. (1980) The aptitude of roots of witloof chicory for chicon production studied by their carbohydrate composition. *Sc. Hort.* **13**, 211-212.
- Fouldrin K. et Limami A. (1993) The influence of nitrogen ($^{15}\text{NO}_3^-$) supply to chicory (*Cichorium intybus* L.) plants during forcing on the uptake and remobilization of N reserves on chicon growth. *J. Exp. Bot.* **265**, 1313-1319.
- Foyer C.H., Noctor G., Lelandais M., Lescure J.C., Valadier, Boutin J.P. et Horton P. (1994) Short-term effects of nitrate, nitrite and ammonium assimilation on photosynthesis, carbon partitioning and protein phosphorylation in maize. *Planta* **192**, 211-220.

- Friemann A., Brinkmann K. et Hachtel W. (1991) Sequence of a cDNA encoding bi-specific NAD(P)H nitrate reductase from the tree *Betula pendula* and the identification of conserved protein domains. *Mol. Gen. Genet.* **227**, 97-105.
- Fu Y.-H. et Marzluf G.A. (1987) Molecular cloning and analysis of the regulation of *Nit-3*, the structural gene for nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Ac. Sci.* **84**, 8243-8247.
- Funkhouser E.A., Shen T.C. et Ackermann R. (1980) Synthesis of nitrate reductase in *Chlorella*. I. Evidence for an inactive protein precursor. *Plant Physiol.* **65**, 939-943.
- Gallie D.R. (1993) Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 77-105.
- Galau G.A., Hughes D.W. et Dure L.I. (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant genes (Lea) mRNA. *Plant Mol. Biol.* **7**, 155-170.
- Garnier E., Koch G.W., Roy J. et Mooney H.A. (1989) Responses of wild plants to nitrate availability. Relationships between growth rate and nitrate uptake parameters, a case study with two *Bromus* species, and a survey. *Oecologia* **79**, 542-550.
- Gautheret R.J. (1959) La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation. *Masson et Cie*. Paris.
- Gayler K.R. et Glasziou K.T. (1972) Physiological functions of acid and neutral invertases in growth and sugar storage sugar cane. *Physiol. Plant* **27**, 25-31.
- Gifford R.M., Thorne J.H. (1985) Phloem unloading in soybean seed coats: dynamics and stability of efflux into attached 'empty ovules'. *Plant Physiol.* **80**, 464-469.
- Glaab J. et Kaiser W.M. (1993) Rapid modulation of nitrate reductase in pea roots. *Planta* **191**, 173-179.
- Glass A. D. M. (1988) Nitrogen uptake in plant roots. *Atlas Plant Sci.: Plants and Animals* **1**, 151-156.
- Glass A.D., Shaff J.E. et Kochian L.V. (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley IV. Electrophysiology. *Plant Physiol.* **99**, 456-463.
- Goblet C., Prost E. et Whalen R.G. (1989) One-step amplification of transcripts in total RNA using the polymerase chain reaction *Nucl. Ac. Res.* **17**, 214.

- Gojon A., Plassard C. et Bussi C. (1994) Root/shoot distribution of NO₃⁻ assimilation in herbaceous and woody species. In *A Whole Plant Perspective On Carbon-Nitrogen Interactions*. Eds. J. Roy et E. Garnier, SPB Ac. Publishing, Netherlands, pp. 131-147.
- Gomez J., Sanchez-Martinez D., Stiefel V., Rigau J., Puigdomenech P. et Pages M. (1988) A gene induced by the plant growth hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycin-rich protein. *Nature* **334**, 262-264.
- Goodall G.J. et Phillipowicz W. (1989) The AU-rich sequences present in introns of plant nuclear pre-mRNAs are required for splicing. *Cell* **58**, 473-483.
- Gowri G. et Campbell W.H. (1989) cDNA clones for corn leaf NADH:nitrate reductase and chloroplast NAD(P)⁺:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Physiol.* **90**, 792-798.
- Green P. (1993) Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiol.* **102**, 1065-1070.
- Gruber H., Goetinck S.D., Kirk D.L. et Schmitt R. (1992) The nitrate reductase-encoding gene of *Volvox carteri*. *Gene* **120**, 75-83.
- Guedira, M., Dubois-Tylski T., Vasseur, J. and Dubois J. (1989) Embryogenèse somatique directe de cultures d'anthères de *Cichorium* (Asteraceae). *Can. J. Bot.* **67**, 970-976.
- Guerrero M.G., Vega J.M. et Losada M. (1981) The assimilatory nitrate reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **34**, 169-204.
- Guiard B. et Lederer F. (1979) The "cytochrome b₅ fold": structure of a novel protein superfamily. *J. Mol. Biol.* **135**, 639-650.
- Gultinan M.J., Marcotte W.R.Jr. et Quatrano R.S. (1990) A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* **250**, 267-271.
- Gupta A.K., Sopory S.K. et Guha-Mukherjee S. (1979) The presence of a non-inducible phase for nitrate reductase during early phase of germination in barley embryos. *Z. Pflanzenphysiol.* **92**, 249-254.
- Gupta A.K., Mann P., Kaur N. et Singh R. (1991) Profiles of enzymes in the leaves of chicory (*Cichorium intybus*) during development. *Plant Sci.* **77**, 191-196.
- Gutschick V.P. (1981) Evolved strategies in nitrogen acquisition by plants. *Amer. Nat.* **118**, 607-637.

- Hackett C.S., Novoa W.B., Ozols J. et Strittmatter P. (1986) Identification of the essential cysteine residue of NADH-cytochrome *b5* reductase. *J. Biol. Chem.* **261**, 9854-9857.
- Hackett S.C., Novoa W.B., Kensil C.R. et Strittmatter P. (1988) NADH binding to cytochrome *b5* reductase blocks the acetylation of Lysine 110. *J. Biol. Chem.* **263**, 7539-7543.
- Hames B.D. et Higgins S.J. (1985) In '*Nucleic Acid Hybridization A practical approach*' Practical Approach Series, IRL press, Oxford Washington D.C., Rickwood D. et Hames B.D., eds. pp 95-98.
- Harn C., Khayat E. et Daie J. (1993) Expression dynamics of genes encoding key carbon metabolism enzymes during sink to source transition of developing leaves. *Plant Cell Physiol.* **34**, 1045-1053.
- Hartung W. et Davies W.J. (1991) Drought-induced changes in physiology and ABA. In '*Abscisic acid: physiology and biochemistry*' BIOS Scientific Publishers Ltd. W.J. Davies ed., pp.63-75.
- Hedrich R. et Schroeder J. (1989) The physiology of ion channels and electrogenic pump in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **40**, 539-569.
- Hewitt E.J. et Nicholas D.J.D. (1964) Enzymes of inorganic nitrogen metabolism. In: '*Modern methods of plant analysis 7*'. Band. Vol. VII. Springer-Verlag-Berlin, Gröttingen, Heidelberg.
- Hewitt E.J. et Notton B.A. (1980) Nitrate reductase systems in eucaryotic and procaryotic organism. in: Molybdenum and molybdenum containing enzymes. Coughlan M. ed. Pergamon, London. pp 273-325.
- Hirschberg K., Hübner V. et Borriss H. (1972) Cytokinin-induzierte de novo-Synthese der Nitrat Reduktase in Embryonen von *Agrostemma githago* *Planta* **108**, 333-337.
- Ho L.C. (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **39**, 355-378.
- Ho L.C., Lechamy A. et Willenbrink J. (1991) Sucrose cleavage in relation to important metabolism of sugars in sink organs. In: Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation, Bonnemain J.L., Delrot S., Lucas W.J. et Dainty J., eds., Oest Editions, Nantes, pp. 178-186.

- Hocking P.J., Steer B.T. et Pearson C.J. (1984) Nitrate nutrition of non-leguminous crops: A review. Part 1.- *Field Crop Abstr.* **37**, 625-636.
- Hoff T. et Henningsen K. (1990) Isolation and characterization of a gene encoding nitrate reductase in bean. In *Abstr. 3rd Int. Symp. Nitrate Assimilation: Molecular and Genetic Aspects*, Bombannes. F. Pelsey, (ed), INRA, Versailles, France, pp. 125.
- Hoff T., Stummann B. M. et Henningsen K. W. (1991) Cloning and expression of a gene encoding a root specific nitrate reductase in bean (*Phaseolus vulgaris*) *Physiol. Plant.* **82**, 197-204.
- Hoff T., Stummann B. M. et Henningsen K. W. (1992) Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiol. Plant.* **84**, 616-624.
- Hoff T., Truong H.N. et Caboche M. (1994) The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant, Cell and Environm.* **17**, 489-505.
- House C.M. et Anderson J.W. (1980) Light-dependent reduction of nitrate by pea chloroplasts in the presence of nitrate reductase and C4-dicarboxylic acids. *Phytochemistry* **19**, 1925-1930.
- Howarth C.J. et Ougham H.J. (1993) Gene expression under temperature stress. *New Phytol.* **125**, 1-26.
- Huber S.C., Kerr P.S. et Kalt-Torres W. (1986) Biochemical control of allocation of carbon for export and storage in source leaves. In J. Cronshaw, W. J. Lucas, R. T. Giaquinta, eds, *Phloem Transport*. Alan R. Liss, New York, pp 355-367.
- Huber J.A., Huber S.C. et Nielsen T.H. (1989) Protein phosphorylation as a mechanism for regulation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase activity. *Arch. Bioch. Biophys.* **270**, 681-690.
- Huber S.C. et Huber J.A. (1991) Regulation of maize leaf sucrose-phosphate synthase by protein phosphorylation. *Plant Cell Physiol.* **32**, 319-326.
- Huber S.C. et Huber J.A. (1992 a) Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiol.* **99**, 1275-1278.
- Huber J.L.A. et Huber S.C. (1992 b) Site-specific serine phosphorylation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. *Biochem. J.* **283**, 877-882.

Huber J.L., Huber S.C., Campbell W.H. et Redinbaugh M.G. (1992 a) Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 58-65.

Huber S.C., Huber J.L., Campbell W.H. et Redinbaugh M.G. (1992 b) Comparative studies of the light modulation of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in spinach leaves. *Plant Physiol.* **100**, 706-712.

Huber S.C., Huber J.L., McMichael R.W., Campbell W.H. et Redinbaugh M.G. (1992 c) Regulation of cytoplasmic C- and N-metabolism by protein phosphorylation. In 'Research in photosynthesis', pp. 675-682 Murata N., ed., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Huber S.C., McMichael R.W., Huber J.L., Redinbaugh M.G. et Campbell W.M. (1993) Sucrose-phosphate synthase: regulation by protein phosphorylation and possible role in C/N interactions. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* **12**, 9-10.

Hunt A.G. (1994) Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 47-60.

Huppe H.C. et Turpin D.H. (1994) Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 577-607.

Hyde G.E., Wilberding J.A., Meyer A.L., Campbell E.R. et Campbell W.H. (1989) Monoclonal antibody-based immunoaffinity chromatography for purifying corn and squash NADH:nitrate reductases. Evidence for an interchain disulfide bond in nitrate reductase. *Plant Mol. Biol.* **13**, 233-246.

Hyde G.E., Crawford N.M. et Campbell W.H. (1991) The sequence of squash NADH:nitrate reductase and its relationship to the sequences of other flavoprotein oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **266**, 23542-23547.

Imsande J. et Touraine B. (1994) N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.* **105**, 3-7.

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

Jensen P.E., Hoff T., Stumann B.M. et Henningsen K.W. (1993) Résultats non-publiés; Données de EMBL/GenBank/DDBJ Data Bank sous le numéro U01029.

Johnstone I.L., McCabe P.C., Greaves P., Gurr S.J., Cole G.E., Brow M.A.D., Unkles S.E., Clutterbuck A.J., Kinghorn J.R. et Innis M.A. (1990) Isolation and

- characterization of the *cnrA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **90**, 181-192.
- Jolly S.O. et Tolbert N.E. (1978) NADH-nitrate reductase inhibitor from soybean leaves. *Plant Physiol.* **62**, 197-203.
- Kaiser W.M. et Spill D. (1991) Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis II. *In vitro* modulation by ATP and AMP. *Plant Physiol.* **96**, 368-375.
- Kaiser W.M., Spill D. et Brendle-Behnisch E. (1992) Adenine nucleotides are apparently involved in the light-dark modulation of spinach leaf nitrate reductase. *Planta* **186**, 236-240.
- Kaiser W.M. et Huber S. (1994) Modulation of nitrate reductase in vivo and in vitro: effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors, free Mg^{2+} and 5'-AMP. *Planta* **193**, 358-364.
- Kaiser W.M. et Huber S. C. (1994) Post translational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiol.* **106**, 817-821.
- Kamachi K., Amemiya Y., Ogura N. et Nakagawa H. (1987) Immuno-gold localization of nitrate reductase in spinach (*Spinaceae oleraceae*) leaves. *Plant Cell Physiol.* **28**, 333-338.
- Kato T. et Kubota S. (1978) Properties of invertases in sugar storage tissues of citrus fruit and changes in their activities during maturation. *Physiol. Plant.* **42**, 67-72.
- Kende H., Hahn H. et Kays S.E. (1971) Enhancement of nitrate reductase activity by benzyladenine in *Agrostemma githago*. *Plant Physiol.* **48**, 702-706.
- Khamis S., Lamaze T., Lemoine Y. et Foyer C.H. (1990) Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. *Plant Physiol.* **94**, 1436-1443.
- Kinghorn J.R. et Campbel W.H. (1989) Amino acid sequence relationships between bacterial, fungi and plant nitrate reductase proteins. In '*Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*', Eds. J. Wray and J. Kinghorn, pp. 385-403, Oxford Science Publications, Oxford.
- Kleinhofs A., Warner R.L., Hamat H.B., Juricek M., Huang C. et Schnorr K. (1988) Molecular genetics of barley and rice nitrate reductases. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* **7**, 35-42.

- Kleinhofs A. et Warner R.L. (1990) Advances in nitrate assimilation. In '*Intermediary nitrogen assimilation*', Eds. Miflin B.J. et Lea P.J., Academic Press, San Diego, pp. 89-120.
- Klepper L. et Hagemen R.H. (1969) The occurrence of nitrate reductase in apple leaves. *Plant Physiol.* **77**, 110-114.
- Klepper L., Flesher D. et Hageman R.H. (1971) Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.* **48**, 580-590.
- Klepper L.A. (1979) Effects of certain herbicides and their combination on nitrate and nitrite reduction. *Plant Physiol.* **64**, 273-275.
- Knypl J.S. (1977) Hormonal control of nitrate assimilation. Do phytohormones and phytochrome control the activity of nitrate reductase? In *Proceedings of the 1977 Long Ashton Symposium*, (Eds. E.J Hewitt et C.V. Cutting), pp. 541-556.
- Kronenberger J., Desprez T., Höfte H., Caboche M. et Traas J. (1993) A methacrylate embedding procedure developed for immunolocalization on plant tissues is also compatible with *in situ* hybridization *Cell Biol. Int.* **17**, 1013-1021.
- Kubo Y., Ogura N. et Nakagawa H. (1988) Limited proteolysis of the nitrate reductase from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* **263**, 19684-19689.
- LaBrie S.T. et Crawford N.M. (1994) A glycine to aspartic acid change in the MoCo domain of nitrate reductase reduces both activity and phosphorylation levels in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **269**, 14497-14501.
- Lambers H., Simpson R.J., Beilharz V.C. et Dalling M.J. (1982) Growth and translocation of C and N in wheat (*Triticum aestivum*) grown with a split root system. *Physiol. Plant.* **56**, 421-429.
- Le K. et Lederer F. (1983) On the presence of a heme binding domain homologous to cytochrome *b5* in *Neurospora crassa* assimilatory nitrate reductase. *EMBO J.* **2**, 1909-1914.
- Lee R.B. (1980) Sources of reductant for nitrate assimilation in non photosynthetic tissues. *Plant, Cell Environm.* **3**, 65-90.
- Li X.-Z. et Oaks A. (1993) Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*: Influence of NO₃⁻. *Plant Physiol.* **102**, 1251-1257.

- Lillo C. (1984) Circadian rhythmicity of nitrate reductase activity in barley leaves. *Physiol. Plant.* **61**, 219-223.
- Lillo C. (1991) Diurnal variations of corn leaf nitrate reductase: an experimental distinction between transcriptional and post-transcriptional control. *Plant Sci.* **73**, 149-154.
- Lillo C. (1994) Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.* **90**, 616-620.
- Limami A., Roux L., Laville J. et Roux Y. (1993) Dynamics of nitrogen compounds in the chicory (*Cichorium intybus* L.) tuberised tap root during the growing season and cold storage period. *J. Plant Physiol.* **141**, 263-268.
- Limami A. et Fiala V. (1993) Fructan polymerization and depolymerization during the growth of chicory (*Cichorium intybus* L.) plant. In: Eds. A. Fuchs, Inulin and Inulin-containing crops; Studies in Plant Science, Vol. 3, Elsevier Amsterdam.
- Lin Y., Hwang C.-F., Brown J.B. et Cheng C.-L. (1994) 5' proximal regions of *Arabidopsis* nitrate reductase genes direct nitrate-induced transcription in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **106**, 477-484.
- Long D. M. et Oaks A. (1990) Stabilization of nitrate reductase in maize roots by chymostatin. *Plant Physiol.* **93**, 846-850.
- Long D.M., Oaks A. et Rothstein S.J. (1992) Regulation of maize root nitrate reductase mRNA levels. *Physiol. Plant.* **85**, 561-566.
- Losada M., Guerrero M.G. et Vega J.M. (1981) The assimilatory reduction of nitrate. In: Biochemistry and physiology of nitrogen and sulfur metabolism. Eds. Bothe H., Trebst A. Berlin Springer, p. 30-61.
- Lu J.-L., Ertl J. R. et Chen C.-M. (1990) Cytokinins enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. *Plant Mol. Biol.* **15**, 585-594.
- Lu J.-L., Ertl J. R. et Chen C.-M. (1992) Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.* **98**, 1255-1260.
- Lu G., Campbell W., Schneider G. et Lindqvist Y. (1994) Crystal structure of the FAD-containing fragment of corn nitrate reductase at 2.5Å resolution: relationship to other flavoprotein reductases. *Structure* **2**, 809-821.

- Ludevid D., Höfte H., Himmelbau E. et Chrispeels M. J. (1992) The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein γ -TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Physiol.* **100**, 1633-1639.
- Ma H. (1993) Protein phosphorylation in plants: enzymes, substrates and regulators. *TIG* **9**, 228-230.
- MacKintosh C. (1992) Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Bioch. Biophys. Ac.* **1137**, 121-126.
- MacKintosh R.W. et MacKintosh C. (1993) Regulation of plant metabolism by reversible protein (serine/threonine) phosphorylation. In '*Posttranslational modifications in Plants*', pp. 197-212, (Society for experimental biology, Seminar series 53), Battey N.H., Dickinson H.G., Hetherington A.M., eds., Cambridge University Press.
- Manh C.-T., Boutin J.-P., Provot M. et Champigny M.-L. (1994) Metabolite effects for short-term nitrogen-dependent enhancement of phosphoenolpyruvate carboxylase activation and decrease of net sucrose synthesis in wheat leaves. *Physiol. Plant.* (sous presse).
- Marschner H., Römheld V., Horst W.J. et Martin P. (1986) Root-induced changes in the rhizosphere: importance for mineral nutrition of plants. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* **149**, 441-456.
- Masuda H., Takahashi T. et Sugawara S. (1987) The occurrence and properties of alkaline invertases in mature roots of sugar beets. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2309-2314.
- McClure P.R., Kochian L.V., Spanswick R.M. et Shaff J.E. (1990) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots, I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol.* **93**, 281-289.
- Melzer J.M., Kleinhofs A. et Warner R.L. (1989) Nitrate reductase regulation: effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 341-346.
- Meyer C., Levin J.M., Roussel J.M., Hoarau J., Gabard J. et Rouzé P. (1987) Bromophenol blue:nitrate reductase activity in *Nicotiana plumbaginifolia*. An immunological and genetic approach. *Biochimie* **69**, 735-742.
- Miyazaki J., Juricek M., Angelis K., Schnorr K.M., Kleinhofs A. et Warner R.L. (1991) Characterization and sequence of a novel nitrate reductase from barley. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 329-334.

Moench et al. (1985) Efficiency of *in situ* hybridization as a function of probe size and fixation technique. *J. Virol. Methods* **11**, 119-130.

Morris D.A. et Arthur E.D. (1984) An association between acid invertase activity and cell growth during leaf expansion in *Phaseolus vulgaris* L.. *J. Exp. Bot.* **35**, 1369-1379.

Morris D.A. et Arthur E.D. (1985) Invertase activity, carbohydrate metabolism and cell expansion in the stem of *Phaseolus vulgaris* L.. *J. Exp. Bot.* **36**, 623-633.

Mundy J., Yamaguchi-Shinozaki K. et Chua N.-H. (1990) Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-response promoter of a rice rab gene. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **87**, 406-410.

Murashige T. et Skoog K. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.

Muthukrishnan S., Chandra G.R. et Albaugh G.P. (1983) Modulation by abscisic acid and S-2 aminoethyl-L-cysteine of α -amylase mRNA in barley aleurone cells. *Plant Mol. Biol.* **2**, 249-258.

Naik M.S. et Nicholas D.J.D. (1981) Relation between CO₂ evolution and *in situ* reduction of nitrate in wheat leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **8**, 515-524.

Naik M.S. et Nicholas D.J.D. (1986) Malate metabolism and its relation to nitrate assimilation in plants. *Phytochemistry* **25**, 571-576.

Nakagawa H., Kubo Y., Shiraishi N., Sato Y. et Ogura N. (1990) Functional domains in higher plant nitrate reductase. In '*Abstracts of Third International Symposium on Nitrate Assimilation, Molecular and Genetic Aspects*3, p. 78. Bombannes, INRA-Versailles, France.

Neame P.J. et Barber M.J. (1989) Conserved domains in molybdenum hydroxylases. The amino acid sequence of chicken hepatic sulfite oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**, 20894-20901.

Ngambi J.M., Amblard P., Bismuth E. et Champigny M.-L. (1981) Etude des activités enzymatiques nitrate reductase et glutamine synthétase liées à l'assimilation des nitrates chez un mil *Pennisetum americanum* 23 DB *Can. J. Bot.* **59**, 1050-1055.

- Nguyen-Quoc B. (1991) Les saccharoses synthases de Maïs et la régulation de leur expression dans la feuille en croissance *Thèse de Doct. Univ. de Paris XI*, pp. 129.
- Ninnemann O., Jauniaux J.-C. et Frommer W.B. (1994) Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *EMBO J.* **13**, 3464-3471.
- Notton B.A., Barber M.J., Fido R.J., Whitford P.N. et Solomonson L.P. (1988) Limited proteolysis of spinach nitrate reductase. *J. Cell Biol.* **107**, 846 (Abstr.).
- Oaks A. (1994) Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* **72**, 739-750.
- Oaks A. (1994) Efficiency of nitrogen utilization in C3 and C4 plants. *Plant Physiol.* **106**, 407-414.
- Oji Y., Watanabe M., Wakiuchi N. et Okamoto S. (1985) Nitrite reduction in barley-root plastids: dependence on NADH coupled with glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases, and possible involvement of an electron carrier and a diaphorase. *Planta* **165**, 85-90.
- Okamoto P.M., Fu Y.-H. et Marzluf G.A. (1991) *Nit-3*, the structural gene of nitrate reductase in *Neurospora crassa* : nucleotide sequence and regulation of mRNA synthesis and turnover. *Mol. Gen. Genet.* **227**, 213-223.
- Omata T. (1991) Cloning and characterization of the *nrtA* gene that encodes a 45-kDa protein involved in the nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **32**, 151-157.
- Omata T., Andriessse X. et Hirano A. (1993) Identification and characterization of the gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Mol. Gen. Genet.* **236**, 2-3.
- Omata T., Ohmori M., Arai N. et Ogawa T. (1989) Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 defective in the nitrate transport. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **86**, 6612-6616.
- Pace G.M., Volk R.J. et Jackson W.A. (1990) Nitrate reduction in response to CO_2 -limited photosynthesis. *Plant Physiol.* **92**, 286-292.
- Palmer C.E. (1981) Influence of abscisic acid on nitrate accumulation and nitrate reductase activity in potato tuber slices. *Plant Cell Physiol.* **22**, 1541-1551.

- Palmer C.E. (1985 a) The effect of abscisic acid on amino nitrogen and protein content of potato plants in relation to the inhibition of nitrate reductase activity. *Plant Cell Physiol.* **26**, 1083-1091.
- Palmer C.E. (1985 b) The relationship of abscisic acid to nitrate reductase activity in the potato plant. *Plant Cell Physiol.* **26**, 1167-1174.
- Pate J.S. (1973) Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Bioch.* **5**, 109-119.
- Pate J.S. (1980) Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 313-340.
- Pelsy F. et Gonneau M. (1991) Genetic and biochemical analysis of intragenic complementation events among nitrate reductase apoenzyme-deficient mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Genetics* **127**, 199-204.
- Pelsy F. et Caboche M. (1992) Molecular genetics of nitrate reductase in higher plants. *Adv. Genet.* **30**, 1-40.
- Pilgrim M.L., Caspar T., Quail P.H. et McClung C.R. (1993) Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **23**, 349-364.
- Pollock C.J. et Chatterton N.J. (1988) Fructans. In 'The Biochemistry of Plants'. Vol14, ed. J. Preiss, Academic Press, pp. 109-140.
- Prosser I.M. et Lazarus C.M. (1990) Nucleotide sequence of a spinach nitrate reductase cDNA. *Plant Mol. Biol.* **15**, 187-190.
- Quesada A., Galvàn A., Schnell R.A., Lefebvre P.A. et Fernández E. (1993) Five nitrate assimilation related genes are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* **240**, 387-394.
- Quesada A., Galvàn A. et Fernández E. (1994) Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant J.* **5**, 407-419.
- Radin J.W. (1974) Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. *Plant Physiol.* **53**, 458-463.
- Radin J.W. (1975) Differential regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of cotton plants. *Plant Physiol.* **55**, 178-182.

- Rambaud C. (1986) Evolution et caractérisation de la nitrate réductase au cours de l'embryogénèse somatique chez *Daucus carota* L. Thèse 3ème cycle, Univ. de Lille I.
- Rambaud C. et Rambour S. (1989) Partial characterization of nitrate reductase in carrot cells: changes in enzymatic activity during somatic embryogenesis. *Plant Physiol. Biochem.* **27**, 235-243.
- 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 de tissus de Chicorée de Bruxelles cultivés *in vitro*. Thèse d'Etat, Univ. de Lille.
- Rao L.V.M., Datta N., Mahadevan M., Guha-Mukherjee S. et Sopory S.K. (1984) Influence of cytokinins and phytochrome on nitrate reductase activity in etiolated leaves of maize. *Phytochem.* **23**, 1875-1879.
- Rastogi R., Back E., Schneiderbauer A., Bowscher C.G., Moffatt B. and Rothstein S.J. (1993) A 330 bp region of the spinach nitrite reductase gene promoter directs nitrate-inducible tissue-specific expression in transgenic tobacco. *Plant J.* **4**, 317-326.
- Raven J.A. et Smith F.A. (1976) Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* **76**, 415-431.
- Redinbaugh M.C. et Campbell W.H. (1985) Quaternary structure and composition of squash NADH nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* **260**, 3380-3385.
- Redinbaugh M.C. et Campbell W.H. (1991) Higher plant responses to environmental nitrate. *Physiol. Plant.* **82**, 640-650.
- Reinink K., van Nes M. et Groenwald R. (1994) Genetic variation for nitrate content between cultivars of endive (*Cichorium endiviae* L.). *Euphytica* **75**, 41-48.
- Remmler J.L. et Campbell W.H. (1986) Regulation of corn leaf nitrate reductase. II. Synthesis and turnover of the enzyme's activity and protein. *Plant Physiol.* **80**, 442-447.
- Ricardo C.P.P. (1974) Alkaline β -fructofuranosidases of tuberous roots: Possible physiological function. *Planta* **118**, 333-343.
- Robinson J.M. (1988) Spinach leaf chloroplast CO_2 and NO_2^- photoassimilates do not compete for photogenerated reductant. Manipulation of reductant levels by quantum flux density titration. *Plant Physiol.* **88**, 1373-1380.

- Ross A.H. et Davies H.V. (1992) Sucrose metabolism in tubers of potato. *Plant Physiol.* **98**, 287-293.
- Ross G.S., Minchin P.E.H. et McWha J.A. (1987) Direct evidence of abscisic acid affecting phloem unloading within the seed coat of peas. *J. Plant Physiol.* **129**, 435-441.
- Rouzé P. et Caboche M. (1992) Nitrate reduction in plants: molecular approaches to function and regulation. In *'Inducible Plant Proteins: Their Biochemistry and Molecular Biology.'* Eds. Wray J.L., pp. 45-77, Cambridge University Press, Cambridge.
- Rufty T.W., Thomas J.F., Remmler J., Campbell W.H. et Volk R.J. (1986) Intracellular localization of nitrate reductase in roots. *Plant Physiol.* **82**, 675-680.
- Ruiz-Cristin J. et Briskin D.P. (1991) Characterization of a H⁺/NO₃⁻ symport associated with plasma membrane vesicles of maize roots using ³⁶ClO₃⁻ as a radiotracer analog. *Arch. Biochem. Biophys.* **285**, 74-82.
- Rychlick W. et Rhoads R.E. (1990) A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in-vitro amplification of DNA. *Nucl. Ac. Res.* **17**, 8543-8551.
- Sachs A.B. (1993) Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* **74**, 413-421.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Salanoubat M. et Ha D. B. D. (1993) Analysis of the petunia nitrate reductase apoenzyme-encoding gene: a first step for sequence modification analysis. *Gene* **128**, 147-154.
- Salisbury F.B. et Ross C.W. (1985) Transport in the phloem. In *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company, Belmont, pp. 135-161.
- Salsac L. (1982) Absorption et accumulation des ions minéraux par les racines. In *'Mieux comprendre les interactions sol-racines. Incidence sur la nutrition minérale'* Eds INRA, pp. 121-18.
- Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Second Edition New-York, Cold-Spring Harbor Laboratory (Vol 1, 2 et 3).

- Sanger F. (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**, 1205-1210.
- Sankhla M. et Huber W. (1975) Effect of salt and abscisic acid on in vivo activity of nitrate reductase in seedlings of *Phaseolus acoitifolius*. *Z. Pflanzenphysiol.* **76**, 467-470.
- Schmerder B. et Borriss H. (1986) Induction of nitrate reductase by cytokinin and ethylene in *Agrostemma githago* L. embryos. *Planta* **169**, 539-593.
- Sechley K.A., Oaks A. et Bewley J.D. (1991) Enzymes of nitrogen assimilation undergo seasonal fluctuations in the roots of the persistent weedy perennial *Cichorium intybus*. *Plant Physiol.* **97**, 322-329.
- Sery A. (1992) Etude de la saccharose synthase chez le pois (*Pisum sativum*). Mémoire DEA INAPG, pp.25.
- Setter T.L., Brun W.A. et Brener M.L. (1981) Abscisic acid translocation and metabolism in soybeans following depodding and petiole girdling treatments. *Plant Physiol.* **67**, 301-306.
- Shaner D.C. et Boyer J.S. (1976) Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol.* **58**, 499-504.
- Sharkey T.D., Berry J.A. et Raschke K. (1985) Starch and sucrose synthesis in *Phaseolus vulgaris* as affected by light, CO₂ and abscisic acid.
- Shirashi N., Sato T., Ogura N. et Nakagawa H. (1992) Control by glutamine of the synthesis of nitrate reductase in cultural spinach cells. *Plant Cell Physiol.* **33**, 727-731.
- Siddiqi M., Glass A.D.M., Ruth T.J. et Rufty T.W.Jr. (1990) Studies of the nitrate uptake in barley. *Plant Physiol.* **93**, 1426-1432.
- Siegl G. et Stitt M. (1990) Partial purification of two forms of spinach leaf sucrose phosphate synthase in leaves which differ in their kinetic properties *Plant Sci.* **66**, 205-210.
- Sinclair J. (1987) Changes in spinach thylakoid activity due to nitrite ions. *Photosynth. Res.* **12**, 255-563.
- Smirnoff N., Todd P. et Stewart G.R. (1984) The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants. *Ann. Bot.* **54** 363-374.

- Solomonson L.P. et McCreery M.J. (1986) Radiation inactivation of assimilatory NADH: nitrate reductase from *Chlorella*: catalytic and physical sizes of functional units. *J. Biol. Chem.* **261**, 806-810.
- Solomonson L.P. et Barber M.J. (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 225-253.
- Solomonson L.P., Barber M.J., Robbins A.P. et Oaks A. (1986) Functional domains of assimilatory NADH:nitrate reductase from *Chlorella vulgaris*. *J. Biol. Chem.* **259**, 849-853.
- Somers D.A., Kuo T.-M., Kleinhofs A., Warner R.L. et Oaks A. (1983) Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. *Plant Physiol.* **72**, 949-952.
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Stebbins G.L. (1974) In '*Flowering Plants of the World*', pp. 13, eds. V.H. Heywood, Oxford University Press, Oxford.
- Stitt M., Huber S.C. et Kerr P. S. (1988) Control of photosynthetic sucrose formation. In *MD Hatch, N. K. Boardman, eds, Biochemistry of Plants, Vol 10*, Academic Press, New York, pp 327-409.
- Stöhr C., Tischner R. et Ward M.R. (1993) Characterization of the plasma membrane bound nitrate reductase in *Chlorella saccharophila*. *Planta* **191**, 79-85.
- Streit L., Nelson R.S. et Harper J.E. (1986) Nitrate reductases from wild-type and *nr1*-mutant soybean leaves. I. Purification, kinetics and physical properties. *Plant Physiol.* **78**, 80-84.
- Sullivan M.L. et Green P. (1993) Post-transcriptional regulation of nuclear-encoded genes in higher plants: the roles of mRNA stability and translation. *Plant Mol. Biol.* **23**, 1091-1104.
- Sung S.S., Xu D. et Black C.C. (1989) Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiol.* **89**, 1117-1121.
- Suty L., Moureaux T., Leydecker M.-T. et Teyssendier de la Serve B. (1993) Cytokinin affects nitrate reductase expression through the modulation of polyadenylation of the nitrate reductase mRNA transcript. *Plant Sci.* **90**, 11-19.

- Syrett P.J. (1953) The assimilation of ammonia by nitrogen-starved cells of *Chlorella vulgaris*. Part I. The correlation of assimilation with respiration. *Ann. Bot.* **65**, 1-19.
- Syrett P.J. (1956) The assimilation of ammonia and nitrate by nitrogen-starved cells of *Chlorella vulgaris*. Part IV. The dark fixation of carbon dioxide. *Plant Physiol.* **9**, 165-171.
- Syrett P.J. (1988) Uptake and utilization of nitrogen compounds. In *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria*, eds. L.J. Rogers, J.R. Gallon, Oxford: Clarendon, pp. 23-29.
- Takahashi H., Koshio K. et Ota Y. (1993) Effects of ABA application to the culture solution on the growth, water relations and temperature stress in tomato plants. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **62**, 389-397.
- Tang P.S. et Wu H.Y. (1957) Adaptive formation of nitrate reductase in rice seedlings. *Nature* **179**, 1355-1356.
- Tautz D. et Pfeife C. (1989) A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*.
- Thibaud J.B. et Grignon C. (1981) Mechanism of nitrate uptake in corn roots. *Plant Sc. Letters* **22**, 279-289.
- Thomas P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **77**, 5201-5205.
- Thomas R.J., Feller U. et Erismann K.H. (1979) The effect of difference in organic nitrogen sources and plant age on the composition of bleeding sap of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.* **82**, 657-669.
- Tindall K.R. et Kunkel T.A. (1988) Fidelity of DNA synthesis by *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**, 6008-6013.
- Toponi M. (1983) Sur la culture de fragments de feuilles d'endive (*Cichorium intybus* L.) *C. R. Ac. Sci. Paris* **257**, 3212-3215.
- Touraine B., Grignon N. et Grignon C. (1988) Charge balance in NO₃⁻ fed soybean. Estimation of K⁺ and carboxylate recirculation. *Plant Physiol.* **88**, 605-612.
- Touraine B., Clarkson D.T. et Muller B. (1994) Regulation of nitrate uptake at the whole plant level. In 'A whole plant perspective on carbon-nitrogen interaction'. SPB Academic Publishing, The Hague, pp. 11-30.

- Tsay Y.-F., Schroeder J.I., Feldmann K.A. et Crawford N.M. (1993) The herbicide sensitive gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705-713.
- Tsay Y.-F., Schroeder J.I. et Crawford N.M. (1994) Analysis of nitrate transport in *Arabidopsis* at the molecular level. In 'Abstracts of the 4th International Congress of Plant Molecular Biology' (Amsterdam, The Netherlands), Abstract 1005.
- Unkles S.E., Hawker K.L., Campbell E.I., Montague P. et Kinghorn J.R. (1991) *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **88**, 204-208.
- Unkles S.E., Campbell E.I., Punt P.J., Hawker K.L., Contreras R., Hawkins A.R., Van den Hondel C.A.M.J.J. et Kinghorn J.R. (1992) The *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase: upstream nucleotide and amino acid sequence comparisons. *Gene* **111**, 149-155.
- Van Bel A.J.E. (1993) Strategies of phloem loading. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 253-281.
- Van Quy L., Foyer C. et Champigny M.L.. (1991a) Effect of light on NO₃⁻ on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Evidence for covalent modification of the C3 enzyme. *Plant Physiol.* **97**, 1476-1482.
- Van Quy L., Lamaze T. et Champigny M.-L. (1991b) Short-term effects of nitrate on sucrose synthesis in wheat leaves. *Planta* **185**, 53-57.
- Van Quy L. et Champigny M.-L. (1992) NO₃⁻ enhances the kinase activity for phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase and sucrose phosphate synthase proteins in wheat leaves. *Plant Physiol.* **99**, 344-347.
- Vasseur, J., Lefebvre, R. and Backoula, E. (1986) Sur la variabilité de la capacité rhizogène d'explants racinaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof cultivés in vitro : influence de la dimension des explants initiaux et de la durée de conservation des racines au froid. *Can. J. Bot.* **64**, 243-247.
- Vaucheret H., Vincentz M., Kronenberger J., Caboche M. et Rouzé P. (1989) Molecular cloning and characterization of the two homologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **216**, 10-15.
- Vaughn K.C. et Campbell W.H. (1988) Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol.* **88**, 1354-1357.

- Verwoerd T.C., Dekker B.M.M. et Hoekema A. (1989) A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucl. Ac. Res.* **6**, 2362.
- Vierstra R.D. (1993) Protein degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 385-410.
- Vincentz M. et Caboche M. (1991) Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *EMBO J.* **10**, 1027-1035.
- Vincentz M., Moureau T., Leydecker M.T., Vaucheret H. et Caboche M. (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves and carbon metabolites. *The Plant J.* **3**, 315-324.
- Vreugdenhil D. (1983) Abscisic acid inhibits phloem loading of sucrose. *Physiol. Plant.* **57**, 403-467.
- Vuylsteker C. (1991) *Cichorium intybus* et *Arabidopsis thaliana* transformé par le gène aux2 d'*Agrobacterium tumefaciens*; Etude de la régulation de l'expression du gène de la nitrate réductase par l'auxine. Aptitude à l'hydrolyse du naphtylacétamide en naphtylacétate. DEA-Université de Technologies de Compiègne, pp44.
- Wallace W. (1974) Purification and properties of nitrate reductase inactivating enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **341**, 265-274.
- Wallace W. et Pate J.S. (1965) Nitrate reductase activity in the field pea (*Pisum arvense* L.) *Ann. Bot.* **29**, 655-671.
- Wallace W. et Oaks A. (1986) Role of proteinases in the regulation of nitrate reductase. In '*Plant Proteolytic Enzymes*', ed. Dalling M.J., pp. 81-89, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Ward M.R., Tischner R. et Huffaker R.C. (1988) Inhibition of nitrate transport by antinitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots in barley seedlings. *Plant Physiol.* **88**, 1141-1145.
- Warner R.L. et Kleinhofs A. (1981) Nitrate utilization by nitrate deficient barley mutants. *Plant Physiol.* **67**, 740-743.
- Waterhouse R.N., Smyth A.J., Prosser I.M. et Forde B.G. (1994) Cloning and characterization of the nitrate reductase gene in *Lotus japonicus* L. Résultats non-publiés, issus de la EMBL/GenBank/DDBJ databases sous le numéro d'accès X80670.

- Weissman G. (1972) Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. *Plant Physiol.* **49**, 138-141.
- Wilkinson J.Q. et Crawford N.M. (1991) Identification of the *Arabidopsis* *CHL3* gene as the nitrate reductase structural gene *NIA2*. *The Plant Cell* **3**, 461-471.
- Wilkinson J.Q. et Crawford N.M. (1993) Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural *NIA1* and *NIA2*. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 289-297.
- Williams R.S.B., Davis M.A. et Howlett B.J. (1994) Nitrate reductase of the ascomycetous fungus, *Leptosphaeria maculans*: gene sequence and chromosomal location. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 1-8.
- Willmitzer L., Kossmann J., Müller-Röber B., von Schaeven A. et Sonnewald U. (1993) Approaches to influence the partitioning and metabolism of carbohydrates in transgenic plants. In *Control of Gene Expression*. Eds. Verma, CRC Press.
- Wray J.L. et Fido R.J. (1991) Nitrate reductase and nitrite reductase. In '*Methods in Plant Biochemistry Vol.3*' Academic Pres Ltd.
- Wu S., Lu Q., Kriz A.L. et Harper J.E. (1993) Molecular analysis of soybean inducible nitrate reductase and its regulation in wild-type and *nr1*-mutant. Résultats non-publiés, issus de la EMBL/Data Bank sous le numéro d'accès L23854.
- Wyse R.E. et Saftner R.A. (1982) Reduction in sink-mobilizing ability following periods of high carbon flux. *Plant Physiol.* **69**, 226-228.
- Yamagashi K., Sato T., Ogura N. et Nakagawa H. (1988) Isolation and some properties of a 115-kilodalton nitrate reductase-inactivator protein from *Spinaceae oleraceae*. *Plant Cell Physiol.* **29**, 371-376.
- Yamaya T. et Ohira K. (1977) Purification and properties of a nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* **18**, 915-925.
- Yamaya T. et Oaks A. (1980) Activation of nitrate reductase by extracts from corn scutellum. *Plant Physiol.* **66**, 212-214.
- Yubisui T., Naitoh Y., Zenno S., Tamura M., Takeshita M. et Sakaki Y. (1987) Molecular cloning of cDNAs of human liver and placenta NADH-cytochrome *b5* reductase. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **84**, 3609-3613.

Yubisui T., Miyata T., Iwanaga S., Tamura M., Yoshida S., Takeshita M. et Nakajima H. (1984) Amino-acid sequence of NADH-cytochrome *b5* reductase of human erythrocytes. *J. Biochem.* **96**, 579-582.

Zimmerman G., Kelly G.J. et Latzko E. (1978) Purification and properties of spinach cytoplasmic F-1,6-BPase. *J. Biol. Chem.* **253**, 5952-5956.

RÉSUMÉ

RÉSUMÉ

Après le clonage d'un ADNc nitrate réductase nous avons isolé et séquencé le gène structural nitrate réductase (*nia*) de la chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* L.) par PCR. L'analyse par hybridation génomique laisse supposer la présence d'un seul gène *nia* par génome haploïde. Le gène de 5222 bp possède trois introns situés dans la partie molybdique et code pour une protéine de 920 acides aminés. La séquence en acides aminés de la protéine nitrate réductase (NR) de chicorée avec les NR d'autres espèces présente un taux d'homologie jusqu'à 78 %.

Dans les jeunes plantules l'activité nitrate réductase est 10 fois plus importante dans les racines que dans les feuilles. Nous avons pu mettre en évidence une régulation spatiale du gène *nia* selon la concentration en nitrate de la solution nutritive. Les hybridations *in situ* montrent que pour une concentration de 200 μ M de nitrate le gène s'exprime d'un façon homogène dans le parenchyme de la racine ainsi que dans l'apex, tandis qu'à une concentration de 5 mM l'expression se situe principalement dans la stèle et également dans l'apex racinaire.

Dans des cultures de suspensions cellulaires de chicorée, l'activité NR est maximale au 3^{ème} jour, puis elle diminue lorsque le saccharose du milieu est épuisé. Les activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme du saccharose (invertase [INV], saccharose synthase [SS], et saccharose phosphate synthase [SPS]) présentent le même profil que l'ANR.

L'acide abscissique à 10^{-4} M provoque une inhibition de la croissance cellulaire, inhibe les activités INV, SS et SPS mais augmente paradoxalement l'ANR. Cet accroissement de l'ANR n'est pas lié à une modification de l'activité transcriptionnelle, mais peut éventuellement s'expliquer par un apport plus important de pouvoirs réducteurs. Une régulation post-traductionnel de la NR et de la SPS s'exerce apparemment par des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation.

Mots-clés: Nitrate réductase - *Cichorium intybus* - *in situ* - ADNc- génomique - ABA - nitrate - SPS - racine

SUMMARY

After cloning of a partial nitrate reductase cDNA we have isolated and sequenced the nitrate reductase structural gene (*nia*) from chicory (*Cichorium intybus* L. var. Witloof) by means of primer walking using the polymerase chain reaction (PCR) on genomic DNA. Southern blot analysis reveals the presence of only one gene, hereafter referred as *nia*, per haploid genome. The 5222 bp long *nia*-gene shows a similar structure to the other nitrate reductase genes and encodes a protein of 920 amino acids. Protein alignments show a degree of homology up to 78 %.

Nitrate reductase activity is ten-fold higher in the roots compared to the leaves. Northern analysis revealed besides the nitrate inducibility of the *nia*-gene a higher level of expression in the roots. *In situ* hybridizations revealed a spatial regulation of the *nia* gene by the quantity of nitrate supplied in the growth medium. At 5 mM of nitrate NR-mRNA accumulation occurred preferentially in the vascular tissues and in the root apex, whereas at 200 μ M of nitrate NR-mRNA was detectable in the whole root.

In the chicory cell suspensions nitrate reductase activity (NRA) reached a peak at the 3rd day of the culture and diminishes when the sucrose is exhausted. The enzymatic activities implied in the sucrose metabolism (invertase [INV], saccharose synthase [SS], and saccharose phosphate synthase [SPS]) show the same profile than the NRA.

Abscisic acid (10^{-4} M) inhibits cellular growth, INV-, SS-, and SPS-activity, but paradoxically enhances the NRA. This increase in NRA is not a result of a transcriptional regulation, but can probably be explained by an enhanced support of reducing power. We present evidence for a posttranslational regulation of both NR and SPS by a mode of phosphorylation and dephosphorylation.

Key words: Nitrate reductase - *Cichorium intybus* - *in situ* - cDNA - genomic - ABA - nitrate - SPS - root

