

USTL

Laboratoire de Physiologie de la Différenciation et Biotechnologies Végétales
Equipe de Physiologie et Génétique Moléculaire Végétales

N° d'ordre : 2492

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1
Discipline : **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

présentée par

Nathalie DRUART



La mise en place de la tubérisation chez la chicorée
(*Cichorium intybus* L.)
- Evolution des métabolismes azoté et carboné -

Directeur de Thèse : S. RAMBOUR

Soutenue le 02 février 1999 devant le jury composé de :

M. S. RAMBOUR	Professeur	USTL Lille	Président
M. A. VAN LAERE	Professeur	KU Louvain	Rapporteur
M. A. LIMAMI	Chargé de Recherche	INRA Versailles	Rapporteur
M. Y. LEMOINE	Professeur	USTL Lille	Examinateur
M. J.F. LEDENT	Professeur	UCL Louvain	Examinateur

AVANT-PROPOS

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au Laboratoire des Sciences et Technologies de Lille sous la direction de Monsieur le Professeur S. Rambour. Je lui suis infiniment reconnaissante de m'avoir accueillie dans son équipe pour me permettre de réaliser ce projet de recherche.

Je suis reconnaissant à Monsieur le Professeur A. Van Laere d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse ainsi que pour m'avoir permis de réaliser une partie de mes travaux, concernant le métabolisme carboné, dans son laboratoire de Biologie du Développement de l'Université Catholique de Louvain. Je remercie tout particulièrement Joke et Wim qui y ont consacré beaucoup de temps.

Je tiens à remercier Monsieur A. Limami, chargé de recherches au laboratoire du Métabolisme et de la Nutrition des Plantes de l'INRA de Versailles, d'avoir accepté de rédiger le rapport de cette thèse. C'est l'occasion pour moi de remercier J-P. Boutin qui a réalisé les dosages d'acides aminés au sein de ce même laboratoire. Je remercie également Messieurs les Professeurs Y. Lemoine et J-F. Ledent qui ont accepté d'être examinateurs de ma thèse.

Je suis reconnaissante à Mlle P. Goupil qui m'a appris le b. a. ba. de la recherche lors de mon DEA et qui m'a encadrée et aidée lors de ma thèse.

Je suis très reconnaissante à Eric Dewaele pour son travail de lecture et de correction apporté à ce mémoire.

Je joins à ces remerciements le personnel du laboratoire de Physiologie Végétale de Lille qui m'a soutenue tout au long de ce parcours du combattant avec sa bonne humeur et sa disponibilité de tous les instants.

Enfin, je souhaite vivement remercier mes parents sans qui je ne serais jamais devenue ce que je suis aujourd'hui, Arnaud et Céline pour les fous rires déstressants (vive la famille).

Je félicite Vivian qui a eu la lourde tâche de me supporter durant cette dernière année de thèse et dans les derniers moments de préparation et ce, sans jamais se plaindre. Mon stress et mes sautes d'humeur n'ont jamais eu raison de sa patience d'ange et de son amour. Les moments difficiles nous ont rapprochés et comme il me l'a toujours dit "tout ce qui ne nous tue pas nous rend plus fort".

Le soutien apporté par ma famille, en ce 02 février 1999, m'a permis de lutter jusqu'au bout et de réussir dans ma quête du Graal : obtenir le titre de Docteur.

Pour ces diverses raisons, je leur dédie donc cette thèse.

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
ANR	Activité nitrate réductase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine-tétraacétate de sodium
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FFT	Fructosane:fructosane fructosyltransférase
F _m	Fluorescence maximale
FMN	Flavine mononucléotide
FMNH ₂	Flavine mononucléotide réduite
F _v	Fluorescence variable
GOGAT	Glutamate synthétase
GS	Glutamine synthase
GUS	Glucuronidase
HEPES	Acide N-2 hydroéthylpipérazine-n'-éthane sulfonique
HPLC	High pressure liquid chromatography
kb	Kilo paire de bases
kDa	Kilo dalton
km	Constante d'affinité
MF	Matière fraîche
MOPS	Morpholino optane sulfonic acid
MS	Matière sèche
NADH	Nicotinamide adénine réduite
NADPH	Nicotinamide adénine phosphate réduite

NIP	Nitrate réductase inhibitor protein
NiR	Nitrite réductase
NR	Nitrate réductase
NR-P	Nitrate réductase phosphorylée
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phényl-méthyl-sulfonyl-fluorure
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SDS	Sodium dodecyl-sulfate
SSC	Tri-sodium citrate
SST	Saccharose:saccharose fructosyltransférase
TAE	Tris-acide acétique-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)amino méthane
TRITON	p-isocétylpolyoxyéthylène phénol (polymère)
UDP	Uridine 5' diphosphate
v/v	Volume pour volume

SOMMAIRE

Avant propos	2
Abréviations	3
Sommaire	5
Introduction	9
Analyse bibliographique.	
I-La chicorée	12
1- Culture.....	12
2-Importance économique.....	13
II- Assimilation de l'azote chez les plantes	13
1-Sources et cycle de l'azote.....	13
2-Prélèvement et transport du nitrate.....	14
2.1- Absorption du nitrate et systèmes de transport	
2.2- Coût de l'absorption du nitrate	
2.3- Transport du nitrate dans la plante	
3- L'assimilation du nitrate.....	17
3.1- Distribution de l'assimilation azotée	
3.2- La nitrate et la nitrite réductases	
3.2.1- La nitrate réductase	
3.2.2- La nitrite réductase	
4- Régulation de la nitrate réductase.....	19
4.1- Le nitrate	
4.2- La lumière et les glucides	
4.3- Le pouvoir réducteur	
4.4- Les métabolites azotés	
4.4- Les phytohormones	
5- La chicorée et la nitrate réductase.....	25
5.1- Le gène	
5.2- L'induction par le nitrate	
5.3- La régulation par les phytohormones	
5.4- Distribution de la nitrate réductase	
III- L'assimilation du saccharose chez les plantes	28

1- Synthèse du saccharose.....	28
2- L'assimilation du saccharose.....	29
2.1-L'invertase	
2.2- La saccharose synthase	
2.3- Les fructosanes	
2.3.1- Structure	
2.3.2- Rôle physiologique	
2.3.3- La synthèse des fructosanes	
2.3.3.1- Les Asteracées	
2.3.3.2- Les monocotylédones	
3- Le transport du saccharose chez les plantes supérieures.....	36
3.1- Notions de sources et puits	
3.2- Le saccharose comme métabolite de transport	
3.2.1- Le chargement du phloème	
3.2.2- Le déchargement du phloème	
4- La régulation du métabolisme carboné.....	40
5- Le carbone et la chicorée.....	41
5.1- Les enzymes	
5.1.1- Les invertases	
5.1.2- La saccharose : saccharose fructosyl transférase	
5.1.3- La fructosane : fructosane fructosyltransférase	
5.2- Distribution temporelle et spatiale des enzymes carbonées	
IV- Coordination entre métabolisme azoté et carboné.....	43
1- Métabolisme azoté et respiration.....	44
2- Métabolisme azoté et photosynthèse.....	45
3- Métabolisme azoté et distribution carboné chez la chicorée.....	46
 Matériel et Méthodes	
I- Matériel Végétal.....	48
1- La plante.....	48
2.1- Culture sur perlite	
2.2- Culture <i>in vitro</i>	
3. Prélèvement.....	49

II- Analyses enzymologiques	49
1- La nitrate réductase.....	49
1.1- Mesure <i>in vivo</i>	
1. 2- Mesure <i>in vitro</i>	
2- L'invertase.....	50
3- La saccharose synthase.....	50
4- La saccharose:saccharose fructosyl transferase.....	51
5- La fructosane:fructosane fructosyl transférase.....	52
6- Dosage des protéines.....	53
III- Analyses biochimiques	53
1- Dosage du nitrate.....	53
2- Dosage des acides aminés.....	53
3- Dosage des glucides intratissulaires.....	53
4- Marquage <i>in situ</i> au ¹⁴ C saccharose.....	54
IV-Analyses moléculaires	54
1- Extraction et purification des ARN totaux.....	54
2- Séparation électrophorétique.....	55
3- Transfert par Northern blot.....	56
4- Marquage et purification des sondes.....	56
5- Hybridations moléculaires.....	56
V- Analyses photosynthétiques	57
VI- Analyses histologiques	58
1- Inclusion en résine JB4.....	58
2- Analyses histologiques.....	59
Résultats	
A- Etude de la mise en place de la tubérisation	60
I- La mise en place de la tubérisation de la chicorée	60
1- Etude morphologique.....	60
2- Etude de la croissance.....	61
3- Etude histologique.....	63
4- Conclusion.....	63
II- L'assimilation du nitrate chez la chicorée	64

1- Effet de la photopériode sur l'activité nitrate réductase.....	64
2- Evolution de l'activité nitrate réductase lors du développement	65
2.1- Activité nitrate réductase <i>in vivo</i>	
2.2. Activité nitrate réductase <i>in vitro</i>	
2.3- Teneur en nitrate	
3- Expression du gène <i>nia</i>	69
4- Evolution de la teneur en acides aminés.....	70
5- Conclusion.....	71
III- L'assimilation carbonée chez la chicorée en voie de tubérisation.....	72
1- L'assimilation du saccharose dans la plante.....	72
1.1- L'activité invertase acide	
1.2- L'activité invertase neutre	
1.3- L'activité saccharose synthase	
1.4- La saccharose:saccharose fructosyltransférase	
1.5- la fructosane:fructosane fructosyltransférase	
1.6- Conclusion	
2- Mécanisme de la régulation des activités métaboliques du saccharose.....	78
2.1- Expression de l'invertase acide	
2.2- Expression de la saccharose:saccharose fructosyltransférase	
3- Modification de la teneur en glucides.....	80
4- Transport du ¹⁴ C-saccharose dans la plante.....	81
5- Conclusion.....	82
B- Influence du saccharose sur la tubérisation.....	83
I- Influence du saccharose sur le développement de la chicorée.....	83
1- Effet du saccharose sur la croissance.....	83
1.1- Développement de la plante	
1.2- Développement de la racine	
2- Effet du saccharose sur la photosynthèse chez la chicorée.....	86
3- Conclusion.....	87
II- Influence du saccharose sur le métabolisme azoté.....	88
1- Répartition de l'activité nitrate réductase <i>in vitro</i> entre racines et feuilles.....	88
2- Evolution des teneurs en nitrate.....	89

3- Effet du saccharose sur la transcription du gène <i>nia</i>	91
4- Conclusion.....	92
III- Influence du saccharose sur le métabolisme carboné.....	93
1- Evolution des enzymes du catabolisme du saccharose.....	93
1.1- L'activité invertase acide	
1.2- L'activité invertase neutre	
1.3- L'activité saccharose synthase	
1.4- L'activité saccharose:saccharose fructosyltransférase	
1.5- Conclusion	
2- Mécanisme de la régulation des enzymes du métabolisme du saccharose.....	98
2.1- Expression de l'invertase acide	
2.2- Expression de la saccharose:saccharose fructosyltransférase	
3- Analyse de la teneur en glucides intratissulaires.....	100
4- Conclusion.....	101
IV- Modifications histologiques induites par le saccharose.....	101
1- Etude histologique.....	102
2- Conclusion.....	102
Discussion.....	103
Conclusions-Perspectives.....	119
Références bibliographiques.....	123
Résumé.....	150
Abstract.....	151

INTRODUCTION

Le laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire Végétales de Lille étudie la différenciation rhizogène. Les recherches menées dans ce domaine visent à comprendre les mécanismes qui régissent la différenciation des cellules racinaires menant à la genèse des racines latérales ainsi que ceux impliqués dans la mise en place de la croissance radiale. La maîtrise de la différenciation organogène de l'espèce et la production d'une racine tubérisée font de la chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* L.) un modèle expérimental de choix pour cette étude. Durant la première année de culture de cette plante bisannuelle, la racine présente, d'abord, une phase de croissance en longueur puis apparaît une phase de croissance en épaisseur.

Des changements métaboliques importants sont associés à cette modification de l'axe de croissance. En effet, au cours de la tubérisation, la racine organe-source acquiert la fonction d'organe-puits et devient ainsi le siège principal de l'accumulation des réserves azotées sous forme de protéines et d'acides aminés (Limami et al., 1993) et carbonées sous forme de fructosanes (Fiala et Jolivet, 1984).

L'analyse de la voie d'assimilation de l'azote au cours de la différenciation et du développement racinaire a été une des principales préoccupations des chercheurs du laboratoire ces dernières années. Il est bien établi que, chez cette herbacée, la localisation de l'activité nitrate réductase, première enzyme de la voie d'assimilation de l'azote catalysant la réduction du nitrate en nitrite, dépend de la différenciation rhizogène. L'activité nitrate réductase est principalement située dans la racine des jeunes plantules alors que durant la tubérisation, elle est essentiellement observée dans les parties foliaires (Dorchies et Rambour, 1985). Ces auteurs ont également démontré que si la racine tubérisée ne présente plus d'activité nitrate réductase, les racines latérales formées au cours du forçage ou même induites *in vitro* sur des explants racinaires tubérisés contiennent une importante activité nitrate réductase.

Pendant la tubérisation, la racine accumule des polymères de fructose telle que l'inuline qui est stockée dans les vacuoles. La formation du premier maillon, l'isokestose, est catalysée par la saccharose:saccharose fructosyltransférase à partir de deux molécules de saccharose. Le saccharose, forme glucidique circulante dans la plante, est produit par le métabolisme de la photosynthèse. Le métabolisme du saccharose va donc jouer un rôle très important durant le développement de la plante. En effet, il est à l'origine de la production du pouvoir réducteur nécessaire aux diverses activités métaboliques de la plante et, au cours de la tubérisation, il

représente le substrat des enzymes de synthèse de l'inuline aboutissant à l'accumulation des fructosanes.

Ainsi, si la réduction du nitrate exige la présence de saccharose qui va générer du pouvoir réducteur (NAD(P)H) et des squelettes carbonés, la synthèse d'inuline, via la saccharose:saccharose fructosyltransférase, est aussi fortement consommatrice de saccharose. L'assimilation du nitrate est donc étroitement dépendante du métabolisme carboné. De ce fait, lors de la mise en place de la tubérisation, l'assimilation azotée et l'assimilation carbonée entreraient en compétition dans la racine.

La mise en place de la tubérisation chez la chicorée est un phénomène complexe impliquant des réorientations métaboliques importantes. L'objectif premier de notre travail était de déterminer les modifications engendrées au niveau du métabolisme azoté et du métabolisme carboné lors de ce changement morphologique. La mise en évidence de facteurs régissant la réorientation de la croissance racinaire a constitué une priorité dans notre recherche. Nous avons ainsi montré que l'évolution d'enzymes du métabolisme du saccharose et plus particulièrement de la saccharose:saccharose fructosyltransférase était un marqueur potentiel lié à l'origine de la mise en place de la tubérisation.

La disponibilité du saccharose semblant être à la source des modifications morphologiques et physiologiques, nous avons voulu vérifier, dans un second temps, si un apport exogène important de cette molécule dans le milieu de culture pouvait influencer la régulation des voies d'assimilation du nitrate et du saccharose, et de ce fait agir sur le développement racinaire de la chicorée soit par la vitesse de mise en place de la tubérisation, soit par l'importance de cette tubérisation.

**ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE**

I- La chicorée

1-Culture

La chicorée est une plante herbacée de la famille des Asteracées qui se développe dans les régions à climat tempéré. La chicorée sauvage est une plante vivace (Sechley *et al.*, 1991) qui croît le long des routes et des chemins. Connue depuis environ 6000 ans, elle était appréciée des plus grands médecins et botanistes grecs pour ses propriétés thérapeutiques (ventre, foie, rein). Elle répond aux jolis noms d'héliotrope, barbe de capucin ou encore fiancée du soleil car ses fleurs s'ouvrent à l'apparition du soleil. Tout comme le salsifis, le pissenlit et la laitue, elle secrète un suc laiteux amer et tonique contenant la lactucine et la lactucopicrinine. La chicorée en Europe est représentée par trois espèces *Cichorium spinosum* L., *Cichorium endivia* L., *Cichorium intybus*. Si la première espèce est peu cultivée, les deux autres sont particulièrement intéressantes pour leurs caractères agronomiques. *C. endivia* L., plante typiquement annuelle, est sélectionnée pour la consommation des feuilles en salade (scarole ou chicorée frisée). *C. intybus*, quant à elle, pousse sous toutes les formes, annuelles, bisannuelles ou vivace. Elle se sépare en 2 sous-espèces cultivées en tant que bisannuelles: la variété *foliosum* (chicorée à feuilles) qui produit l'endive et la variété *sativum* (chicorée industrielle ou à racine) chez laquelle la racine est utilisée pour la torréfaction.

La culture bisannuelle de la chicorée Witloof (*Cichorium intybus* L. var *foliosum*) aussi appelée chicorée de Bruxelles est une déviation du cycle naturel. Semée en avril-mai, dès la première année, la plante développe une rosette de feuilles puis une racine pivotante tubérisée (septembre-octobre). Durant cette période de croissance végétative, la racine accumule des réserves azotées (40% de protéines et 60% d'acides aminés) et carbonées (Limami *et al.*, 1993). Elle peut notamment contenir jusqu'à 20% d'hydrates de carbone essentiellement constitués d'inuline représentant 80% de la matière sèche racinaire (Fiala et Jolivet, 1984; Fruleux, 1993). Pendant la deuxième année, après vernalisation et exposition des plants aux jours longs (photopériode d'au moins 16 heures), les réserves azotées et carbonées racinaires sont remobilisées au printemps pour la formation du bouquet foliaire et de la hampe florale. L'appareil reproducteur présente une allogamie stricte et la pollinisation est de type entomophile (Limami et Laville, 1991).

Le cycle naturel peut être interrompu en fin de phase végétative; les feuilles composant la rosette sont coupées et les racines sont récoltées. Celles-ci sont conservées à 0°C durant deux semaines pour provoquer la vernalisation puis soumises au forçage en les plaçant dans des conditions de cultures hydroponiques (18°C, obscurité, hygrométrie forte). Cette méthode permet, après 18 jours, de produire, à partir du bourgeon central de la rosette, un bourgeon étiolé de seconde génération : l'endive

2-Importance économique

La culture de la chicorée est essentiellement localisée en Europe. Cette plante est d'abord cultivée en Hollande jusqu'au milieu du XVIII^{ème} siècle pour la production de racines torréfiées. Les industries de torréfaction apparaissent vers 1750 dans le Nord de la France. La production d'endives a débuté, quant à elle, en Belgique vers 1850 et s'est surtout développée en France après 1918. L'apparition de la technique du forçage de la racine en culture hors-sol, en 1976, a nettement amélioré les rendements : 15 tonnes de chicons par hectare au lieu de 10 tonnes en culture traditionnelle. De nos jours la chicorée de Bruxelles est cultivée principalement en France (14 500 ha dont 12 000 ha dans le Nord de la France), en Belgique (8 000 ha) et aux Pays-Bas (4 000 ha).

En terme de production, la France récolte, en 1995, 233 000 tonnes d'endives dont 68 000 dans le Pas de Calais, 55 000 dans le Nord, 46 300 dans la Somme, 21 000 dans le Finistère et 15 400 dans l'Aisne.

En terme de consommation française, la région Nord-Picardie et l'Île de France détiennent le monopole avec 200 000 tonnes consommées par an soit 3,6 kg/hab/an.

II- Assimilation de l'azote chez les plantes

1-Sources et cycle de l'azote

Comme de nombreuses plantes, la chicorée est incapable de fixer l'azote de l'air et ne pratique pas de symbioses avec les bactéries fixatrices d'azote moléculaire.

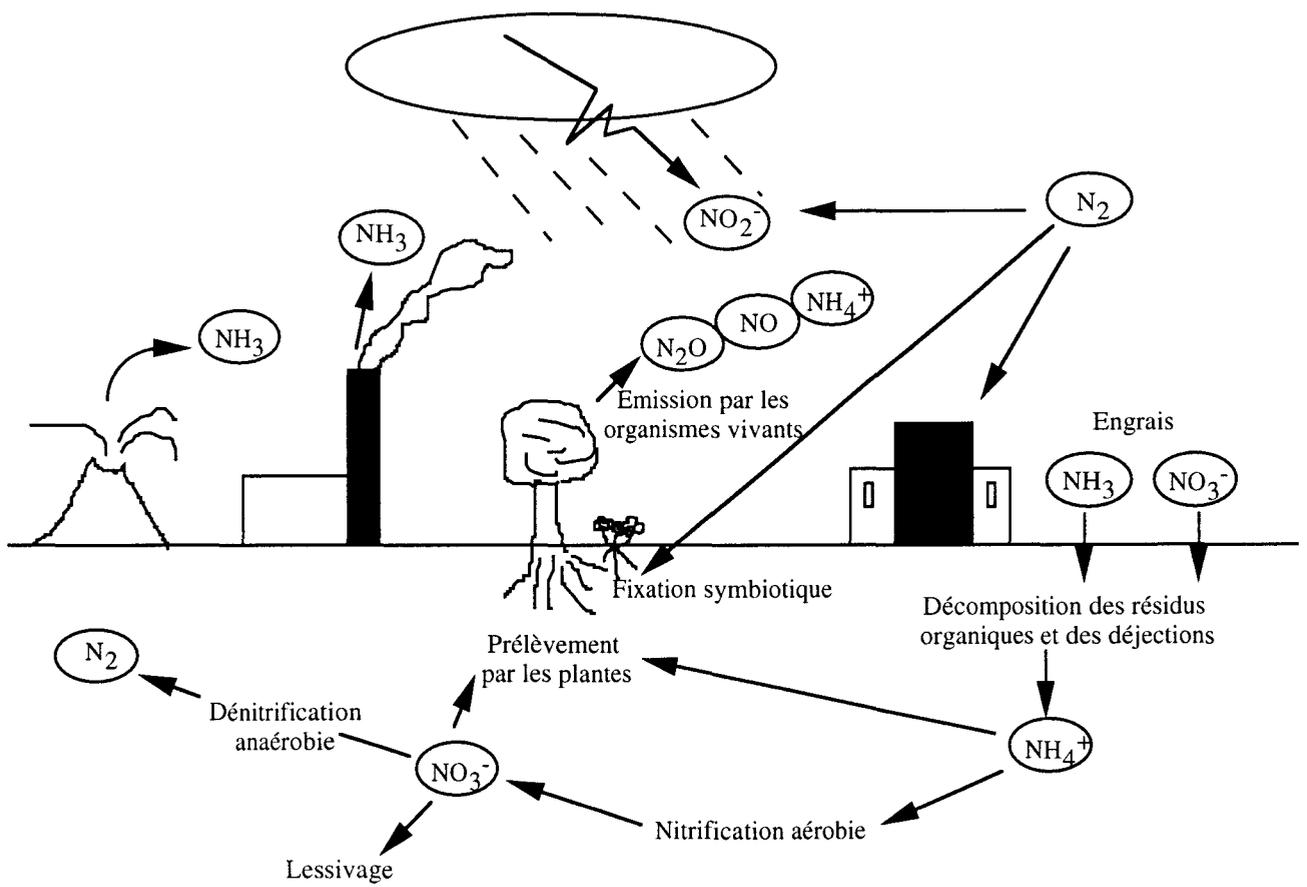


Figure 1 : Le cycle de l'azote d'après Morot-Gaudry (1997)

Le sol représente sa seule source d'azote. L'azote organique du sol est le troisième réservoir d'azote de la planète après celui de l'atmosphère et des océans (tableau 1).

Atmosphère	$3,9.10^{15}$
Océans (natures diverses)	$2,4.10^{13}$
Sol (non vivant)	$1,5.10^{11}$
Plantes	$1,5.10^{10}$
Micro-organismes du sol	$6,010^9$
Animaux	$2,0.10^8$
Humains	$1,0.10^7$

Tableau 1 : Distribution de l'azote en tonnes selon Jenkinson (1990)

Dans le sol, l'azote minéral peut être présent sous trois formes: l'ion ammonium (NH_4^+) ou azote ammoniacal, l'ion nitrite (NO_2^-) ou azote nitreux et l'ion nitrate (NO_3^-) ou azote nitrique.

Une faible partie de l'azote du sol provient de l'azote atmosphérique entraîné par les précipitations. Une autre partie, beaucoup plus importante, provient de la fixation biologique de l'azote atmosphérique par les micro-organismes. L'azote assimilé par les organismes vivants est restitué au sol après décomposition de la matière organique végétale et animale par les bactéries, champignons et protozoaires. La transformation par les micro-organismes de l'azote organique du sol en formes azotées minérales est appelée la minéralisation. L'ammonium libéré subit ensuite le phénomène de nitrification par l'intermédiaire des bactéries *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* amenant à la production de nitrate.

La transformation de l'azote en l'une ou l'autre de ces formes constitue un système complexe entre le sol et l'atmosphère appelé le « cycle de l'azote » (figure 1).

2-Prélèvement et transport du nitrate

2.1- Absorption du nitrate et systèmes de transport

Les concentrations en nitrate exogène pouvant fortement varier, les plantes doivent être capables de s'adapter à un tel environnement. A cette fin, celles-ci ont développé un système d'absorption du nitrate de type multiphasique.

Selon leur affinité pour le nitrate, nous distinguons plusieurs systèmes de transport (pour revue Crawford, 1995). Des études réalisées chez l'orge par Siddiqi *et al.* (1990) montrent que l'absorption s'effectue par l'intermédiaire d'un système non saturable à basse concentration (forte affinité) et un système non saturable à forte concentration (faible affinité).

Le système à forte affinité se déclenche à des concentrations externes faibles de l'ordre de 0,2 à 0,3 mmol.l⁻¹, l'absorption est alors inductible par le nitrate et thermodynamiquement active. Le système à faible affinité est constitutif et, de ce fait, n'est pas stimulé par la présence de nitrate (Hole *et al.*, 1990; Glass *et al.*, 1992). Il prend effet entre 1 et 50 mmol.l⁻¹ de nitrate. Ce type de transport pourrait avoir lieu via un transport passif à travers des canaux spécifiques du NO₃⁻ selon un gradient de nitrate (Glass *et al.*, 1990; Siddiqi *et al.*, 1990; 1991). Des travaux réalisés chez *Hordeum vulgare* (Aslam *et al.*, 1992) révèlent la présence de trois classes de transporteurs. Un transporteur agit en présence de fortes concentrations alors que les deux autres semblent opérer à faible concentration.

Les deux systèmes d'absorption sont sujets au rétrocontrôle négatif après une exposition prolongée au nitrate (Siddiqi, 1990; King *et al.*, 1993).

Les approches de génétique moléculaire ont permis de caractériser les gènes des transporteurs de nitrate chez les algues, les champignons et les plantes supérieures.

L'identification des gènes de transporteur de faible affinité a débuté chez *Arabidopsis thaliana*. Ces études montrent que le gène code pour une protéine membranaire possédant douze segments transmembranaires (Tsay *et al.*, 1993). L'ARNm CHL₁, codant pour ce transporteur, est principalement trouvé dans les racines et son taux de transcription augmente en présence de nitrate ou à pH acide.

Les gènes de transporteur à forte affinité ont été isolés chez *Aspergillus* (pour revue Crawford, 1995) et chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Quesada *et al.*, 1994). Les produits de transcription sont également des protéines transmembranaires de dix à douze segments transmembranaires. Le fait que les séquences de ces gènes d'absorption soient conservées entre les champignons et les algues, suggèrerait que les plantes supérieures possèdent ce type de gène. Récemment, un tel gène a été cloné chez l'orge (Trueman *et al.*, 1994). L'ADNc code pour une protéine de 55 kDa présentant respectivement 32% et 50% d'homologie avec les

transporteurs d'*Aspergillus* et *Chlamydomonas*. Ces transporteurs ont été aussi caractérisés chez *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana plumbaginifolia* (Tsay *et al.*, 1993; Filleur et Daniel-Vedele, 1998; Fraissier *et al.*, 1998).

2.2- Coût de l'absorption du nitrate

L'assimilation du nitrate est un des processus requérant le plus d'énergie. Des analyses de la respiration racinaire montrent que l'absorption du nitrate consomme en énergie 1 à 3 molécules d'ATP par mole de nitrate c'est-à-dire environ 10 à 20% du coût total de l'assimilation du nitrate dans ces organes (Bloom *et al.*, 1992). Chez l'orge, la comparaison entre des plantes mutantes et de type sauvage permet d'estimer que 23% de la respiration racinaire sert à assimiler le nitrate dont 5% sont alloués à l'absorption (Grignon *et al.*, 1997).

Dans les deux systèmes de transport existant, l'absorption du nitrate serait réalisée par un symport H^+/NO_3^- . Des mesures effectuées chez le maïs et l'orge confirment ce modèle de symport protonique (Mc Clure *et al.*, 1990). En fait, le transport du nitrate a lieu contre un gradient de potentiel électrochimique (-100 mV à -250 mV) selon une stoechiométrie probable de type (2 ou plusieurs) H^+ pour une molécule de NO_3^- provoquant une dépolarisation rapide (1 à 2 minutes après l'exposition au nitrate) et transitoire du plasmalemmes racinaire (Mc Clure, 1990; Glass *et al.*, 1992). Ce mode d'absorption entraîne alors une alcalinisation du milieu extérieur due à un relargage du bicarbonate (HCO_3^-) produisant des ions OH^- ainsi que la mise en oeuvre d'une régulation du pH intracellulaire (Marschner *et al.*, 1986).

2.3- Transport du nitrate dans la plante

Après absorption par les racines, le nitrate peut être assimilé dans la racine elle-même, transporté vers les parties aériennes, ou stocké dans les vacuoles des cellules racinaires ou foliaires. Près de 95% du nitrate est stocké dans les vacuoles des cellules racinaires et participent à la régulation osmotique (pour revue Crawford, 1995). Cette réserve vacuolaire est libérée dans le pool métabolique du cytoplasme pour l'assimilation quand les sources externes du nitrate sont limitantes (King *et al.*, 1992).

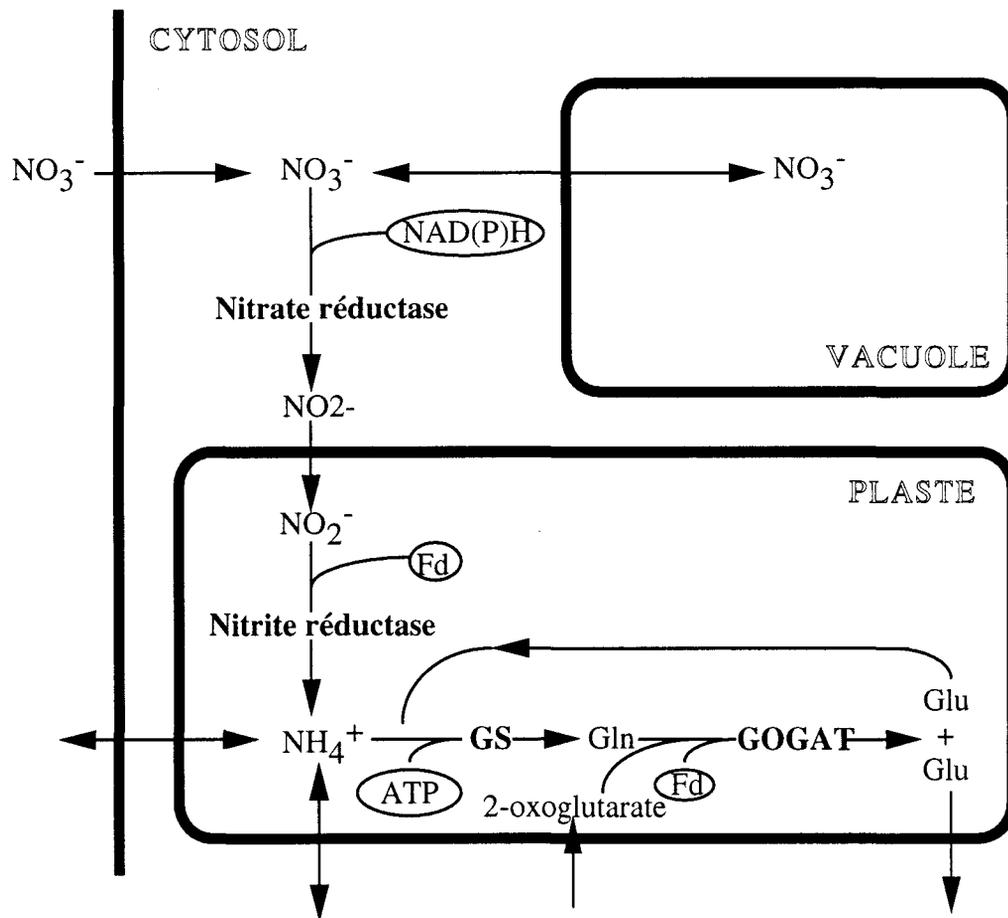


Figure 2 : Voie d'assimilation du nitrate chez les plantes supérieures selon Rouzé et Caboche (1991)

Absorbé par les racines, le nitrate peut être décelé dans les parties aériennes de plants de *Zea mays* très rapidement (2 minutes) (Mc Naughton et Presland, 1983), le transport de l'azote vers les parties aériennes s'effectuant surtout dans les vaisseaux du xylème.

La conduction du nitrate se fait par diffusion le long d'un gradient radial de concentration dans le symplasma, via les plasmodesmes, jusqu'au parenchyme du xylème. Le transport du nitrate à travers le tonoplaste et la vacuole semble s'effectuer par un symport H^+/NO_3^- pour le déchargement vacuolaire et un uniport NO_3^- pour le chargement vacuolaire. L'ATPase ou la PPi-phosphatase membranaire tonoplastique sécréterait des protons dans la vacuole ce qui engendrerait un gradient électrique suffisant pour y conduire le nitrate. Celui-ci pourrait ensuite quitter ce compartiment cellulaire en réponse au gradient de proton, via le symport H^+/NO_3^- (Glass et Siddiqi, 1995). La sécrétion du nitrate dans les vaisseaux du xylème, quant à elle, est due à des transporteurs du plasmalemma des cellules de la stèle qui expulsent le nitrate dans l'apoplasme. Le système de sécrétion semble utiliser le potentiel membranaire (face cytoplasmique négative) pour entraîner passivement le nitrate hors de la cellule et l'accumuler irréversiblement dans la sève (Touraine et Grignon, 1982).

Les proportions relatives de nitrate et d'azote organique transportés dépendent de la réduction du nitrate ayant lieu dans les racines et varient selon les espèces (Pate, 1972). Des espèces comme le lupin, le radis et le pois qui possèdent des nitrate réductases racinaires actives présentent des concentrations importantes d'azote organique dans les racines alors que d'autres espèces comme *Xanthium*, dans lesquelles la nitrate réductase racinaire n'est pas décelable, montrent des taux importants de nitrate dans les feuilles.

3- L'assimilation du nitrate

Le nitrate est assimilé par une série d'étapes impliquant plusieurs enzymes : la nitrate réductase, la nitrite réductase, la glutamine synthétase et la glutamate synthétase aboutissant à la formation des acides aminés (figure 2).

3.1- Distribution de l'assimilation azotée

Selon les espèces, la réduction du nitrate peut être réalisée dans la racine mais aussi dans les feuilles. Ainsi, chez les plantes herbacées, l'assimilation du nitrate a principalement lieu dans les feuilles, ce qui n'est pas le cas chez les légumineuses de climat tempéré comme

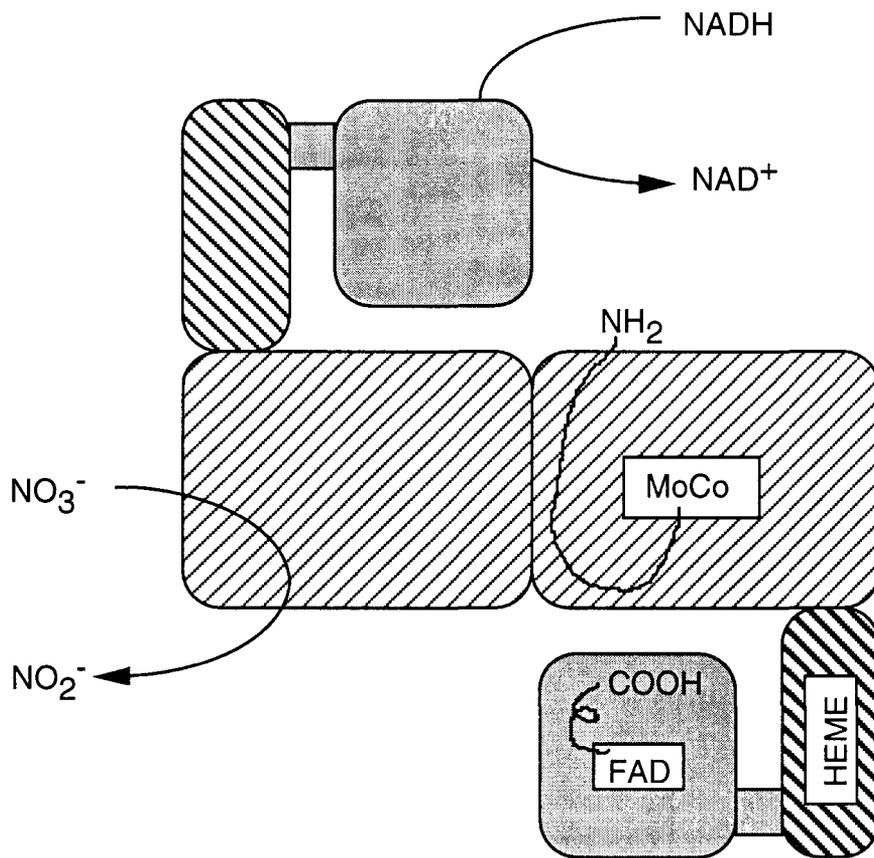


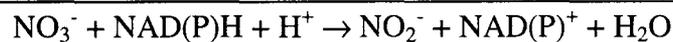
Figure 3 : Modèle structural de la nitrate réductase d'après Caboche et Rouzé (1990)

Pisum sativum et les espèces pérennes tempérées dans lesquelles l'activité de réduction a souvent été observée dans les racines (Andrews, 1984; pour revue Gojon *et al.*, 1994).

3.2- La nitrate et la nitrite réductases

3.2.1- La nitrate réductase

La nitrate réductase (NR) est la première enzyme impliquée dans l'assimilation des nitrates chez les végétaux. C'est une enzyme soluble, présente dans le cytoplasme (Beevers et Hageman, 1969), toutefois, une forme associée au plasmalemme a été identifiée dans la racine de maïs, d'orge et dans des suspensions cellulaires issues de racines de carotte (Barr *et al.*, 1995; de Marco *et al.*, 1994; Meyerhoff *et al.*, 1994). Cette enzyme catalyse la réduction du nitrate en nitrite par le transfert de deux électrons du NADH ou du NADPH au nitrate.



Selon la nature du donneur d'électrons, trois formes de nitrate réductase peuvent être distinguées. La forme la plus commune de nitrate réductase, rencontrée chez les plantes supérieures et les algues, présente une spécificité pour le NADH, la NADH : NR (EC 1.6.6.1). Il existe cependant deux autres isoformes, une isoforme bispécifique NAD(P)H : NR (EC 1.6.6.2) présente chez les algues (Redinbaugh et Campbell, 1991) mais aussi chez plusieurs plantes comme l'orge, le maïs et le riz en tant que seconde isoforme racinaire (Rouzé et Caboche 1992) et, une isoforme spécifique du NADPH, NADPH : NR (EC 1.6.6.3) qui est trouvée uniquement chez les champignons et les algues (Rouzé et Caboche, 1991).

La nitrate réductase est définie comme une enzyme homodimérique dont chaque monomère, de masse moléculaire de 100 à 110 kDa, contient trois domaines d'oxydo-réduction fonctionnels (figure 3). Séparés par trois régions charnières, ces domaines sont associés à des groupements prosthétiques : la flavine adénine dinucléotide (FAD) dans la région C-terminale, l'hème (de type cytochrome b557) et le cofacteur à molybdène (Mo-co) dans la région N-terminale, selon une stoechiométrie de 1 : 1 : 1 (Campbell *et al.*, 1990). Ceux-ci permettent le transfert des deux électrons provenant du NAD(P)H vers le nitrate (Solomonson et Barber, 1990).

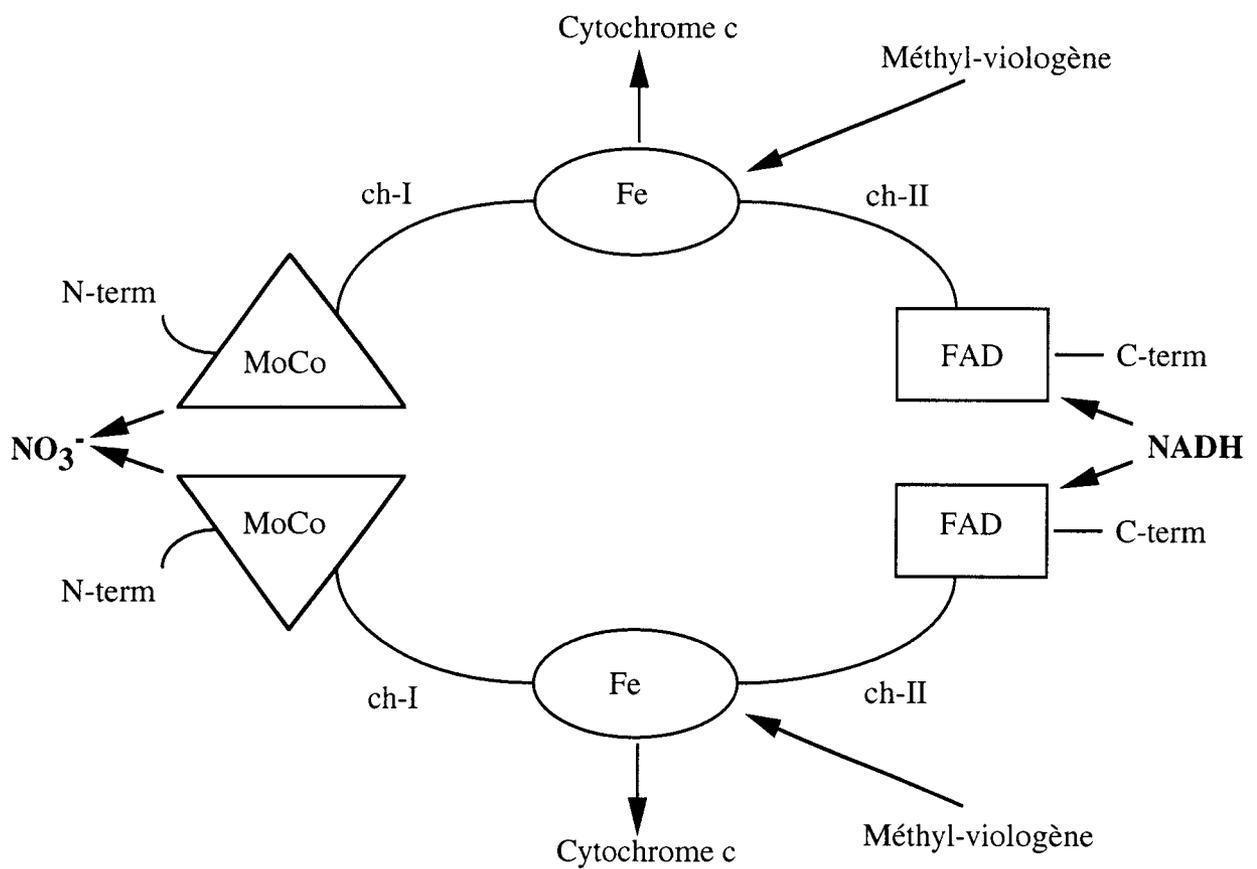
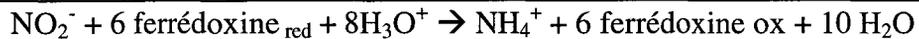


Figure 4 : Représentation des activités partielles associées d'après Sa et al. (1996)

In vitro, les électrons peuvent être issus d'autres donneurs que le NADH ou être acceptés par d'autres receveurs que le nitrate. Ces transferts d'électrons ne mettent en jeu qu'une partie des groupements prosthétiques et donnent lieu à des activités partielles de la nitrate réductase (figure 4). Ces activités sont de deux types : les activités diaphorases (ou déshydrogénases) consistant en la réduction par le NADH, via la nitrate réductase, d'accepteurs artificiels d'électrons comme le ferricyanure, le dichlorophénolindophénol ou le cytochrome c, et les activités dites terminales où un donneur artificiel comme le FMNH₂, le méthylviologène ou le bleu de bromophénol sert de réducteur pour la réduction du nitrate (pour revue Hoff *et al.*, 1994).

3.2.2- La nitrite réductase

La nitrite réductase (NiR : EC 1.7.7.1) est habituellement considérée comme une enzyme chloroplastique ou, dans les tissus non photosynthétiques, comme une enzyme plastidique (Kleinhofs et Warner, 1990; Wray *et al.*, 1993). Elle catalyse la réduction du nitrite en ammonium par l'apport de six électrons :



C'est une enzyme monomérique d'une masse moléculaire de 60-64 kDa. La ferrédoxine réduite est le donneur d'électrons dans les tissus chlorophylliens alors que pour les racines, une protéine sans fer hémique mais de type ferrédoxine est certainement utilisée (Suzuki *et al.*, 1985). Cette protéine obtiendrait son pouvoir réducteur du NADPH généré par le cycle des pentoses phosphate (Bowsher *et al.*, 1989).

4- Régulation de la nitrate réductase

L'assimilation du nitrate est un processus fortement régulé. L'isolement de clones génomiques ou d'ADNc codant pour la nitrate réductase (pour revue Crawford et Arst, 1993; Hoff *et al.*, 1992) mais aussi de transporteurs de nitrate (Tsay *et al.*, 1993) a permis de progresser dans les analyses moléculaires et physiologiques de la régulation de cette voie métabolique (MacKintosh, 1998).

4.1- Le nitrate

L'induction de l'activité nitrate réductase par le nitrate a été décrite pour la première fois en 1960 par Hageman et Flesher chez le maïs (pour revue Kleinhofs et Warner 1990). Depuis, cette induction a été observée chez de nombreuses espèces végétales (Li et Oaks, 1993). Celle-ci est due à une augmentation des quantités d'ARNm donc à une induction des gènes *nia* codant pour la nitrate réductase (pour revue Hoff *et al.*, 1992, 1994). Chez l'orge carencée en azote, l'addition de nitrate induit une absorption rapide de celui-ci ainsi que sa réduction par augmentation du taux de transcrits nitrate réductase prouvant la présence d'un système de reconnaissance très sensible (Öhlen *et al.*, 1995). Des prétraitements de plantules de maïs avec ou sans cycloheximide montrent que cet inhibiteur de la synthèse protéique n'empêche pas l'induction par le nitrate de la transcription des ARNm du gène *nia* codant pour la nitrate réductase (Gowri *et al.*, 1992). Ces données suggèrent que le système de transduction du signal est exprimé constitutivement, au niveau transcriptionnel, dans les tissus du maïs. Par ailleurs, un mutant déficient NR de *Nicotiana plumbaginifolia* a été transformé avec un gène chimérique nitrate réductase composé de l'ADNc et des signaux de terminaison du gène nitrate réductase de tabac placé sous le contrôle du promoteur 35S CaMV. Les plantes transgéniques obtenues montrent que la régulation de l'expression du gène nitrate réductase par le nitrate est d'ordre transcriptionnel (Vincentz et Caboche, 1991).

Inversement, Galangau *et al.* (1988) montrent que des plants de tomate cultivés sans nitrate pendant huit jours présentent une chute à 3 et 10% des valeurs initiales des activités nitrate réductase ainsi que des protéines. Par contre, la quantité d'ARNm *nia* est maintenue constante. Ces résultats suggèrent, dans ce cas, un contrôle possible de la synthèse de la protéine nitrate réductase à un niveau traductionnel ou post-traductionnel en absence de nitrate.

4.2- La lumière et les glucides

La lumière est un facteur environnemental nécessaire à l'expression de la nitrate réductase (pour revue Lillo, 1994; Hoff *et al.*, 1994). La synthèse des ARNm *nia* des plants, étiolés ou cultivés à l'obscurité, d'épinard, de maïs ou de tomate est induite lorsque ceux-ci sont transférés à la lumière (Gowri *et al.*, 1989; Mohr *et al.*, 1992; Migge *et al.*, 1997).

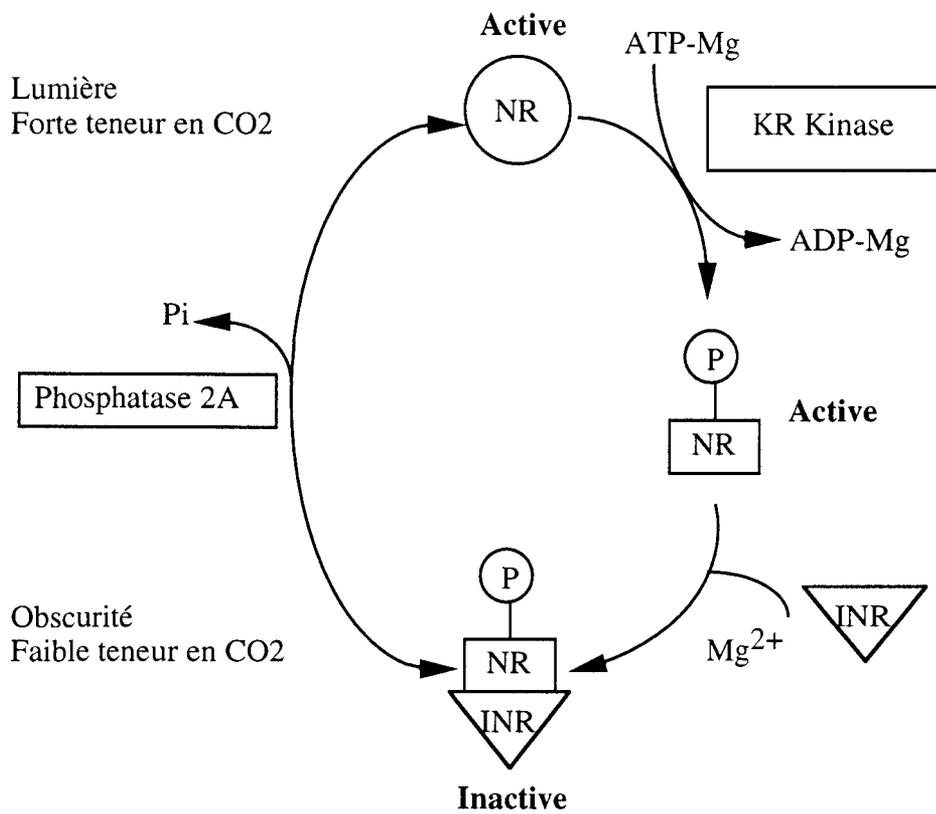


Figure 5 : Modèle de contrôle réversible de l'activité NR par phosphorylation d'après MacKintosh et al. (1995) (INR : inhibiteur de la nitrate réductase)

La présence, dans les feuilles, d'au moins deux réponses différentes a été clairement démontrée par Melzer *et al.* (1989). En effet, la réponse à la lumière de feuilles étiolées d'orge est phytochrome-dépendante (activation de l'accumulation des ARNm *nia* en lumière rouge et bleue) alors que la réponse observée pour les feuilles vertes placées à l'obscurité pendant 48 heures ne l'est pas (aucune réponse en présence de lumière rouge, rouge lointain ou bleue). Le contrôle de la synthèse de la nitrate réductase via la lumière serait donc dépendant des activités photosynthétiques (pour revue Lillo, 1994).

L'implication de l'activité photosynthétique dans le contrôle de l'induction de la nitrate réductase foliaire a été démontrée par la capacité de fortes teneurs en saccharose à mimer l'effet de la lumière et plus particulièrement à augmenter l'activité transcriptionnelle de la nitrate réductase (Vincentz *et al.*, 1993; pour revue Sivasankar et Oaks, 1996). Des expériences réalisées sur des tabacs transgéniques exprimant soit un ADNc nitrate réductase contrôlé par le promoteur 35S CaMV ou soit une fusion entre le gène *nia 1* de tabac avec le gène GUS permettent de conclure que le contrôle des métabolites carbonés sur la nitrate réductase est d'ordre transcriptionnel (Vincentz *et al.*, 1993).

Toutefois, la régulation par la lumière ne serait pas seulement transcriptionnelle. Dans les feuilles, une rapide désactivation de la nitrate réductase à l'obscurité est nécessaire pour empêcher l'accumulation des nitrites toxiques. Le transfert à l'obscurité des plantes transgéniques exprimant constitutivement le gène *nia* sous contrôle du promoteur 35S CaMV, entraîne une chute du taux de protéines et de l'activité nitrate réductase (Vincentz et Caboche, 1991). Ces dernières sont réinduites si l'on place à nouveau les plantes à la lumière suggérant un effet post-transcriptionnel. Celui-ci pourrait s'exercer à différents niveaux : modification de la traduction, dégradation des protéines ou phosphorylation de l'enzyme.

Différents auteurs montrent que le mécanisme de phosphorylation est actif chez *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana glauca* et *Zea mays* (Labrie et Crawford, 1994; Nussaume *et al.*, 1995; Merlo *et al.*, 1995).

La régulation de la nitrate réductase par des mécanismes réversibles de phosphorylation et de déphosphorylation a fait l'objet d'une étude plus détaillée (pour revue Kaiser et Huber, 1994; MacKintosh, 1998) (figure 5). A l'obscurité, l'enzyme subit une inactivation réversible dépendante du magnésium. Cette inactivation est liée à l'état de phosphorylation de l'enzyme. *In vitro*, l'addition de MgATP inactive celle-ci alors que l'addition d'AMP la réactive. La nitrate réductase est phosphorylée sur plusieurs résidus sérine. L'inactivation a lieu en deux temps, une kinase de 67 kDa phosphoryle la nitrate réductase qui serait toujours active, puis

un facteur protéique de 100 kDa (NIP) reconnaît la nitrate réductase phosphorylée pour l'inactiver (McKintosh *et al.*, 1995). Le facteur NIP est composé de protéines de la famille 14-3-3 (Moorhead *et al.*, 1996; Bachmann *et al.*, 1996). Cette kinase phosphoryle *in vitro* la nitrate réductase sur un résidu sérine-543 situé dans la charnière séparant le domaine à Mo-co et le domaine de l'hème; cette sérine est conservée dans toutes les séquences connues de nitrate réductases des plantes supérieures suggérant que ce mécanisme de régulation aurait lieu chez de nombreuses espèces végétales (Douglas *et al.*, 1995). Il semblerait que la formation du complexe NR-NIP 14-3-3 soit un prérequis pour la dégradation de la nitrate réductase, et/ou un régulateur négatif de l'expression de la protéine nitrate réductase induite par la lumière (Moorhead *et al.*, 1996).

L'extrémité N-terminale et le site de phosphorylation de la région charnière sont nécessaires à l'inactivation de la protéine nitrate réductase. Douglas *et al.* (1995) observent qu'une protéolyse partielle de la région N-terminale gêne la fixation du facteur protéique inhibiteur et empêche une inhibition totale. Nussaume *et al.* (1995) montrent qu'une délétion de 56 acides aminés près de la région N-terminale de la nitrate réductase de tabac supprime la capacité de l'enzyme à être inactivée en présence d'ATP.

Cependant le niveau de régulation n'est pas clairement défini. Les concentrations en des ARNm *nia* de feuilles de plantes cultivées dans un cycle jour/nuit fluctuent, atteignant une valeur maximale quelques heures après l'apparition de la lumière (Galangau, 1988; Bowsher, 1990; Pilgrim *et al.*, 1993; Lillo, 1994). Les quantités de protéine nitrate réductase, et par conséquent l'activité enzymatique, sont également affectées. Les fluctuations cycliques des ARNm *nia* pourraient refléter le rétrocontrôle dû à la glutamine puisque les teneurs en glutamine semblent inversement proportionnelles aux niveaux d'ARNm *nia* (Deng *et al.*, 1991). Chez *Nicotiana plumbaginifolia*, le rythme circadien des ARNm *nia* semble résulter d'un contrôle transcriptionnel (Vincentz et Caboche, 1991; Vaucheret *et al.*, 1992), alors que chez *Arabidopsis thaliana*, les modifications rapides de l'activité nitrate réductase sont dues à une régulation post-transcriptionnelle (Pilgrim *et al.*, 1993).

4.3- Le pouvoir réducteur

Les premières réactions d'assimilation du nitrate sont dépendantes du pouvoir réducteur fourni sous forme de NADH, de NADPH ou de ferrédoxine. Le NADPH provient de la voie

des hexoses monophosphates, le NADH de la glycolyse et de la respiration mitochondriale et une pyrimidine réductase assure le transfert des électrons du NAD(P)H vers une protéine à ferrédoxine (Oaks et Hirel, 1985).

La nitrate réductase est une enzyme active dans le cytoplasme des cellules foliaires et racinaires. Dans les cytoplasme des cellules foliaires, le NADH nécessaire au fonctionnement de la nitrate réductase est fourni par deux mécanismes de navette : l'un impliquant un transporteur de phosphate localisé dans l'enveloppe chloroplastique et l'autre impliquant un transporteur malate/oxaloacétate localisé dans les enveloppes chloroplastiques et mitochondriales (Klepper *et al.*, 1971; House et Anderson, 1980). Dans le premier cas, le 3-PGA produit dans le chloroplaste en utilisant le NADPH provenant de la photosynthèse est transporté vers le cytosol, où il est converti en acide phosphoglycérique. Cette étape permet la production de NADH et d'ATP. Dans le second cas, le malate produit dans le chloroplaste ou la mitochondrie est transporté vers le cytosol où il est oxydé en oxaloacétate et provoque la production de NADH.

Dans les cellules racinaires, la nitrate réductase peut utiliser le NADH ou le NADPH comme pouvoir réducteur. Ceux-ci sont produits par la glucose-6-phosphate déhydrogénase ou par la 6-phosphogluconate déhydrogénase présentes toutes deux dans le cytoplasme (Bowsher *et al.*, 1989, 1993). Une navette malate/oxaloacétate entre la mitochondrie et le cytosol ou dans le chloroplaste peut également fournir le pouvoir réducteur aux racines (Naik et Nicholas, 1984).

Solomonson et Barber (1990) ont montré que le NADH inhibait, en combinaison avec du cyanure ou de l'hydroxylamine, la nitrate réductase par blocage de la sous-unité Mo-co. Toutefois, Lillo et Ruoff (1992) ont montré que le NAD(P)H activait la nitrate réductase, et que l'interconversion entre une forme de faible activité et une forme active (deux fois supérieure) dépendait de la présence de NAD(P)H. En absence de NAD(P)H *in vitro*, la nitrate réductase est convertie en une forme moins active présentant une propriété d'hystérèse pendant une durée voisine de 30 minutes. Dans les feuilles, une baisse transitoire du NADH pourrait apparemment inactiver rapidement la nitrate réductase en présence de concentrations physiologiques en magnésium. L'activité nitrate réductase pourrait ensuite être réactivée lorsqu'un nouvel apport en NADH serait établi. La propriété hystérétique de l'enzyme assurerait un délai de réactivation et empêcherait le stockage des ions nitrites. Ainsi, une telle

modification de l'activité nitrate réductase foliaire en fonction du rapport NADH/NAD⁺ pourrait participer aux fluctuations de l'activité nitrate réductase au cours des transitions lumière/obscurité (Lillo, 1994).

4.4- Les métabolites azotés

Les produits finaux de l'assimilation du nitrate sont des inhibiteurs de l'activité nitrate réductase et de l'accumulation de protéine nitrate réductase. Ainsi, Deng *et al.* (1991) montrent que l'ajout de glutamine (5 mM) à la solution nutritive de plants de tabac provoque une forte inhibition de l'accumulation des ARNm *nir* dans les racines. De plus, des travaux réalisés sur *Nicotiana plumbaginifolia* révèlent que de fortes teneurs en glutamine (0,1 M) entraînent une inhibition de l'activité nitrate réductase. Des observations similaires, faites chez d'autres espèces comme le maïs, montrent que la glutamine agit au niveau de la transcription (Li *et al.*, 1995; Sivasankar et Oaks, 1995).

L'effet de la glutamine peut varier en fonction de l'organe. Li *et al.* (1995) observent une forte inhibition de l'activité nitrate réductase racinaire mais pas d'effet significatif sur l'activité nitrate réductase foliaire (81% de la valeur du témoin). L'addition de méthionine sulfoximine (MSX), un inhibiteur de la glutamine synthétase, inhibe l'activité nitrate réductase foliaire mais pas l'activité nitrate réductase racinaire. Ces auteurs proposent deux hypothèses pour expliquer ces réponses différentes : (1) Le pool actif de glutamine responsable de la répression de l'induction de la nitrate réductase n'est pas aussi facilement saturé dans les feuilles que dans les racines. (2) L'induction de la NR-NAD(P)H bispécifique active dans les racines, mais pas dans les feuilles, serait plus sensible à l'inhibition par la glutamine que la NR-NADH.

Les acides aminés tels que la glutamine, l'asparagine et l'arginine ont également un effet répresseur sur l'absorption du nitrate (Muller *et al.*, 1995)

4.5- Les phytohormones

Parmi les facteurs de croissance, seules les cytokinines semblent capables de stimuler l'activité nitrate réductase (Lu *et al.*, 1992; Suty *et al.*, 1993). Cependant, la présence de nitrate et de lumière est requise chez l'orge pour que cet effet soit efficace (Lu *et al.*, 1990).

Par des expériences de run-off et des analyses en Northern blot sur des feuilles étiolées d'orge, Lu *et al.* (1990) montrent que cette action rapide (5 minutes), stimulée par les cytokinines, est d'ordre transcriptionnel et, que le rapport cytokinines / acide abscissique influence la transcription des ARNm *nia* (Lu *et al.*, 1992).

5- La chicorée et la nitrate réductase

5.1- Le gène

Un ADNc codant pour la nitrate réductase (NRS) d'une taille de 800 pb a été isolé à partir d'une banque d'ADNc obtenue de suspensions cellulaires. Ce clone d'ADNc possédant 75% et 62% d'homologie en séquence nucléotidique avec la partie hémique de la nitrate réductase de tabac et d'*Arabidopsis* respectivement a constitué le premier fragment permettant d'isoler par PCR le gène *nia* de chicorée (Palms *et al.*, 1996). Celui-ci possède une longueur de 5222 pb avec 3 introns situés dans la région Mo-co et code pour une protéine de 920 acides aminés. La protéine présente des homologies de séquence avec celle d'autres plantes supérieures allant jusqu'à 78% avec *Nicotiana tabacum*. Des analyses par Southern blot ont révélé la présence d'un seul gène *nia* par génome haploïde de chicorée.

5.2- L'induction par le nitrate

L'existence d'une nitrate réductase NADH dépendante a été mise en évidence dans les suspensions de cellules d'origine racinaire chez *Cichorium intybus* (Chraïbi *et al.*, 1988). Palms *et al.* (1996) montrent que la nitrate réductase de chicorée est inductible par le nitrate. Cette induction intervient au niveau transcriptionnel. L'activité nitrate réductase et les taux d'ARNm dans les racines et les feuilles augmentent avec la concentration externe en nitrate (jusqu'à 5 mM). Cependant, l'activité nitrate réductase est toujours supérieure dans les racines.

5.3- La régulation par les phytohormones

L'acide abscissique provoque une inhibition de la croissance de suspensions cellulaires, mais augmente paradoxalement l'activité nitrate réductase (Chraïbi *et al.*, 1995). Cette hausse

de l'activité ne semble pas liée à une modification transcriptionnelle et pourrait s'expliquer par une régulation post transcriptionnelle (Druart, 1994). L'accroissement d'activité en présence d'acide abscissique a été confirmé dans les plantules de chicorée âgées de trois semaines. Cependant, une surexpression du gène *nia* ainsi qu'une élévation des protéines nitrate réductase sont observables impliquant une régulation transcriptionnelle (Goupil *et al.*, 1998).

L'excision des racines de chicorée provoque une chute de l'activité nitrate réductase en trois heures. L'addition d'acide naphthalène-acétique (ANA) ou de benzyl-aminopurine (BAP) n'empêche pas la diminution de l'activité enzymatique dans les premières heures qui suivent l'excision mais permet après deux jours une reprise de celle-ci due à une augmentation de la synthèse de la nitrate réductase. Une analyse histologique a permis d'associer la croissance induite par la BAP à une prolifération cellulaire dans le cortex racinaire. L'addition d'ANA induit l'initiation de méristèmes racinaires latéraux qui constituent de nouveaux sites de transcription du gène *nia* et sont à l'origine de l'augmentation de l'activité nitrate réductase (Vuylsteker *et al.* 1997a;b, 1998)

5.4- Distribution de la nitrate réductase

Au champ, les jeunes plantes de chicorée (26 jours) montrent une activité nitrate réductase mesurée *in vivo* deux fois plus importante dans les racines que dans les feuilles (Dorchies et Rambour, 1985). Cependant, la contribution foliaire n'est pas insignifiante puisqu'elle représente 25% de l'activité racinaire. L'activité nitrate réductase dans les jeunes racines est accompagnée d'une teneur élevée en nitrate (10% de l'azote total racinaire) alors que, pendant la tubérisation, la quantité de nitrate racinaire diminue jusqu'à devenir négligeable en fin de première année (Limami *et al.*, 1993). Cette modification des teneurs en nitrate et le changement de localisation de l'activité nitrate réductase dans la plante sont corrélés. En effet, lorsque la tubérisation se met en place au champ, la réduction du nitrate a lieu dans les feuilles (Dorchies et Rambour, 1985). Pour la chicorée, comme pour les autres végétaux, le flux de nitrate resterait donc le principal déterminant des activités de réduction.

Les capacités de réduction du nitrate dans la racine des jeunes plantes sont très importantes. Toutefois, chez la chicorée adulte, les feuilles présentent une importance considérable. En effet, elles interviennent dans la mise en réserve des composés azotés dans la racine durant la tubérisation. Améziane *et al.* (1995) montrent d'ailleurs qu'une carence en

azote affecte principalement la croissance des parties foliaires pendant la tubérisation mais n'affecte pas la biomasse racinaire. Des travaux réalisés sur des chicorées pérennes mettent en évidence que les activités enzymatiques de l'assimilation azotée telles que la nitrate réductase, la glutamate synthétase, la glutamate déhydrogénase et la ferrédoxine glutamate synthase, varient durant l'année et coïncident avec les fluctuations saisonnières du nitrate, du fructose et du saccharose (Sechley *et al.*, 1991). Durant l'hiver, les activités nitrate réductase et glutamate synthétase augmentent dans la racine alors que la glutamate déhydrogénase présente un profil opposé avec des activités élevées en été. A l'automne, la reprise de la réduction dans la racine correspond à la sénescence foliaire. L'année suivante, la remobilisation des réserves accumulées dans la racine et une activité de réduction racinaire précoce permettent une croissance dès le début du printemps. Ces travaux confirmeraient que la localisation de la réduction du nitrate dans la racine est corrélée à l'absence d'un appareil foliaire photosynthétiquement fonctionnel.

Pendant la tubérisation, la racine accumule des réserves azotées sous forme de protéines et d'acides aminés (glutamine, asparagine, arginine) qui seront utilisés en priorité avant toute nouvelle assimilation racinaire lors de l'édification du bourgeon étioilé au cours du forçage (Fouldrin et Limami, 1993). Ceci implique une diminution des taux en arginine, glutamine et asparagine de la racine tubérisée (Limami *et al.*, 1996). Lors du forçage, le nitrate est réduit dans les racines adventives et les bourgeons étioilés présentent peu d'activité de réduction (Dorchies et Rambour, 1983).

Il existe dans la racine de chicorée, une expression spatiale du gène *nia* en fonction de la concentration en nitrate (Palms *et al.*, 1996). Des hybridations *in situ* effectuées à l'aide d'une sonde ARN antisens dans les tissus racinaire sur de jeunes plantules mises en culture sur un milieu à faible concentration en nitrate (0,2 mM) ont permis 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. L'expression du gène *nia* se situe principalement dans les tissus vasculaires des racines mises en culture en présence de 5 mM de nitrate alors que le gène *nia* est exprimé dans les différents types tissulaires de racines mises en culture en présence de 0,2 mM de nitrate.

La forte expression du gène *nia* dans l'apex est corrélée à une activité nitrate réductase très importante puisqu'elle représente 40% de l'activité totale racinaire. Il semblerait donc que

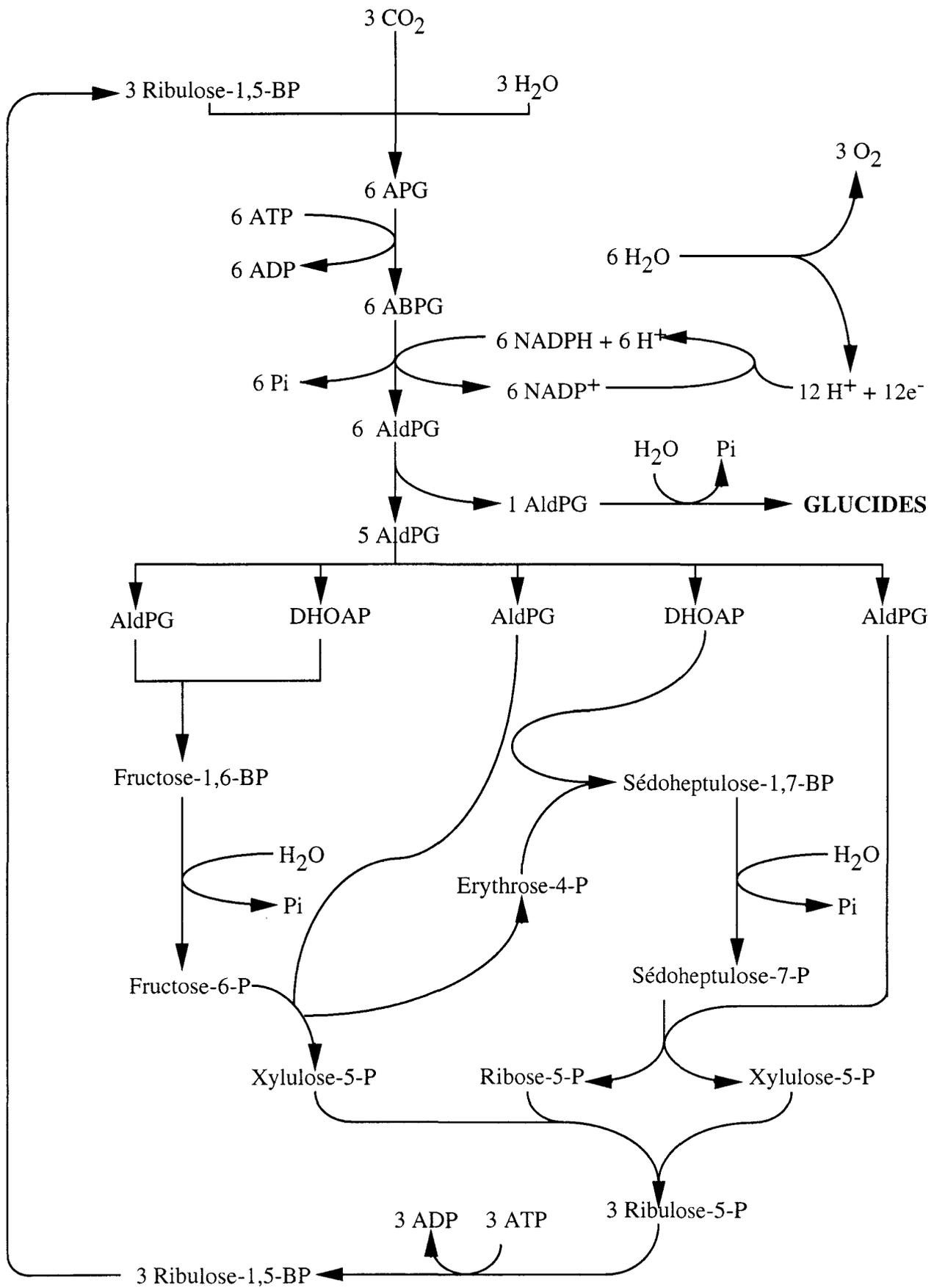


Figure 6 : Voie biochimique de l'assimilation du carbone

le nitrate soit 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 élevées. Ces résultats sont en accord avec ceux de Federova et *al.* (1994) qui, par immunocytochimie, montrent que la nitrate réductase est localisée dans l'épiderme, les cellules corticales mais aussi dans le péricycle et le parenchyme vasculaire de racines de maïs cultivées en présence de 10 mM de nitrate.

III- L'assimilation du saccharose chez les plantes

1- Synthèse du saccharose

Le saccharose est le disaccharide (α -D glucopyranosyl- β -D-fructofuranoside) le plus abondant dans les tissus végétaux. Le saccharose est une production précoce de la photosynthèse chez les plantes supérieures dans les tissus chlorophylliens. Les sucres sont principalement synthétisés dans les cellules mésophylliennes du parenchyme palissadique.

La voie biochimique (figure 6) menant à l'assimilation du carbone correspond au cycle de Calvin et peut être divisée en trois phases : (1) la réaction de carboxylation catalysée par la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) générant le 3 phospho glycérate (3-PGA), (2) les réactions menant à la réduction du 3-PGA, et (3) les réactions qui régénèrent la molécule acceptrice du CO₂. Afin de remobiliser le phosphate inorganique (Pi) bloqué dans les intermédiaires métaboliques du cycle de Calvin, les assimilats sont convertis en amidon transitoire synthétisé dans les plastes et dégradé pendant les périodes où la photosynthèse n'a pas lieu. Les trioses phosphate quittant le cycle de Calvin entrent dans le cytosol où ils sont distribués entre le cycle de la glycolyse, la biosynthèse des acides aminés, des acides gras et du saccharose. Les étapes majeures conduisant au saccharose sont l'interconversion du fructose 1,6 biphosphate en fructose 6 phosphate, la formation du saccharose-phosphate à partir de l'UDP-glucose et du fructose 6 phosphate ainsi que la déphosphorylation du saccharose phosphate. Ces deux dernières étapes sont catalysées par la saccharose phosphate synthase alors que la première étape fait intervenir 3 enzymes : la fructose 1,6 biphosphatase (FBPase), la phosphofructokinase (PFK) et la pyrophosphate:fructose-6-phosphate-1-

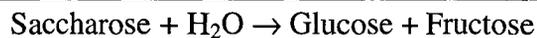
phosphotransférase (PFP). L'expression de ces gènes est optimale lorsque l'appareil photosynthétique est pleinement fonctionnel (Harn *et al.*, 1993).

2- L'assimilation du saccharose

L'utilisation du saccharose par les plantes supérieures est initiée par son hydrolyse. Celle-ci est catalysée par deux enzymes différentes présentant plusieurs isoformes qui se distinguent par leurs localisations subcellulaires : l'invertase ou la saccharose synthase. De plus, le saccharose est la molécule centrale menant à la synthèse des fructosanes via la saccharose : saccharose fructosyltransférase (SST) et la fructosane : fructosane fructosyltransférase (FFT).

2.1- L'invertase

L'invertase (INV : EC 3.2.1.26) est aussi appelée β -fructosidase ou β -fructofuranosidase ou β -fructofuranoside fructohydrolase. Son rôle dynamique a reçu une attention croissante ces dernières années avec les études de l'assimilation et du transport du saccharose. L'hydrolyse du saccharose par l'invertase, réaction non réversible, produit le glucose et le fructose et libère une énergie équivalente à $-29,3 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (Copeland, 1990).



Trois types d'invertases ont pu être distingués chez les plantes supérieures : une invertase acide pariétale (Sturm et Chrispeels, 1990), une invertase acide soluble vacuolaire (Unger *et al.*, 1992) et une invertase neutre (ou alcaline) soluble cytosolique (Ap Rees 1988). Ces différentes isoformes sont présentes au sein d'une même plante (Sturm *et al.*, 1995).

Les invertases acides agissent dans une gamme de pH variant entre 4,5 et 5,5. Chez les végétaux, ces enzymes sont actives dans les tissus jeunes à croissance rapide et les organes en développement au début de la tubérisation (Morris et Arthur, 1985; Berghall, 1997). Elles interviennent dans le métabolisme du saccharose à turn-over rapide et fournissent aux tissus en croissance des hexoses comme source d'énergie et de carbone (Ap Rees, 1974). Les invertases acides sont impliquées dans le phénomène de gravitropisme (Wu *et al.*, 1993), dans

la réponse au stress hydrique et à l'infection (Sturm et Chrispeels, 1990). Selon Giaquinta (1980), l'invertase acide pariétale joue un rôle important dans le déchargement phloémien par la création d'un gradient de concentrations en saccharose entre les tissus. Cette fonction est d'ailleurs confirmée par Getz (1991) chez la betterave rouge. De plus, cet auteur démontre que l'enzyme pariétale favorise, de cette manière, le stockage racinaire du saccharose, après qu'il ait été resynthétisé via la saccharose phosphate synthase ou la saccharose synthase, en renforçant la force d'appel du puits.

Plusieurs isoformes d'invertases acides ont été purifiées et caractérisées aux niveaux moléculaire et protéique. Ainsi, des ADNc ont pu être isolés chez *Lycopersicon esculentum*, *Vigna radiata*, *Daucus carota*, *Oriza sativa* et *Arabidopsis thaliana* (Sturm et Chrispeels, 1990; Klann *et al.*, 1992; Arai *et al.*, 1992; Ramloch-Lorenz *et al.*, 1993, Lin et Sung, 1993; Unger *et al.*, 1994; Mercier et Gogarten, 1995). Unger *et al.* (1994) montrent que ces enzymes sont codées par des gènes différents et ne proviennent pas d'épissages différentiels d'un gène commun. La plupart des invertases acides isolées sont des glycoprotéines (Sturm, 1991) possédant à leur extrémité C-terminale de courtes séquences d'acides aminés hydrophobes qui auraient une fonction dans l'adressage vacuolaire (Klann *et al.*, 1992; Arai *et al.*, 1992; Unger *et al.*, 1994). Les invertases acides pariétales présentent un point isoélectrique élevé facilitant probablement l'immobilisation de l'enzyme dans la paroi par interactions ioniques (Ramloch-Lorenz *et al.*, 1993). Des travaux réalisés sur des feuilles de riz montrent que des inhibiteurs de groupes sulfhydryles, des protéases sérines et le PMSF ont peu ou pas d'effet sur l'activité enzymatique des invertases solubles. Cela suggérerait que les résidus cystéine et sérine de la protéine ne participeraient pas directement à la réaction catalytique (Lin et Sung, 1993).

L'invertase neutre agit dans une gamme de pH allant de 6,8 à 8,0. Elle présente une activité généralement peu élevée, souvent masquée par l'importance de l'activité invertasique acide. Cette isoforme est spécifique des tissus matures dont la croissance et le développement sont ralentis (Ricardo, 1974; Masuda, 1988). Elle intervient dans l'accumulation du saccharose dans les organes tubérisés comme la carotte et la betterave (Masuda, 1988; Berghall, 1997). De plus, Ricardo (1974) montre l'existence d'une relation étroite entre les teneurs en sucres réducteurs et l'activité de l'invertase neutre dans les tissus racinaires tubérisés. Ces résultats suggèrent que l'enzyme régule le mouvement du saccharose des tissus conducteurs aux tissus de réserves.

L'invertase alcaline a été purifiée, entre autres, chez le soja et la carotte (Chen et Black, 1992; Lee et Sturm, 1996). Elle correspond à une protéine cytoplasmique non glycosylée (Copeland, 1990). Récemment, Lee et Sturm (1996) ont purifié une invertase neutre (active à pH 6,8), à partir de suspensions cellulaires de carotte, représentée par un octamère de 456 kDa et une invertase alcaline (active à pH 8) caractérisée par un tétramère de 504 kDa.

2.2- La saccharose synthase

La saccharose synthase (SUS : EC 2.4.1.13), aussi appelée UDP-glucose:D-fructose 2 α D-glycosyltransferase, est une enzyme cytosolique. Cette enzyme est présente dans tous les tissus végétaux mais surtout dans les tissus puits (Avigad 1982). Elle catalyse une réaction réversible *in vivo* libérant $-3,99 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (Geigenberger et Stitt, 1993). Elle est donc capable de jouer un rôle à la fois dans la synthèse et l'hydrolyse du saccharose. Cependant, sous des conditions physiologiques, la saccharose synthase serait impliquée en premier lieu dans le clivage de ce disaccharide (Kruger, 1990) en produisant, en présence d'UDP, de l'UDP-glucose et du fructose (Copeland, 1990).



Diverses fonctions physiologiques sont attribuées à la saccharose synthase. Des études chez *Arabidopsis* et le tabac transformés par un promoteur *Asus 1* fusionné au gène rapporteur β -glucuronidase montrent que le gène *Asus 1*, codant pour la saccharose synthase, s'exprime dans le phloème des feuilles et des racines (Martin *et al.*, 1993). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Geigenberger et Stitt (1993) qui suggèrent une possible fonction de la saccharose synthase lors du déchargement du saccharose depuis le phloème. Plus récemment, Sebkova *et al.* (1995) ainsi que Zrenner *et al.* (1995) ont confirmé cette hypothèse par leurs travaux chez la carotte et la pomme de terre. Toutes ces données démontrent que la saccharose synthase est un des déterminants majeurs de la force d'appel du puits. Selon Guerin et Carbonero (1997), la présence de la saccharose synthase dans les cellules de la coiffe racinaire de l'orge, lieu de synthèse d'amidon, indique un rôle de l'enzyme dans la formation des amyloplastes. Ces mêmes auteurs évoquent aussi une possible fonction de l'enzyme dans la fourniture d'énergie (ATP) pour le transport du saccharose et l'apport de substrat (UDP-glucose) utilisé dans la biosynthèse de la callose dans les cellules phloémiennes.

La saccharose synthase a été isolée chez de nombreuses plantes comme la tomate, le maïs, la carotte, *Vicia faba* et la canne à sucre (Wang *et al.*, 1993; Heim *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1994; Sebkova *et al.*, 1995; Hesse et Willmitzer, 1996). Selon leur mode d'expression, les gènes de la saccharose synthase peuvent être séparés en deux groupes : le premier groupe est constitué des gènes exprimés constitutivement, le second comprend les gènes dont l'expression est fortement régulée par des facteurs endogènes et environnementaux. Les génomes de monocotylédones contiennent au moins deux gènes régulés de manière spatio-temporelle et qui sont inductibles par l'anaérobiose et par les sucres (Wang *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1994). D'autres études montrent l'existence de multiples isoformes de la saccharose synthase (Buczynski *et al.*, 1993). Ainsi, deux isoenzymes SS1 et SS2 ont été caractérisées chez le maïs, l'orge et la canne à sucre (Huang *et al.*, 1994; Martinez de Ilarduya *et al.*, 1993, Guerin et Carbonero, 1997; Buczynski *et al.*, 1993). Chez plusieurs dicotylédones, un gène unique de la saccharose synthase a été identifié (Wang *et al.*, 1993; Heim *et al.*, 1993). Selon Sebkova *et al.* (1995), l'évolution vers les types SS1 et SS2 des monocotylédones serait postérieure à la séparation entre le gène de la saccharose synthase des dicotylédones et le gène des monocotylédones

La saccharose synthase est un tétramère présentant une masse moléculaire de 280 à 400 kDa. Son activité de clivage maximale se situe dans une gamme de pH de 6,0 à 8,5; son activité de synthèse se réalise pour une gamme de pH de 8,5 à 9,5 (Claussen, 1983). Les valeurs d'affinité pour le saccharose et l'UDP diffèrent considérablement entre les espèces : 10 à 29 mM et 0,05 à 6,6 mM respectivement.

2.3- Les fructosanes

2.3.1- Structure

L'inuline et d'autres polyfructosanes constituent les composés de réserve carbonée des Poacées, des Liliacées et des Astéracées (Pollock et Chatterton, 1988). Les fructosanes, chez de nombreuses espèces végétales, représentent des séries de polysaccharides non réducteurs possédant plus ou moins de résidus fructose (Edelman et Jefford, 1968). Selon Lewis (1993), les fructosanes sont des composés dans lesquels une ou plusieurs liaisons fructosyl-fructose

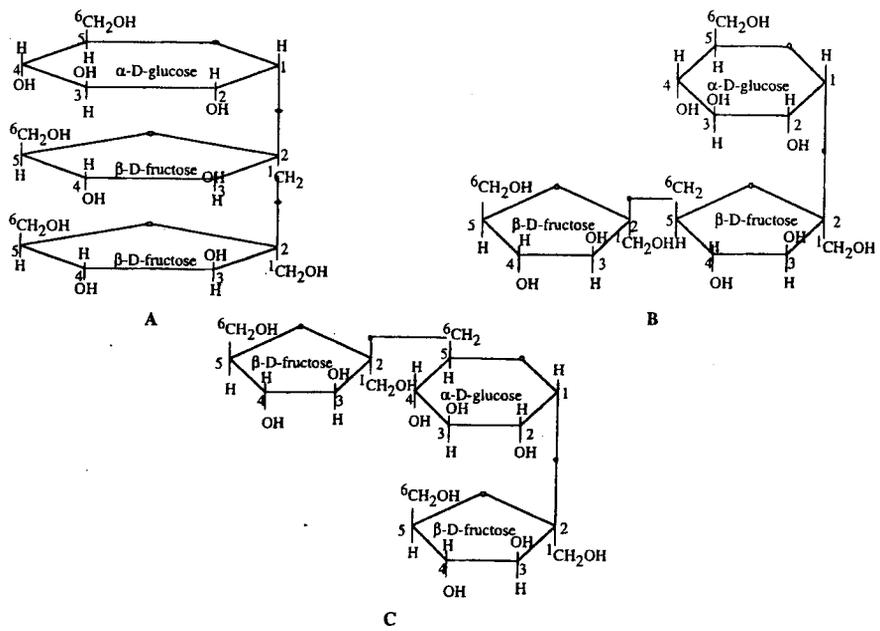


Figure 7 : Structure du 1-kestose (A); 6-kestose (B), et néokestose (C)

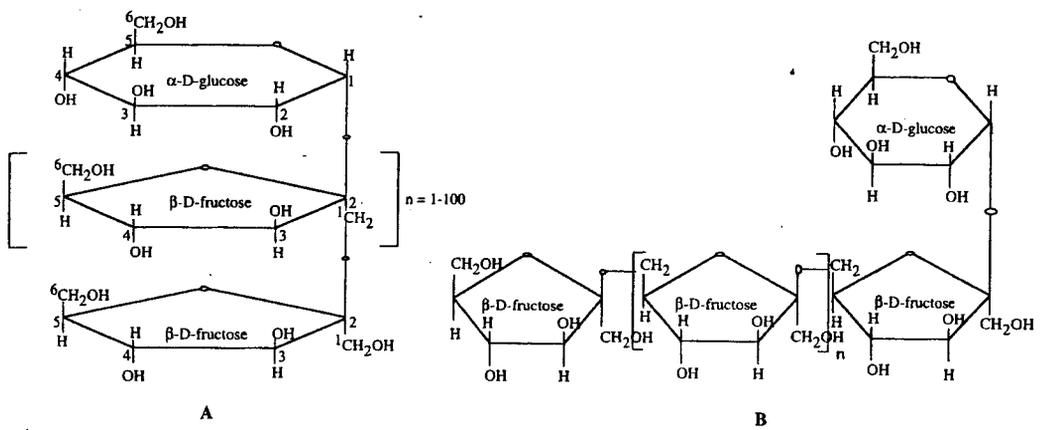


Figure 8 : Structure des inulines (A) et des levanes (B)

constitue(nt) la majorité des liaisons. Trois types de trisaccharides de base sont distingués selon la liaison du résidu fructofuranosyl sur le saccharose : le 1-kestose (isokestose), le 6-kestose (kestose) et le néokestose (figure 7). Les isokestoses sont constitués de chaînes linéaires de fructose avec des liaisons β -2,1. Les kestoses montrent des résidus fructose avec des liaisons β -2,6. Le néokestose diffère des deux autres trisaccharides par le fait que le résidu glucose est directement lié à deux résidus fructose au niveau des positions des carbones 1 et 6. A partir de ces trisaccharides, trois types majeurs de fructosanes à haut degré de polymérisation peuvent être construits : les inulines, les levanes et les oligo- et polymères du néokestose (figure 8). Le poids moléculaire des fructosanes est très variable (5 à 46 kDa). Il semblerait que le degré de polymérisation dépende du stade physiologique de la plante et des conditions environnementales bien que la taille maximale qu'un polymère puisse atteindre soit déterminé génétiquement (Pollock et Chatterton, 1988).

2.3.2- Rôle physiologique

Les fructosanes représentent avant tout un type d'hydrates de carbone de réserve stockés à long terme. Ces composés carbonés sont accumulés dans les racines tubérisées comme chez *Helianthus tuberosus*, dans les tiges des céréales et des herbacées de climat tempéré, dans les graines de certaines graminées (1 à 2% du poids sec). Il existe aussi un stockage de ce polysaccharide à court terme dans les feuilles qui semble être une réponse directe à des concentrations élevées de saccharose (Pollock et Chatterton, 1988). Cependant, le nombre restreint de plantes accumulant les fructosanes, 15% des plantes à fleurs (Pilon-Smits *et al.*, 1995), et la prédominance d'amidon chez les végétaux supérieurs, indiquent que d'autres facteurs doivent contribuer à l'avantage sélectif de la biosynthèse des fructosanes.

Puisque les fructosanes sont des molécules solubles, elles pourraient intervenir dans l'ajustement osmotique lors des changements environnementaux via des variations du degré de polymérisation. Un exemple de leur rôle dans l'adaptation osmotique est la conversion rapide des « molécules lourdes » en produits de faible degré de polymérisation lors de l'expansion des pétales chez le lys (Bielecki, 1993). Selon Spollen et Nelson (1994), il semblerait que les fructosanes contribuent seulement indirectement au mécanisme d'osmorégulation. Les fructosanes pourraient contribuer à abaisser le point de congélation de la sève. L'accumulation de ces sucres solubles est une conséquence de la baisse de température et a souvent lieu au moment où la plante devient plus tolérante au froid.

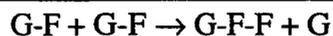
Cependant, les fonctions des fructosanes en cas de stress au froid indiquent qu'ils favorisent probablement une plus forte croissance à basse température plutôt qu'une tolérance au froid (Pollock et Chatterton, 1988). Des expériences réalisées avec des plants de tabac transgéniques accumulant des fructosanes bactériens permettent de conclure que l'introduction de fructosanes dans des espèces ne produisant pas habituellement ce type de molécules carbonées augmente leur résistance au stress hydrique (Pilon-Smits *et al.*, 1995). Plus récemment, des études ont montré que le métabolisme des fructosanes pouvait jouer un rôle dans la tolérance à l'hypoxie (Albrecht *et al.*, 1997).

2.3.3- La synthèse des fructosanes

La voie de biosynthèse des fructosanes diffère de celles associées aux polymères de glucose. De nombreuses données suggèrent que les fructosanes sont formés à partir du saccharose sans la participation directe d'intermédiaires phosphorylés et sans utilisation d'énergie. Cette synthèse requiert la participation d'au moins deux activités fructosyltransférase chez les plantes supérieures. Diverses études montrent que la vacuole est le site d'accumulation et de synthèse des fructosanes (Pollock et Chatterton, 1988). Nous pouvons distinguer deux groupes de plantes pour cette synthèse : les plantes à inuline (Asteracées) et les monocotylédones.

2.3.3.1- Les Asteracées

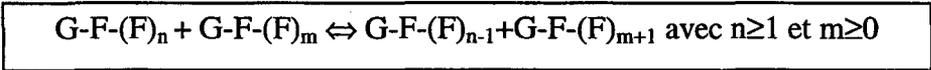
L'étape initiale implique la synthèse d'isokestose à partir de deux molécules de saccharose.



Cette réaction est catalysée par la saccharose:saccharose fructosyltransferase (SST : EC 2.4.1.99). Des travaux réalisés chez *Helianthus tuberosus* suggèrent que l'action de cette enzyme est essentiellement irréversible (Edelman et Jefford, 1968). Le pH optimal d'activité de la SST chez les plantes supérieures se situe généralement entre 5,0 et 5,7. La température optimale, quant à elle, est voisine de 28°C. L'enzyme présente une masse moléculaire

comprise entre 65 et 70 kDa (Pollock et Chatterton, 1988) qui se fragmente en deux sous-unités de 27 et 55 kDa en conditions dénaturantes (Koops et Jonker, 1996).

La seconde étape permet l'allongement de la chaîne de fructosanes par l'intermédiaire de fructosyltransférases. La fructosane:fructosane fructosyltransferase (FFT : EC 2.4.1.100) catalyse le transfert réversible des résidus fructose à partir de donneurs vers des accepteurs tous deux de types polymère de fructosanes selon la réaction suivante :



Le saccharose agit uniquement comme un donneur alors que l'isokestose et les fructosanes à haut degré de polymérisation sont efficaces en tant que donneurs et accepteurs (Pollock et Chatterton, 1988).

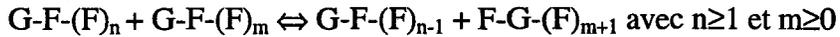
Koops et Jonker (1994) ont purifié et caractérisé la fructosane:fructosane fructosyltransférase dans les tubercules de topinambour. La masse moléculaire native est d'environ 70 kDa. Le pH optimal pour l'activité de transfert fructosyl est compris entre 5,5 et 7,0 et la température optimale se situe dans une gamme de 25 à 35°C.

L'incubation de protoplastes de tabac transgéniques, ayant intégré un ADNc de la 1-FFT d'artichaut, avec un mélange d'oligofructosanes produit des inulines avec un degré de polymérisation allant jusqu'à 23 alors que ceux ayant intégré un ADNc de la 1-FFT de topinambour s'arrête à un degré de polymérisation équivalent à 12 (Hellwege *et al.*, 1998). Sachant, qu'*in vivo*, le topinambour et l'artichaut présentent des fructosanes d'un degré de polymérisation maximal de 10 et 65 respectivement, ces auteurs suggèrent que le degré de polymérisation des fructosanes des espèces végétales est principalement défini par les caractéristiques enzymatiques de la 1-FFT.

2.3.3.2- Les monocotylédones.

Chez les monocotylédones qui contiennent des structures plus complexes de fructosanes, seules les enzymes isolées des racines d'*Asparagus officinalis* ont été étudiées en détail. Trois enzymes ont été purifiées et caractérisées. Deux d'entre elles, désignées sous les termes 1^F-SST et 1^F-FFT, sont identiques à la 1-SST et à la 1-FFT isolées chez le topinambour (Shiomi, 1982). Ces enzymes catalysent le transfert de fructoses liés par des liaisons β-2,1. La

troisième enzyme catalyse le transfert des résidus terminaux à liaison β -2,1 vers le groupe 6-OH du glucose sur l'accepteur de fructosanes. La réaction de cette enzyme appelée 6^G-FFT est illustrée ci-dessous :



Ceci permet la formation de néokestose et de la série des polymères du néokestose. Récemment, des travaux réalisés chez l'orge ont permis d'améliorer la compréhension de ce système chez les Poacées. Dans les feuilles d'orge, une enzyme présentant une capacité à synthétiser du 6-kestose a été isolée et a été initialement désignée sous le nom de 6-SST. (Simmen *et al.*, 1993). Duchateau *et al.* (1995) ont ensuite montré que l'enzyme pouvait aussi catalyser le transfert d'unités fructosyl sur le glucose, les oligofructosanes et montraient une activité invertase en présence d'eau, et l'ont alors nommée 6-SFT.

Sprenger *et al.* (1995) ont isolé le gène codant pour la 6-SFT d'orge et, Vijn *et al.* (1997) ont obtenu un ADNc de la 6^G-FFT d'oignon. La protéine mature 6-SFT se scinde en deux sous-unités de 49 et 23 kDa et contient sept sites potentiels de glycosylation.

3- Le transport du saccharose chez les plantes supérieures

3.1- Notions de sources et puits

La distribution des assimilats joue un rôle essentiel dans le développement d'une plante et le rendement d'une espèce cultivée (Gifford et Evans, 1981). La photosynthèse représente la source principale de l'énergie nécessaire aux processus biologiques des organismes vivants. Les principaux sites de photosynthèse sont les feuilles adultes et, dans une mesure moindre, les tissus verts des tiges. D'autres organes comme les racines, les fleurs, les graines et les tubercules ne sont pas capables de pratiquer la photosynthèse et dépendent donc de la fourniture d'énergie formée dans les feuilles adultes pendant la photosynthèse. Les organes peuvent être classés en deux groupes selon leur capacité à exporter de l'énergie (tissus sources) ou leur dépendance à l'importation (tissus puits) (Turgeon, 1989). D'une part, les tissus sources sont définis comme des exportateurs nets de carbone fixé; ainsi au moment de la germination, l'albumen et les cotylédons, puis plus tard, les feuilles adultes agissent comme des sources d'hydrates de carbone. D'autre part, les puits sont définis comme des

importateurs nets de carbone fixé. Ils peuvent être soit des puits métaboliques comme les méristèmes ou les racines non tubérisées dans lesquels la plupart des assimilats importés seront utilisés pour la croissance et seules de faibles quantités seront stockées temporairement, soit des puits de stockage comme les racines tubérisées, les tubercules et les graines en formation où les métabolites importés seront mis en réserve sous forme de saccharose, amidon, fructosanes, protéines ou acides gras (Ho, 1988).

Cette classification n'est pas statique car, durant l'ontogenèse, certains organes sont capables de passer du statut d'importateurs à celui d'exportateurs. Les tissus foliaires constituent le meilleur exemple de tissus sujets aux transitions puits/sources. Chez la betterave, Fellows et Geiger (1974) puis Lemoine *et al.* (1992) montrent que les jeunes feuilles ne fabriquent pas assez de photoassimilats pour compenser leur perte respiratoire alors que les feuilles adultes centrales de la rosette sont capables d'exporter leur surplus d'assimilats vers les autres parties de la plante. En fait, la capacité à subvenir à leurs besoins et la capacité à exporter se développent graduellement durant la maturation des feuilles. Chez la pomme de terre, au moins quatre transferts puits/source ont lieu : durant le développement du bourgeon étioilé en tige verte, durant la maturation des feuilles, dans les organes de reproduction sexuelle (graines) et dans les organes de reproduction végétative (tubercules) (Frommer et Sonnewald, 1995).

3.2- Le saccharose comme métabolite de transport

Le saccharose représente la forme de transport des hydrates de carbone assimilés photosynthétiquement par les plantes. Le saccharose synthétisé dans les feuilles est transporté via le phloème qui représente la voie de distribution longue distance des assimilats vers les organes hétérotrophes.

Il a été démontré chez des plants de pomme de terre transgéniques, dans lesquels les concentrations en saccharose apoplastique sont augmentées artificiellement, que le phloème était capable de transporter des hexoses (Heineke *et al.*, 1992). Le phloème présente donc une forte affinité envers le saccharose. Ainsi les concentrations en saccharose dans les sèves phloémiennes d'espèces transportant cette molécule varient de 200 à 1600 mM (Winzer *et al.*, 1996). En fait, il est supposé que les propriétés physico-chimiques du saccharose c'est-à-dire

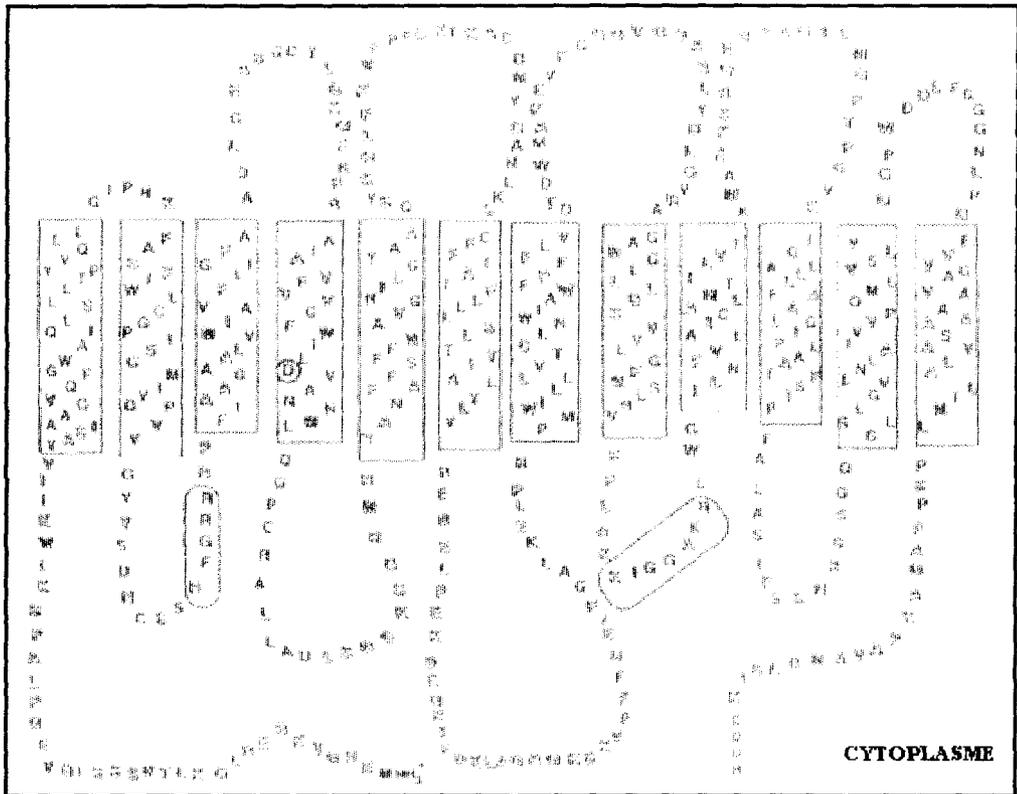


Figure 9 : Topologie présumée de St SUT1 selon Ward et al. (1998)

sa faible viscosité à forte concentration et sa stabilité chimique en tant que disaccharide non réducteur, font de cette molécule le composé idéal pour le transport longue distance. Par ailleurs, le saccharose pourra facilement être converti en glucose et fructose par plusieurs enzymes dans les feuilles et autres tissus importateurs.

3.2.1- Le chargement du phloème

Deux théories coexistent concernant la voie d'entrée du saccharose dans le phloème des feuilles exportatrices.

Le modèle symplastique dépend de l'existence de connections symplastiques, les plasmodesmes, entre les cellules mésophylliennes photosynthétiquement actives et les éléments de la sève. Selon ce modèle, les hydrates de carbone synthétisés dans le mésophylle diffuseraient d'un type cellulaire vers un autre au travers des plasmodesmes sans jamais quitter le symplasme et atteignant leur destination finale sans étape de transport via une membrane (pour revue Ward *et al.*, 1998). Des études en microscopie avec des colorants fluorescents ont d'ailleurs permis de prouver l'existence d'un transport symplastique au moins entre les cellules mésophylliennes. Cependant, ce concept est limité aux plantes possédant de nombreuses connections entre le mésophylle et le complexe cellule compagne/vaisseaux conducteurs (Van Bel, 1996).

Le modèle apoplastique du chargement du phloème dépend de l'existence de transporteurs spécifiques catalysant la pénétration membranaire des sucres et des acides aminés. Ces dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés dans la description des propriétés et des bases moléculaires de ce type de transport (pour revue Bush *et al.*, 1996, Delrot, 1993). Des études ont été effectuées à l'aide de plants de tabac transgéniques exprimant une invertase de levure dans l'apoplasme. Ces modifications ont pour conséquence une baisse de la croissance racinaire et une accumulation des sucres dans le mésophylle foliaire confirmant ainsi le transport apoplastique (Sonnewald *et al.*, 1994). Le chargement du saccharose est catalysé par des transporteurs actifs exigeant de l'énergie qui seraient localisés dans les membranes plasmiques des cellules compagnes et/ou des éléments de la sève (Stadler et Sauer, 1996). Le cotransport saccharose/proton présente une stoechiométrie de type 1 : 1 (Gahrtz *et al.*, 1994; Getz et Klein, 1995).

Les transporteurs de saccharose ont été caractérisés chez diverses plantes. Alors qu'un seul transporteur a été purifié chez l'épinard et la pomme de terre (Riesmeier *et al.*, 1993),

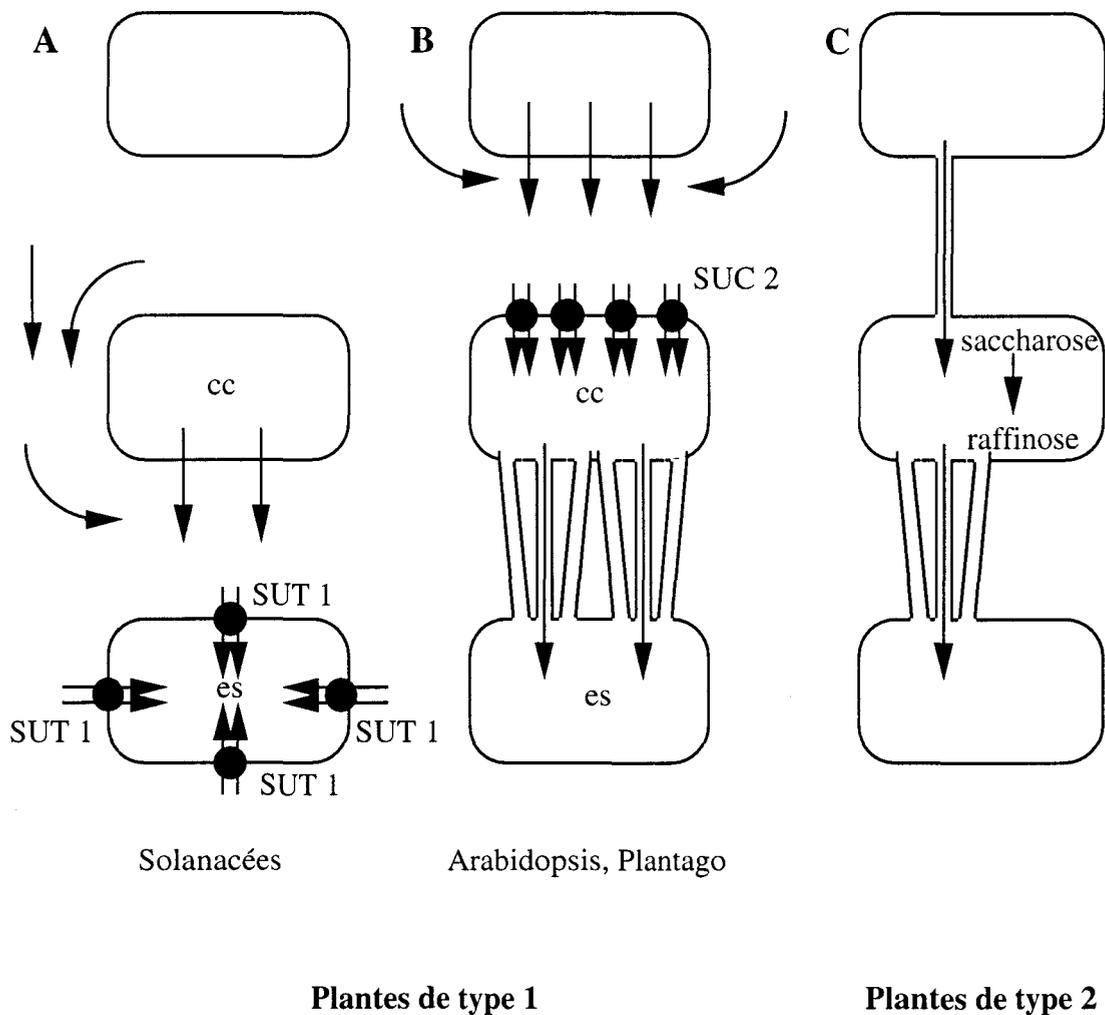


Figure 10 : Trois modèles hypothétiques du chargement du phloème (Ward et al., 1998):
 (A) chargement apoplastique chez les plantes de type 1 par SUT1 au niveau de la membrane plasmique des éléments de la séve (es),
 (B) chargement apoplastique chez les plantes de type 1 au niveau de la membrane plasmique des cellules compagnes (cc),
 (C) chargement symplastique chez les plantes de type 2 au niveau des plasmodesmes

deux ADNc ont été isolés chez *Arabidopsis* et *Plantago* (Gahrtz *et al.*, 1994; Sauer et Stolz, 1994). Le premier transporteur purifié chez les monocotylédones l'a été chez le riz par Hirose *et al.* (1997).

Les transporteurs de saccharose chez les plantes supérieures sont des protéines fortement hydrophobes. Ils appartiennent au large groupe des transporteurs qui présentent douze domaines transmembranaires dans le plasmalemme (figure 9). Ces protéines semblent être divisées en deux groupes de six hélices séparées par une large bande cytoplasmique (pour revue Ward *et al.*, 1998). Ces transporteurs comportent 500 à 535 acides aminés (Riesmeier *et al.*, 1993; Gahrtz *et al.*, 1994; Sauer et Stolz, 1994; Hirose *et al.*, 1997). Les transporteurs isolés ont une affinité pour le saccharose comprise entre 0,4 mM et 1,5 mM (Gahrtz *et al.*, 1994).

Malgré leur analogie structurale et biochimique, il existe différents transporteurs possédant des localisations cellulaires diverses. Chez les Solanacées, le chargement du saccharose implique un type de transporteurs (SUT₁) localisé dans les éléments conducteurs de la sève alors que chez *Arabidopsis* et *Plantago*, des transporteurs de type SUC₁ et SUC₂ sont situés dans les cellules compagnes (pour revue Ward *et al.*, 1998). Les gènes codant pour les transporteurs s'expriment différemment selon les organes. Truernit et Sauer (1995) montrent que le gène *AtSUC₂* s'exprime dans les racines et les fleurs ainsi que dans le phloème des tissus chlorophylliens chez *Arabidopsis thaliana*. Chez *Plantago major*, les gènes s'expriment dans les racines (*PmSUC₂*), les fleurs (*PmSUC₁* et *PmSUC₂*) et les graines en développement (*PmSUC₁*) (Gahrtz *et al.*, 1996).

En fait, Ward *et al.* (1998) suggèrent l'existence de trois modèles hypothétiques pour le chargement actif du phloème (figure 10) : chez *Arabidopsis*, SUC₂ et des pompes H⁺/ATPase sont présents dans les cellules compagnes, chez les Solanacées seul SUT₁ est détecté et, enfin chez d'autres plantes seul le transport symplastique semble possible.

3.2.2- Le déchargement du phloème

Cette étape est très peu étudiée du fait de la diversité des mécanismes non seulement entre les espèces mais aussi entre les tissus d'une même plante. Trois modèles ont toutefois pu

être décrits. Le déchargement peut avoir lieu selon un gradient de concentration par le symplasme, il peut aussi s'effectuer via un transporteur directement par l'apoplasme. Des études récentes, chez le riz, ont permis de montrer l'expression du gène codant pour le transporteur SUT₁ dans des organes sources (Hirose *et al.*, 1997). Il peut aussi impliquer un système de transporteur d'hexoses dans le cas où il existe une invertase pariétale (pour revue Frommer et Sonnewald, 1995).

4- La régulation du métabolisme carboné

La photosynthèse et la voie de biosynthèse du saccharose sont parmi les voies métaboliques les plus importantes chez les plantes. La régulation de ces deux voies est complexe et implique l'interaction de plusieurs enzymes.

Le contrôle des organes puits sur la photosynthèse est suggéré dans de nombreuses études. Il semble que l'accumulation des hydrates de carbone dans les feuilles, lorsque la production devient supérieure à la demande des puits, provoque des modifications de la photosynthèse et de la distribution des sucres dans les feuilles (Goldsmith et Huber, 1992).

En fait, selon le système expérimental, le tissu et le gène étudié, les glucides peuvent avoir un effet de répression ou d'induction de l'expression de différents gènes codant pour les enzymes clés du métabolisme carboné. Par exemple, le gène de la saccharose synthase dans l'albumen du maïs et le gène de l'ADP-glucose pyrophosphorylase chez la pomme de terre sont induits par le saccharose (Takeda *et al.*, 1994). Chez *Flaveria bidentis* et *Nicotiana tabacum*, l'application du saccharose exogène stimule la photosynthèse (Furbank *et al.*, 1997). A l'opposé, l'utilisation de plants de tomate transgéniques surexprimant l'invertase pariétale de levure permet de montrer que l'accumulation des hydrates de carbone inhibe la photosynthèse et influence la croissance (Dickinson *et al.*, 1991; Paul et Driscoll, 1997). Récemment, Lee et Daie (1997) ont démontré que les produits finaux servaient de signaux moléculaires provoquant l'inhibition de certains gènes comme la fructose 1,6 bisphosphatase et la Rubisco. Par ailleurs, selon le stade physiologique et/ou développemental de la plante, les glucides peuvent réguler de manière antagoniste (inhibition/stimulation) l'expression d'un même gène (Kovtun et Daie, 1995).

D'autres paramètres sont impliqués dans la régulation du métabolisme carboné. Ainsi, la fructose bi-phosphatase et la saccharose phosphate synthase sont régulées par la lumière (Daie, 1993; Jones et Ort, 1997). La saccharose phosphate synthase est également régulée par le mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation. Elle est active à l'état déphosphorylé qui coïncide avec la période lumineuse (Huber *et al.*, 1992; Mc Michael *et al.*, 1995; Jones et Ort, 1997). Enfin, Lee *et al.* (1997) montrent que les activités des invertases acides soluble et pariétale augmentent en présence d'acide indolyl acétique alors que les activités de la saccharose synthase et de la saccharose phosphate synthase ne sont pas influencées par les auxines.

5- Le carbone et la chicorée

5.1- Les enzymes

5.1.1- Les invertases

Trois invertases ont été révélées dans les feuilles de *Cichorium intybus* L. cv Kalpa par Gupta *et al.* (1991) ainsi que Kaur *et al.* (1992). Il s'agit de deux invertases acides (I et II) et d'une invertase neutre. Ces enzymes montrent une activité optimale à une température de 55°C. Cette forte valeur semble due aux conditions environnementales particulières, la température du lieu de culture pouvant atteindre 48°C. L'affinité pour le saccharose est de respectivement 0,4; 1,1 et 20 mM pour l'invertase acide I, l'invertase acide II et l'invertase neutre. De plus, les invertases acides présentent un pH optimum aux environs de 5,0 et l'invertase alcaline montre une activité maximale à pH 8,0.

Van den Ende *et al.* ont, quant à eux, purifié une invertase acide (1996a) et une invertase neutre (1993) de racines de *Cichorium intybus* L. cv Flash. Cette variété est cultivée en climat tempéré et présente donc une température optimale d'activité invertasique équivalente à 30°C. Le pH optimal de l'activité invertase acide est observé entre 4,0 et 6,5. Cette enzyme présente une affinité pour le saccharose de 18 mM. L'invertase neutre a été également purifiée. Sa masse moléculaire est de 260 kDa en conditions non dénaturantes et de 65 kDa en conditions dénaturantes indiquant que l'enzyme est un tétramère composé de quatre sous-unités identiques. Cette enzyme possède une affinité d'environ 16 mM pour le

saccharose ainsi qu'une activité optimale à un pH compris entre 7,0 et 7,5. Par ailleurs, des analyses réalisées en présence de concanavoline A ont révélé la nature non glycoprotéique de l'invertase neutre.

5.1.2- La saccharose : saccharose fructosyltransférase

La protéine 1-SST a été purifiée chez *Cichorium intybus* L. cv Flash (Van den Ende *et al.*, 1996b). La saccharose:saccharose fructosyltransférase de chicorée est une protéine de 69 kDa pouvant être rapidement clivée en deux sous-unités de 49 et 24 kDa et montrant une température optimale d'activité entre 25 et 30°C. Le pH optimal d'activité acide (pH 5,0 à 6,5) et la rétention de l'enzyme sur colonne concanavoline A indiquent qu'elle est une glycoprotéine vacuolaire. L'affinité apparente de la capacité de transfructosylation de la 1-SST (le saccharose étant l'accepteur) a pu être estimée par la production de 1-kestose dans une gamme de 20 à 1000 mM.

5.1.3- La fructosane : fructosane fructosyltransférase

La 1-FFT a été purifiée chez *Cichorium intybus* L. cv Flash (Van den Ende *et al.*, 1996c). La fructosane:fructosane fructosyltransférase de chicorée est un hétérodimère de 69 kDa composé de deux monomères de 52 kDa et 17 kDa. Selon le critère de rétention sur concanavoline A, l'enzyme est une glycoprotéine et présente un pH optimal compris entre 5,5 et 6,5 suggérant donc une localisation vacuolaire. Étonnamment, l'activité de synthèse maximale à partir du 1-kestose est obtenue aux environs de 0°C. Les auteurs suggèrent que ceci serait lié à une fonction invertase de la fructosane:fructosane fructosyltransférase qui augmente significativement avec la température. Alors que le saccharose est exclusivement utilisé comme accepteur par l'enzyme, le 1-kestose et les oligofructosanes agissent comme des donneurs et accepteurs de fructose.

5.2- Distribution temporelle et spatiale des enzymes carbonées

La chicorée accumule des fructosanes de type inuline dans sa racine pivotante charnue. Selon le métabolisme des fructosanes, quatre stades physiologiques peuvent être distingués. Durant la première année, au stade jeune (0 à 60 jours), la synthèse de fructosanes est nulle ou

faible; au stade moyen du développement (60 à 120 jours), les fructosanes sont activement synthétisés et accumulés; au stade tardif (après 120 jours), l'accumulation des fructosanes cesse suite à la sénescence de la partie foliaire. Au cours de la seconde année, la floraison et la formation de graines nécessitent l'hydrolyse des fructosanes dans la racine afin d'approvisionner ces organes en hydrates de carbone.

Au stade précoce du développement, l'invertase acide, la saccharose phosphate synthase et la saccharose synthase dans sa fonction anabolique sont présentes dans les feuilles de chicorée cv Kalpa. L'invertase acide est trouvée dans les pétioles, la saccharose synthase dans les limbes, la saccharose phosphate synthase est observée dans ces deux tissus.

Au stade moyen du développement, Gupta *et al.* (1991) mettent en évidence une augmentation de ces activités enzymatiques foliaires qui vont ainsi atteindre leur maximum. Par ailleurs, Van den Ende *et al.* (1996a,d) montrent que les activités 1-SST et 1-FFT sont fortement détectées dans les racines de chicorée cv Flash à cette même période. Il semblerait que l'exportation du saccharose des feuilles vers les racines est à son maximum durant ce stade comme le reflète l'apparition et l'augmentation des activités de fructosylation. Ainsi, pour soutenir la production de photoassimilats, les feuilles utiliseraient la saccharose synthase en addition à la saccharose phosphate synthase (Gupta *et al.*, 1991).

Enfin, au stade tardif du développement, une chute très importante des activités invertase, saccharose phosphate synthase, saccharose synthase et 1-SST sont observables dans les feuilles et les racines. Seule l'activité 1-FFT perdure et augmente lentement.

IV- Coordination entre métabolisme azoté et carboné

Chez les végétaux, l'assimilation de l'azote est étroitement liée à la respiration et à la photosynthèse, générateurs d'énergie (ATP), de pouvoir réducteur (NADH, NADPH) et de squelettes carbonés accepteurs d'ammonium (acides cétoniques, α -cétoglutarate ...). Parallèlement, dans les tissus chlorophylliens, la réduction du CO₂ en vue de produire du saccharose est un processus qui coopère avec la voie d'assimilation du nitrate. Elle nécessite, en effet, l'élaboration de molécules azotées, enzymes et autres systèmes indispensables à la capture de l'énergie et au transfert d'électrons. Les liaisons entre l'assimilation du nitrate et la synthèse du saccharose sont nombreuses : au niveau des chloroplastes, l'ATP photogénéré, le NADPH et la ferrédoxine réduite sont requis pour l'assimilation du CO₂ dans les trioses

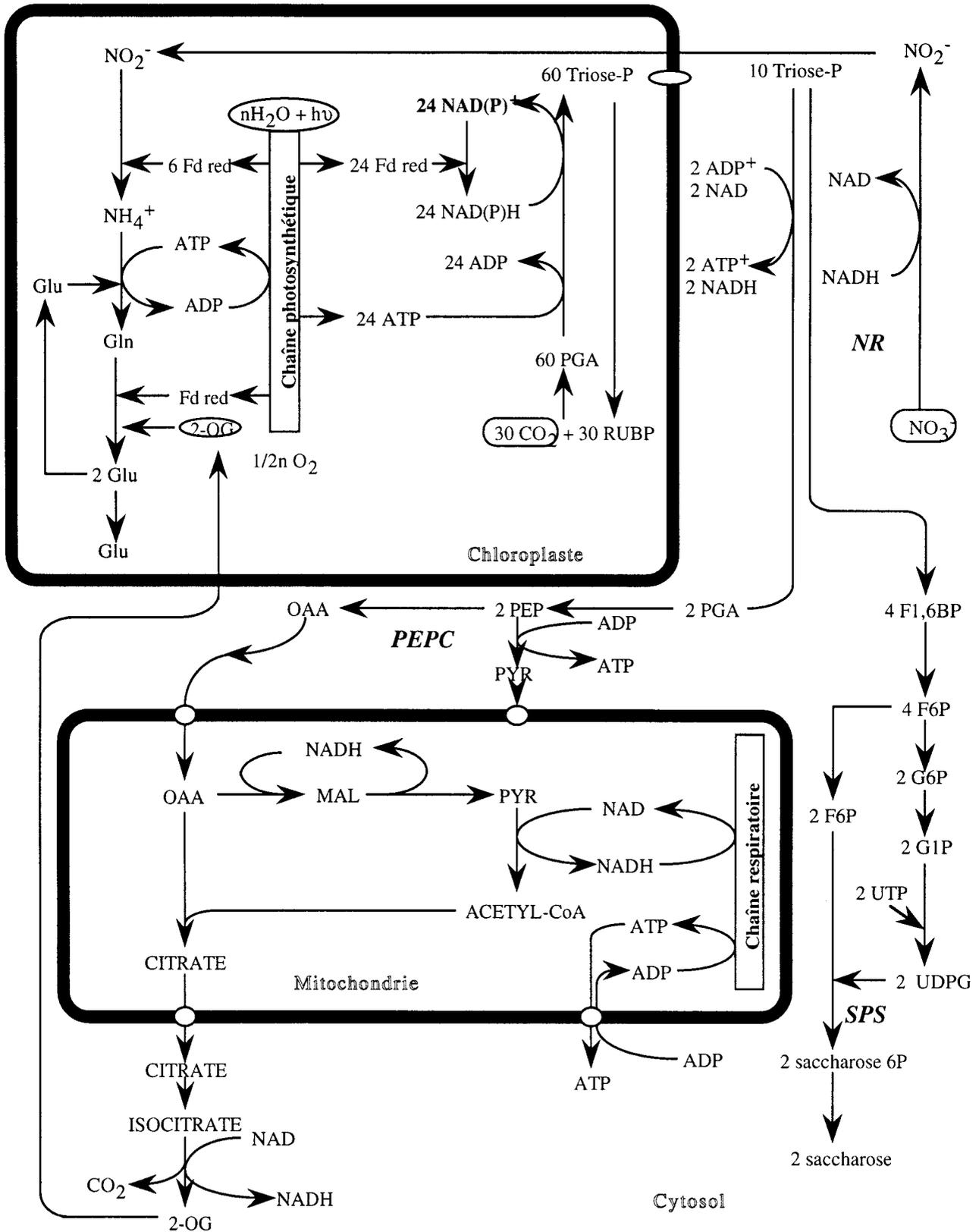


Figure 11 : Représentation des métabolismes carboné et azoté dans la cellule (Ferrario et al., 1997)
 F1, 6BP : fructose-1,6-diphosphate; F6P : fructose-6-phosphate; Fd red : férredoxine réduite;
 G1P : glucose-1-phosphate; G6P : glucose-6-phosphate; Glu : glutamate; Gln : glutamine;
 MAL : malate; NR : nitrate réductase; OAA : oxaloacétate; 2-OOG : α -cétoglutarate; PGA :
 phosphoglycérate; PEP : phosphoenolpyruvate; PEPC phosphoenol-pyruvate-carboxylase;
 PYR : pyruvate; RUBP : ribulose diphosphate; SPS : saccharose phosphate synthase; UDPG :
 uridine-diphospho-glucose; UTP : uridine triphosphate

phosphates, pour la réduction du nitrite en ammonium et pour l'assimilation de ce dernier dans les acides aminés. Les trioses phosphates transférés dans le cytosol via un système de navette sont convertis en saccharose ou oxydés avec la production de NADH via la glycolyse qui fournit les équivalents réducteurs pour la réduction du nitrate (pour revue Ferrario *et al.*, 1997) (figure 11).

1- Métabolisme azoté et respiration

La respiration permet la production d'énergie nécessaire aux différentes fonctions intracellulaires. L'assimilation de l'azote, du nitrate à la production de glutamate, demande le transfert de dix électrons ainsi que la présence de molécules d'ATP. Pour fournir les électrons à ces réactions, la plante doit prélever du pouvoir réducteur via la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons. Selon Bloom *et al.* (1989), à l'obscurité, les feuilles des plantes supérieures dégagent plus vite le CO₂ qu'elles ne consomment l'oxygène. Ils suggèrent que le cycle TCA ou la voie d'oxydation des pentoses phosphates transfèrent les électrons au nitrate et au nitrite plutôt qu'à l'oxygène. Ces résultats indiquent qu'à l'obscurité, les feuilles dépendent jusqu'à 25% de leur énergie pour l'assimilation de l'azote. Huppe et Turpin (1994) arrivent aux mêmes conclusions. Cependant, il n'existe aucune preuve directe pour avérer cette hypothèse. Bloom *et al.* (1989) montrent également que l'anoxie diminue fortement l'assimilation de l'azote dans les racines et les feuilles d'orge. Des expériences réalisées chez *Selenastrum minutum*, une algue verte unicellulaire, révèlent que l'activité respiratoire est plus importante en présence de nitrate qu'en présence d'ammonium (Weger et Turpin, 1989). Ces mêmes observations sont faites chez l'orge par Bloom *et al.* (1992).

En fait, les relations entre la glycolyse, la respiration et le métabolisme azoté sont très complexes. Si, en présence de lumière, la photosynthèse est le producteur majeur d'ATP, de NAD(P)H et d'acétoglutarate, il semblerait qu'à l'obscurité la glycolyse et le cycle de Krebs fournissent aux chloroplastes l'énergie et les molécules organiques nécessaires à l'assimilation azotée (Weger et Turpin, 1989). Très récemment, il a été montré que la glucose-6-phosphodéshydrogénase régénèrait le NADPH prouvant la capacité de cette enzyme à supporter la réduction du nitrite à l'obscurité (Jin *et al.*, 1998).

2- Métabolisme azoté et photosynthèse

La régulation de l'assimilation de l'azote par la photosynthèse ainsi que la régulation de la photosynthèse par l'assimilation azotée sont des mécanismes relativement complexes. Diverses études montrent que les relations sont très différentes selon que l'on considère l'effet à court ou long terme d'apport d'azote.

A court terme, Kaiser et Förster (1989) montrent que la réduction du nitrate dans les feuilles d'épinard (*Spinacia oleracea*) cesse à la fermeture des stomates prouvant que la photosynthèse agit directement sur l'activité nitrate réductase. D'autres travaux, effectués sur des feuilles de blé cultivées en présence de faibles teneurs en azote mais auxquelles est fournie une concentration élevée ponctuelle en nitrate, mettent en évidence une inhibition rapide de la synthèse du saccharose et une augmentation du dégagement de dioxygène (Champigny *et al.*, 1991, 1992). De plus, les recherches de Bloom *et al.* (1989), réalisées sur des plants d'orge sauvage présentant une activité nitrate réductase déficiente, montrent que les vitesses de dégagement de dioxygène (Photosystème II) et d'absorption du CO₂ sont beaucoup plus élevées chez le type sauvage. Ainsi, l'assimilation du nitrate dans les parties foliaires et l'assimilation du CO₂ seraient deux puits importants pour le flux d'électrons photosynthétiques.

A long terme, l'étroite dépendance de l'activité photosynthétique des feuilles à la fourniture en azote est généralement reconnue. Chez les plantes en C₃, environ 75% de l'azote foliaire sont contenus dans la Rubisco, les protéines liées aux membranes des chloroplastes et associées aux transporteurs d'électrons (Gastal et Lemaire, 1997). Evans (1989) montre d'ailleurs que la limitation en azote de plantes en C₃ est accompagnée d'une baisse de la photosynthèse dans les feuilles matures. Ceci est principalement dû à la chute considérable de la distribution de l'azote mobilisé pour supporter la synthèse des enzymes du cycle d'oxydation des pentoses phosphate comme la Rubisco. Des expériences plus récentes ont mis en évidence que, chez le soja, durant les périodes de fourniture limitée d'azote, l'azote foliaire est préférentiellement attribué aux thylakoïdes des chloroplastes afin de maintenir l'activité de transfert des électrons photosynthétiques (Robinson et Burkey, 1997). Ceci signifierait, en fait, que la plante développe une stratégie de survie durant les périodes prolongées de carence azotée sévère.

Cependant, la compétition entre les métabolismes azoté et carboné au niveau de l'apport d'énergie par les photosystèmes semble négligeable. En effet, Robinson (1988) montre que la machinerie photosynthétique est capable de fournir de l'ATP et du NADPH aux deux métabolismes. En condition de carence azotée, Rufty *et al.* (1988) montrent que les glucides s'accumulent dans les feuilles provoquant la diminution de l'activité photosynthétique. Ces auteurs suggèrent que la quantité de carbone stockée dans la plante correspond à celle nécessaire à la synthèse d'acides aminés en conditions nutritives normales.

3- Métabolisme azoté et distribution carbonée chez la chicorée

L'apport de nitrate est connu pour affecter non seulement le statut azoté et la croissance de la plante, mais aussi la distribution de la masse de matière sèche entre les parties aériennes et souterraines (Limami *et al.*, 1993). En particulier, un faible apport en nitrate induit une baisse du rapport feuilles/racines ainsi que de la biomasse des feuilles. Le flux de photoassimilats vers les racines augmenterait sous des conditions de déficience en azote exogène alors qu'en conditions normales, les photoassimilats seraient majoritairement utilisés dans les parties foliaires. La disponibilité en nitrate régulerait donc le flux de photoassimilats vers les puits métaboliques (feuilles) ou vers les puits de stockage (tubercules et racines tubérisées).

Améziane *et al.* (1995) ont, tout d'abord, mis en évidence l'effet de la concentration en nitrate (0,6 et 3 mM) durant la croissance de la plante sur la distribution carbonée et sur la force d'appel du puits. Une faible concentration en azote (0,6 mM) provoque uniquement une baisse de la teneur en matière sèche des feuilles. Ainsi, des analyses de chasse à l'aide de $^{14}\text{CO}_2$ montrent, dans cette condition, une hausse de l'apport de carbone vers la racine et une baisse de la distribution vers les parties foliaires en croissance. Cette stratégie permettrait au végétal de développer un système racinaire lui permettant d'atténuer les conséquences de la carence sur le prélèvement de l'azote et sur l'accumulation des réserves dans les tubercules. Par ailleurs, alors que les activités invertasiques demeurent relativement inchangées entre les deux conditions de culture, les activités saccharose synthase et saccharose:saccharose fructosyltransférase augmentent fortement dans les racines des plantes cultivées sur milieu déficient en azote. Ces résultats mettent en évidence la contribution de ces enzymes dans la

détermination de l'appel du puits, donc dans la distribution du carbone dans une plante (Sonnewald *et al.*, 1994).

Afin de vérifier si l'apport de nitrate peut influencer la distribution carbonée dans la plante, Améziane *et al.* (1997) ont réalisé des expériences de marquage au $^{13}\text{CO}_2$ et ont suivi l'effet d'un apport de nitrate sur les flux de carbone à différents stades de développement de la chicorée. Chez les jeunes plants, une carence en nitrate provoque une chute de la croissance qui semblerait due à une baisse de l'incorporation de $^{13}\text{CO}_2$ à hauteur de 30%. Cependant, la répartition du carbone entre les feuilles et les racines reste stable dans cette condition. Les auteurs notent ainsi que les activités enzymatiques ne sont pas modifiées par la fourniture en azote. L'invertase acide présente l'activité la plus élevée ce qui est en accord avec sa fonction dans les tissus à forte activité métabolique. Au stade adulte, la plante accumule des fructosanes dans sa racine. Comme précédemment, la baisse de l'apport azoté provoque une chute de la croissance totale des plantes. Toutefois, les feuilles semblent beaucoup plus affectées que les racines. En fait, la répartition du carbone fixé se fait largement en faveur des racines tubérisées. De plus, chez ces plantes, l'activité saccharose:saccharose fructosyltransférase devient importante dans la racine et deux fois plus importante chez les plantes carencées par rapport aux plantes non carencées. La saccharose:saccharose fructosyltransférase est connue pour être une enzyme inductible par son substrat, or la teneur en saccharose n'est pas modifiée dans les plantes adultes carencées en azote (Améziane *et al.*, 1995). Il semblerait donc que la teneur en nitrate affecte les plantes adultes en particulier au niveau de l'activité saccharose:saccharose fructosyltransférase. Le nitrate agirait directement ou via des composés de sa réduction. Celui-ci régulerait la synthèse ou l'activité de la saccharose:saccharose fructosyltransférase gouvernant la force d'appel du puits racinaire chez la chicorée.

**MATERIEL
&
METHODES**

I- Matériel Végétal

1- La plante

Le matériel utilisé est la chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* L. var. Witloof; $2n = 2x = 18$). Nos travaux ont été effectués sur des plantes cultivées en conditions hors-sol. Nous avons utilisé pour cela des akènes du cultivar Turbo fournis par les établissements HOQUET graines (Raillencourt).

2- Conditions expérimentales

2.1- Culture sur perlite

Cette culture a lieu en conditions non aseptiques. Les akènes sont placés dans des bac en plastique opaque (30 cm x 20 cm) contenant de la perlite, substrat inerte, préalablement humidifiée avec de l'eau distillée. Les plantules sont arrosées quotidiennement avec une solution nutritive (7 mM de NO_3^-) de Heller (1953). Les cultures sont entreposées en chambre de culture sous une photopériode de 12 heures (24°C)/12 heures (20°C) lumière/obscurité.

2.2- Culture *in vitro*

L'aseptisation des akènes se fait par trempage dans une solution de chlorure mercurique pendant 10 minutes suivi de 5 rinçages successifs par de l'eau distillée stérile d'une durée de une, cinq, dix, vingt et cent vingt minutes. Les akènes sont ensuite mis à germer, durant 3 jours, en boîtes de Pétri contenant le milieu de Heller (1953) additionné de 4,5 g.l⁻¹ d'agar (biokar). Après l'émergence des radicules, les graines sont repiquées individuellement en tubes sur différents types de milieux gélosés :

- soit le milieu précédent,
- soit le milieu précédent auquel on ajoute 5, 10, 15, 20 ou 30 g.l⁻¹ de saccharose.

Celles-ci sont placées en chambre de culture avec une photopériode de 16 heures (24°C)/8 heures (22°C) lumière/obscurité.

3. Prélèvement

Les racines, préalablement rincées à l'eau distillée, et les feuilles sont séparées et pesées. Les échantillons sont utilisés frais ou sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C.

II- Analyses enzymologiques

1- La nitrate réductase

1.1- Mesure *in vivo*

La mesure de l'activité enzymatique *in vivo* consiste à doser les nitrites formés pendant l'incubation de fragments de tissus maintenus en condition anaérobie et à l'obscurité (Ferrari et Warner, 1980; Jaworski, 1971).

Les tissus frais (100 à 200 mg) sont placés dans 2 ml de tampon d'incubation (50 vol. de tampon phosphate pH 7,5 0,1 M, 30 vol. de KNO₃ 0,1 M et 1 vol. de propanol). Le mélange est soumis à un courant d'azote durant une minute afin d'obtenir les conditions anaérobies nécessaires pour bloquer l'activité nitrite réductase. Les tubes contenant les échantillons sont ensuite bouchés et placés à 28°C à l'obscurité pendant 30 minutes. Les nitrites formés sont révélés par addition de 1 ml de sulfanilamide 0,2% dans HCl 3N et de 1 ml de naphthyléthylène diamine 0,15%. L'absorbance est mesurée à 540 nm. L'activité est exprimée en nmole de nitrites formés.min⁻¹.g⁻¹ de matière fraîche.

1. 2- Mesure *in vitro*

La technique de mesure *in vitro* est dérivée de Merlo *et al.* (1995). Après broyage des tissus végétaux dans l'azote liquide, 2 volumes de tampon d'extraction contenant 50 mM d'Hepes-KOH pH 7,5, 5 mM de MgCl₂, 0,5 mM d'EDTA, 14 mM de 2-β mercaptoethanol, 0,1% (v/v) de Triton x100, 10% (v/v) de glycérol, 50 μM de leupeptine, 0,5 mM de PMSF et 10% (p/v) de PVP sont ajoutés par gramme de poudre. Ce mélange est ensuite centrifugé (10 min, 12 000 x g, 4°C) et le surnageant est récupéré. Quatre cents microlitres de tampon de

mesure constitué de 50 mM d'Hepes-KOH pH 7,5, 10 mM de KNO₃, 0,2 mM de NADH, 10 µM de FAD et 2 mM d'EDTA sont placés à 30°C durant 5 minutes. Cent microlitres d'extrait enzymatique sont alors ajoutés et laissés à incuber durant 5 minutes à 30°C. La réaction enzymatique est stoppée par addition de 50 µl d'acétate de zinc 0,5 M. L'excès de NADH est éliminé par incubation avec de la phénazine méthosulfate (10 µM finale) pendant vingt minutes à température ambiante. Le nitrite formé est révélé par addition de 350 µl de sulfanilamide (0,2% dans HCl 3N) et de 350 µl de naphtyléthylène diamine 0,15%. L'absorbance est mesurée à 540 nm. L'activité est exprimée en nmole de nitrites formés.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine.

2- L'invertase

L'activité invertasique est mesurée en dosant, par le système glucose oxydase - peroxydase, le glucose formé après incubation de l'extrait biologique contenant l'enzyme en présence de saccharose exogène (méthode de Jorgensen et Andersen, 1973).

Le matériel végétal (250 mg) est broyé en microtube en présence de 500 µl de tampon phosphate-citrate 0,1 M pH 4,8 pour les activités invertasiques acides ou de 500 µl de tampon Hepes-NaOH 50 mM pH 7,2, MgCl₂ 15mM, EDTA 1 mM pour les activités invertasiques neutres. Le broyat est centrifugé durant 5 minutes à 10 000 x g.

L'échantillon à doser (100 µl) est incubé pendant 30 minutes à 30°C en présence de 200 µl de saccharose 0,225 M. L'hydrolyse est bloquée en ajoutant successivement 300 µl de sulfate de zinc à 5% et 300 µl d'hydroxyde de baryum 0,3N. Le sulfite de baryum formé est éliminé par centrifugation pendant 5 minutes à 10 000 x g. Le glucose contenu dans 300 µl de surnageant est dosé par la méthode colorimétrique GOD-POD. Deux millilitres de réactif (Tris-HCl 200 mM pH 7,5, 0,1 mg ml⁻¹ peroxydase, 0,01 mg ml⁻¹ glucose oxydase et 7,14 mg ml⁻¹ d'orthodiansidine 99/1 (v/v)) sont ajoutés et la réaction est stoppée par 1 ml d'HCl 6N après 10 minutes d'incubation à 30°C. La mesure d'activité est effectuée à 530 nm. Les activités sont exprimées en nmole de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine.

3- La saccharose synthase

La méthode d'extraction utilisée est dérivée de Hurst *et al.* (1993).

Le matériel végétal (500 mg) est broyé dans 2,5 ml de tampon d'extraction contenant 20 mM de Hepes-NaOH pH 7,4, 1 mM de Na₂EDTA, 1 mM de DTT, 0,1 mM de PMSF, 0,1% (v/v) de 2-βmercaptoethanol, 10% (v/v) de glycérol puis centrifugé 30 min à 10 000 x g et à 4°C.

Le passage du surnageant sur une colonne de Sephadex G25 préalablement équilibrée avec 10 ml de tampon d'extraction exempt de PMSF permet l'élimination des sels. L'extrait enzymatique est élué avec 3 ml de tampon d'équilibration. Cent microlitres d'extrait sont additionnés de 0,2 ml de Hepes-NaOH pH 7,0, 0,1 M, 0,2 ml de saccharose 0,1 M et 0,1 ml d'UDP 6 mM puis incubés 15 minutes à 30°C. Les sucres réducteurs sont ensuite dosés selon la méthode modifiée de Lever (1973). Cinq millilitres de réactif (5 ml Na₂SO₃ 1 M, 5 ml CaCl₂ 0,2 M, 5 ml de Na₃Citrate 0,5 M, 5 ml NaOH 5 M, 1 g p-hydroxy benzoic acide hydrazide pour 1 litre) sont ajoutés au mélange réactionnel et le tout est incubé 10 minutes à 100°C puis placé dans de l'eau froide à 4°C. La lecture est effectuée à 420 nm. L'activité est exprimée en nmole de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine.

4- La saccharose:saccharose fructosyltransferase

Les tissus végétaux frais sont broyés dans un tampon d'extraction constitué de 10 mM de NaHSO₃, 1 mM de PMSF, 1 mM de 2-βmercaptoethanol, 0,1% (p/v) de PVP, 10 mM de mannitol, 0,02% (p/v) d'azide de sodium, 50 mM de NaAc pH5. L'homogénat est centrifugé 5 minutes à 15 000 x g (4°C). Trois cents microlitres de surnageant sont incubés 30 minutes sur glace en présence de 1,2 ml de (NH₄)₂SO₄ 100%. Le précipité est récupéré par centrifugation (5 minutes, 15 000 x g, 4°C) puis resuspendu dans 1 ml de (NH₄)₂SO₄ 80% et enfin recentrifugé sous les mêmes conditions afin de réduire les teneurs en sucres et fructosanes. Le précipité est repris dans 300 µl d'acétate de sodium 50 mM pH 5. L'extrait enzymatique est récupéré par dessalage sur une colonne de Sephadex G25 à l'aide d'une centrifugation (2 min, 800 x g).

L'activité enzymatique est mesurée après incubation durant deux heures à 30°C de 40 µl d'extrait brut, additionné de 40 µl de saccharose 125 mM dans de l'acétate de sodium 50 mM pH 5 et de 20 µl d'acétate de sodium 50 mM pH 5. La réaction est stoppée par chauffage à 100°C pendant 6 minutes. Le témoin de réaction est, quant à lui, placé directement à 100°C.

Les produits de réaction sont déterminés par HPLC (Dionex) par passage de 25 μ l de solution de réaction diluée avec 300 μ l d'azide de sodium 0,02% (p/v) durant 15 minutes en présence de 90 mM de NaOH et 25 mM d'acétate de sodium.

Les activités sont exprimées en nmole de 1-kestose produit. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéine.

5- La fructosane:fructosane fructosyltransférase

L'étape d'extraction est la même que celle utilisée pour la saccharose:saccharose fructosyl transférase.

La mesure d'activité s'effectue, quant à elle, avec 40 μ l d'extrait brut additionné de 50 μ l de 1-kestose (gracieusement procuré par le laboratoire de Biologie du Développement de Louvain), 10 μ l de MES 100 mM pH 6,25. Le mélange est incubé 2 heures sur glace puis placé à 100°C durant 6 minutes pour stopper la réaction. Le témoin réactionnel est incubé directement à 100°C.

Les produits de réaction sont déterminés par HPLC (Dionex) par passage de 25 μ l de solution de réaction diluée avec 300 μ l d'azide de sodium 0,02% (p/v) durant 15 minutes en présence de 90 mM de NaOH et 25 mM d'acétate de sodium.

Les activités sont exprimées en nmole de 1-nystose produit. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéine.

6- Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976) avec la serum albumine de boeuf comme protéine standard.

Vingt microlitres d'extrait brut sont mélangés à 1 ml de réactif (Biorad[®], Pharmacia[™]) dilué 5 fois. L'absorbance du complexe protéine - bleu de Coomassie est lue à 595 nm. Le bleu de Coomassie est un colorant sulfoné chargé négativement qui se fixe sur les radicaux libres NH_3^+ des arginines, des histidines, des lysines ou des groupements N terminaux.

III- Analyses biochimiques

1- Dosage du nitrate

Les divers échantillons sont lyophilisés durant 24 heures (Lyovac GT2 B enckiser Wassertechnik) afin de doser les nitrates selon la méthode de Cataldo *et al.* (1975). Dix milligrammes de matière sèche sont resuspendus dans 1 ml d'eau distillée et incubés une heure à 45°C. Après retour à température ambiante, le surnageant est récupéré par centrifugation (10 000 x g, 15 minutes, 4°C). Deux cents microlitres d'acide sulfosalicylique à 5% dans H₂SO₄ concentré sont ajoutés à 50 µl de surnageant et incubés 20 minutes à température ambiante. Après addition de 4,75 ml de NaOH 2 N, la mesure est effectuée à 410 nm. Les témoins sont composés de 200 µl de H₂SO₄ concentré et 50 µl d'extrait. Les teneurs en nitrate sont exprimées en µmole de nitrate.g⁻¹ de matière sèche.

2- Dosage des acides aminés

Ces dosages ont été réalisés par J.P. Boutin au laboratoire du Métabolisme et de la Nutrition des Plantes, INRA Versailles. Les acides aminés sont analysés par HPLC (Kontron HPLC System 400) en utilisant une post-colonne de dérivation fluorescent o-phtraldéhyde (Manh *et al.*, 1993).

3- Dosage des glucides intratissulaires

Les glucides intratissulaires ont été extraits selon la méthode de Van den Ende *et al.* (1996a).

Cinq cents milligrammes de tissus frais sont broyés dans 2 ml de tampon mannitol 10 mM additionné de 0,02% (p/v) d'azide de sodium pour éviter toute contamination. Le broyat est incubé 15 minutes à 90°C puis centrifugé 5 minutes à 15 000 x g (4°C). Cinq cents microlitres de surnageant sont ensuite déposés sur 2 colonnes superposées échangeuses d'ions Dowex H⁺ et Dowex Ac⁻. Les glucides sont élués par 6 ml d'eau distillée puis séchés sous vide durant une nuit. Après évaporation complète, les glucides sont dissous dans 500 µl d'eau distillée, puis dosés par passage, sur une colonne HPLC, de 25 µl de cette solution. L'éluion

se fait par un gradient linéaire de 20 mM d'acétate de sodium à 500 mM d'acétate de sodium dans 90 mM de NaOH durant 60 minutes, suivi d'une régénération de la colonne avec 1 M de NaOH pendant 10 minutes et un équilibrage de 20 minutes avec 90 mM de NaOH, 20 mM d'acétate de sodium. Les teneurs en glucides sont exprimées en $\mu\text{mole d'ose.g}^{-1}$ de matière fraîche.

4- Marquage *in situ* au ^{14}C Saccharose

Le transport des glucides et notamment du saccharose est analysé par l'intermédiaire du ^{14}C saccharose. Le mélange radioactif est composé de 0,1 μCi de ^{14}C saccharose additionné de saccharose 0,5 mM et de MES 0,02 M pH5. Après abrasion de la cuticule, 1 μl de ce mélange est déposé sur la feuille la plus âgée de la chicorée pour les stades 21, 35, 42, 49 jours et sur la seconde feuille apparue pour les stades 56 et 63 jours. Après 2 heures de contact, les plantules sont rincées et les organes végétaux sont séparés en trois parties : la feuille donneuse, la racine et les feuilles jeunes. Ces tissus sont ensuite placés dans 200 μl d'un tampon de "digestion" composé de H_2O_2 30%, Triton x 100 10%, HClO_4 (2 : 2 : 1) et incubés pendant 16 heures à 55°C pour permettre leur solubilisation. Après retour à température ambiante, 4 ml d'un liquide de scintillation (Aqualuma, Kontron Analytic) sont ajoutés aux tissus digérés afin de permettre le comptage en scintillation liquide avec un compteur à scintillation Beckman (LS2800 Analyser version 1.0). Les mesures sont effectuées entre 0 et 670 nm.

IV- Analyses moléculaires

1- Extraction et purification des ARN totaux

Les opérations d'extraction d'ARN s'effectuent à 4°C.

Les échantillons de chicorée sont congelés dans de l'azote liquide et broyés dans un mortier préalablement refroidi. Un gramme de poudre est rapidement mélangé avec 5 ml d'un tampon 0.1 M Tris-HCl, pH 7,5 contenant du thiocyanate de guanidium 4 M, un inhibiteur puissant des ribonucléases, et 1% (v/v) de 2- β mercaptoéthanol. Le mélange est agité puis centrifugé.

Le surnageant contenant les ARN est déprotéinisé par des extractions au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (24-24-1) suivies d'une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (24-1) afin d'éclaircir la phase aqueuse et d'éliminer toute trace de phénol.

La phase aqueuse contenant les ARN est collectée, mélangée avec 0,75 volume d'éthanol refroidi et 0,08 volume d'acide acétique 1 N, puis conservée une nuit à -20°C.

Les ARN précipités sont sédimentés par centrifugation et les culots sont redissous dans 4 ml d'un tampon 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, contenant 0,1 mM NaCl, 1 mM EDTA et 0,5% de (p/v) N-laurylsarcosine de sodium.

Les culots obtenus après une nouvelle précipitation par de l'éthanol sont dissous dans 300 µl d'un tampon Tris-HCl/EDTA (10 mM : 0,1 mM, pH 8).

Les ARN sont alors purifiés, durant une nuit, par traitement au chlorure de lithium 4 M qui solubilise sélectivement à forte concentration les acides nucléiques bicaténaires et précipite les ARN. Après centrifugation, les culots d'ARN sont lavés par de l'éthanol à 80%, séchés et dissous dans de l'eau stérile déionisée.

Un gel de contrôle est effectué à cette étape afin de vérifier la disparition totale de l'ADN.

Après dissolution dans de l'eau stérile, la concentration en ARN est mesurée à 260 nm. Les échantillons sont aliquotés et conservés à -20°C.

2- Séparation électrophorétique

Les ARN sont fractionnés en fonction de leur masse moléculaire en présence d'agents dénaturants de type formaldéhyde et formamide (Lehrach *et al.*, 1977) dans un gel horizontal d'agarose 1,2% (p/v). Dix microgrammes d'ARN sont préalablement chauffés à 65°C en présence de formaldéhyde (2,2 M final) et de 50% (v/v) de formamide dans le tampon MOPS x 10 pour un volume final de 40 µl.

Les échantillons sont additionnés de 6% (v/v) de tampon de charge (EDTA 1 mM, glycérol 50% (v/v) , xylène cyanol 0,4% (v/v), bleu de bromophénol 0,4% (p/v) avant leur dépôt sur le gel. La migration a lieu dans le tampon MOPS x 1 contenant de la formaldéhyde (0,22 M final).

3- Transfert par Northern blot

Les acides nucléiques séparés sur gel d'agarose sont transférés par capillarité sur des membranes de Nylon (Amersham). Le transfert des ARN est effectué selon la technique de Southern (1975) adaptée pour les ARN par Thomas (1980). Il a lieu pendant 72 heures dans le tampon 20 x SSPE (Na_2HPO_4 200 mM, NaCl 3,6 M, Na_2EDTA 20 mM pH 7,5). Les ARN sont fixés de façon covalente sur les membranes par irradiation aux ultraviolets (254 nm) pendant 4 minutes.

4- Marquage et purification des sondes

Les ADN utilisés comme sonde sont marqués au ^{32}P par extension d'amorce selon la technique de synthèse aléatoire décrit par Feinberg et Vogelstein (1984) à l'aide du Kit " T7 Quick prime " de Pharmacia.

Un aliquot d'ADN (50 ng) est dilué avec un tampon TE (Tris-HCl, Na_2EDTA) dans un volume final de 34 μl . Après dénaturation (5 minutes à 100°C) et refroidissement (5 minutes sur glace), la réaction de marquage s'effectue à 37°C pendant 45 minutes en présence de 4 μl de l'isotope radioactif (50 μCi de dCTP ^{32}P 3000 Ci/mmol) , 0,5 μl d'ADN polymérase du bactériophage T7 (4-8 U/ μl), 10 μl de mélange réactionnel et 1,5 μl d'eau stérile.

L'ADN marqué est purifié sur Sephadex G-50 par centrifugation (4 minutes, 800 x g). Les nucléotides marqués, non incorporés lors de la polymérisation, sont retenus dans la colonne.

5- Hybridations moléculaires

Les membranes, préalablement humidifiées dans le 2 x SSPE, sont mises dans un tampon de préhybridation constitué de SDS 5% (p/v), de Na_2HPO_4 0,25 M, BSA 1% (p/v) durant 4 heures à 60°C. Elles sont ensuite hybridées pendant 15 heures à la même température dans le mélange de préhybridation frais additionné de la sonde radioactive (IV.4.) dénaturée (5 minutes à 100°C). L'excès de sonde et les hybridations non spécifiques sont ensuite éliminés par plusieurs lavages successifs de 15 minutes dans un tampon (SDS 1% (p/v), Na_2HPO_4 0,02 M) à la température de l'hybridation.

Différentes sondes ont été employées :

- la sonde NR correspondant à un ADNc partiel de la nitrate réductase de *Cichorium intybus* obtenu par notre laboratoire (X 84102 EMBL Data Library, Palms *et al.*, 1996),

- la sonde TUB correspondant à l'ADNc de l' α -tubuline de *Daucus carota* (Borkid et Sung, 1985),

- la sonde INV correspondant à un fragment PCR de l'invertase acide de *Cichorium intybus*

- la sonde SST correspondant à un fragment PCR de la saccharose:saccharose fructosyltransférase de *Cichorium intybus*.

Ces deux dernières nous ont été fournies par le laboratoire de Biologie du Développement (Louvain, Belgique).

V- Analyses photosynthétiques

L'analyse des capacités photosynthétiques consiste à mesurer les niveaux de fluorescence du photosystème II au moyen du fluorimètre PAM (Pulse Amplitude Modulation), cette méthode est non destructive.

Le fluorimètre permet de mesurer le rendement de la fluorescence à l'aide d'une lumière détectrice à basse énergie grâce à un guide optique à cinq branches convergentes. La lumière actinique utilisée pendant les mesures des réponses aux éclairs n'est pas saturante afin de ne pas masquer l'effet de ces derniers en fermant les centres photochimiques du PSII. La méthode de travail adoptée est celle du double éclairage. Nous avons choisi d'émettre des éclairs de 2 secondes espacés de 60 secondes. La fluorescence modulée est mesurée par excitation à 650 nm à l'aide d'une diode électroluminescente (LED type USBR, Stanley) produisant des éclairs d'une durée de 1 μ s aux fréquences de 1,6 kHz ou 100 kHz. Un filtre (DT Cyan, Balzers) élimine l'émission de la lumière au delà de 600 nm. Le détecteur est fait d'une PIN-photodiode (type S1723, Hamamatsu), protégée de la lumière modulée excitatrice par un filtre (RG9, Schott). La lumière excitatrice et la fluorescence sont conduites par un guide optique "Schott" de 8 mm de diamètre. Le PAM est relié à l'émetteur-détecteur et transforme le signal lumineux en signal électrique enregistrable. L'acquisition des données a été réalisée par ordinateur (de type PC) muni d'une carte d'acquisition.

Divers niveaux de fluorescence du PSII sont mesurés :

- La F_o , fluorescence fixe ou niveau minimal de fluorescence est mesurée à l'aide d'une faible lumière modulée détectrice ($0,025 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) à 1,6 kHz, les végétaux étant préalablement maintenus 15 minutes à l'obscurité afin que tous les centres photochimiques soient ouverts.

- La F_m , fluorescence maximale, est mesurée en donnant des éclairs saturants de $1500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durant 2 secondes. Cette intensité et cette durée ont été fixées expérimentalement en s'assurant que la saturation lumineuse est atteinte et que le rendement de la fluorescence est donc maximal.

- La F_s , fluorescence stationnaire, est atteinte après l'application d'une lumière actinique et non saturante pendant une quinzaine de minutes.

- La F_v , fluorescence variable, est obtenue selon le calcul suivant : $F_v = F_m - F_o$

- Des fluorescences instantanées, F_o' , F_m' , F_s' , sont mesurées sans période de repos.

VI- Analyses histologiques

1- Inclusion en résine JB4

Les racines sont fixées dans un mélange FAA composé de 50 ml d'éthanol 50% (v/v), 3,25 ml de formaldéhyde 37% (v/v) et 1,75 ml d'acide acétique glacial. La fixation est réalisée sous vide à 4°C durant 24 à 72 heures en renouvelant une fois le fixateur.

Les racines sont ensuite déshydratées progressivement dans deux bains successifs de 10 minutes d'éthanol à des concentrations croissantes de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% et 95%. Les échantillons sont alors placés dans une solution d'infiltration (solution A + C, kit JB4 Polysciences), cette étape a lieu à 4°C sous vide durant 4 jours en renouvelant régulièrement la solution. L'inclusion est réalisée à l'aide d'une solution fraîche d'infiltration additionnée d'un catalyseur (kit JB4 Polysciences). La polymérisation s'effectue à température ambiante et à l'obscurité durant 3 heures.

Les coupes de 3 μm d'épaisseur sont réalisées à l'ultramicrotome (Leica).

2- Analyses histologiques

Afin de visualiser les différentes structures racinaires, les coupes minces sont colorées au bleu de toluidine (0,5% (p/v) dans H₂O) durant 30 secondes puis rincées à l'eau distillée. Les coupes sont montées sur lame et photographiées avec un boîtier Olympus SC 35 type 12 monté sur un microscope Olympus BH-2. Un filtre bleu est disposé sur la lampe d'éclairage du microscope.

RESULTATS

- Etude de la mise en place de la tubérisation -



Planche A : A = Culture de chicorée sur perlite.

B = Morphologie des plants de chicorée à différents stades de croissance (1 : 21 jours; 2 : 35 jours; 3 : 42 jours; 4 : 49 jours; 5 : 56 jours; 6 : 63 jours).

I- La mise en place de la tubérisation de la chicorée

Des graines de *Cichorium intybus* var. Witloof cv TURBO sont mises à germer sur un milieu inerte, la perlite, et arrosées quotidiennement avec une solution de Heller (1953). Notre étude débute 21 jours après l'émergence des cotylédons et se termine au soixante-troisième jour de culture (Planche A).

1- Etude morphologique

A chaque prélèvement (21, 35, 42, 49, 56 et 63 jours), nous avons effectué un dénombrement des feuilles ainsi qu'une mesure de la longueur des racines principales, des feuilles les plus jeunes et du diamètre du collet racinaire (tableau 1).

Jours	Longueur de la racine principale (en mm)	Diamètre du collet (en mm)	Nombre de feuilles	Longueur de la feuille juvénile (en cm)
21	5,5 ± 0,4	1,0 ± 0,1	3	6,2 ± 1,2
35	9,3 ± 1,2	2,3 ± 0,3	5	15,5 ± 2,3
42	10,7 ± 0,9	3,1 ± 0,2	6	22,8 ± 3,1
49	12,6 ± 1,3	4,7 ± 0,2	7	23,6 ± 2,1
56	15,5 ± 0,8	5,8 ± 0,4	8	35,3 ± 4,3
63	17,6 ± 1,4	7,2 ± 0,3	9	40,4 ± 3,8

Tableau 1 : Evolution morphologique de la chicorée au cours du développement en culture hors-sol sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de quatre répétitions indépendantes.

Les racines principales présentent une croissance régulière durant l'expérimentation. Le premier effet observable de la mise en place de la tubérisation est l'accélération de l'épaississement du collet racinaire, c'est-à-dire la croissance radiale, à partir du quarante-neuvième jour. En effet, entre les quarante-deuxième et soixante-troisième jours, nous observons un doublement du diamètre du collet.

A chaque semaine de culture correspond l'émergence d'une nouvelle feuille. Le bouquet foliaire devient toutefois plus important à partir de la sixième semaine de culture (quarante-deuxième jour), puisque la taille de la plus jeune feuille qui est la dernière apparue, a pratiquement triplé en trois semaines.

2- Etude de la croissance

Pour analyser la croissance des plantules de chicorée, deux paramètres ont été choisis :

- la masse de matière fraîche
- la masse de matière sèche

La masse de matière fraîche des racines augmente lentement durant les six premières semaines. Par contre, dès le quarante-deuxième jour, celle-ci va être multipliée par sept en trois semaines (figure 1a). La masse de matière fraîche de la partie aérienne augmente rapidement, elle aussi, à partir de la sixième semaine. Cet accroissement va représenter au jour 63 environ 850% de la teneur au jour 42 (figure 1b).

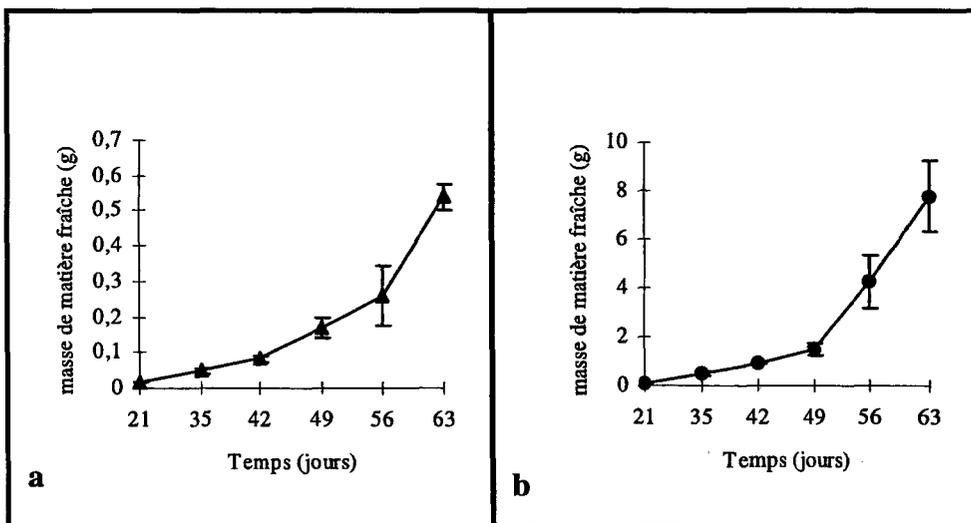


Figure 1 : Mesure de la masse de matière fraîche des racines (a) et des feuilles (b) de chicorée durant les soixante-trois premiers jours de culture sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de quatre répétitions indépendantes.

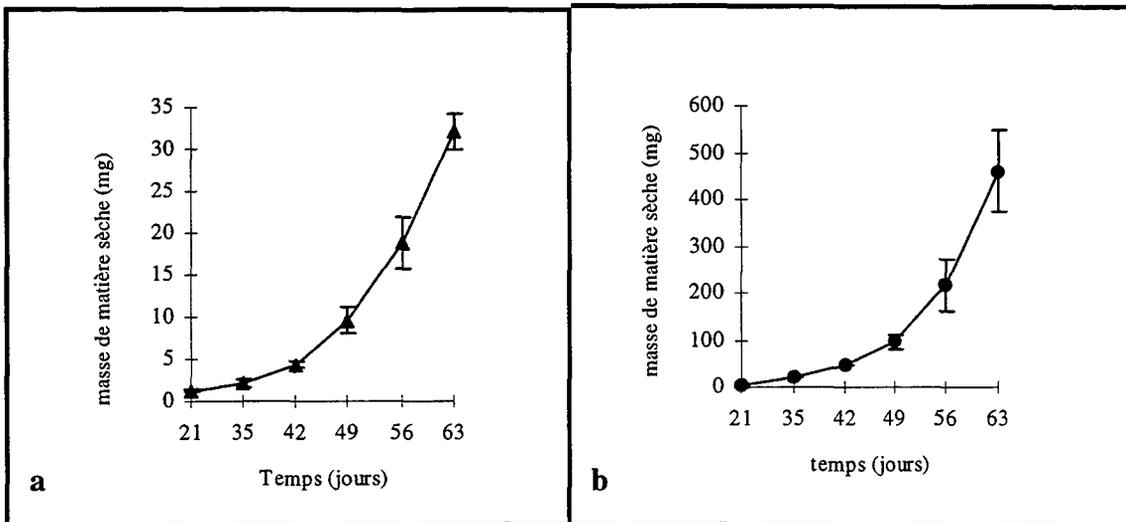


Figure 2 : Evolution de la masse de matière sèche des racines (a) et des feuilles (b) de chicorée durant les soixante-trois premiers jours de culture sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de quatre répétitions indépendantes.

La masse de matière sèche suit la même évolution (figures 2 a, b). Ainsi, la teneur en eau (voisine de 95%) est relativement stable.

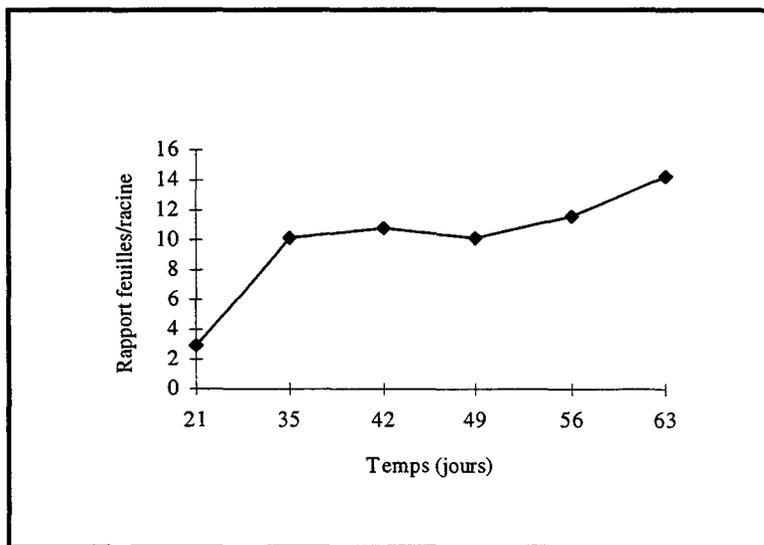


Figure 3 : Rapport de la masse de matière sèche des feuilles et de la masse de matière sèche des racines durant les soixante-trois premiers jours de culture sur perlite

L'augmentation de la taille des feuilles notée précédemment est confirmée par l'analyse du rapport des masses de matière sèche entre les feuilles et les racines (figure 3). En effet, dès le quarante-neuvième jour, le rapport augmente à nouveau indiquant l'importance du

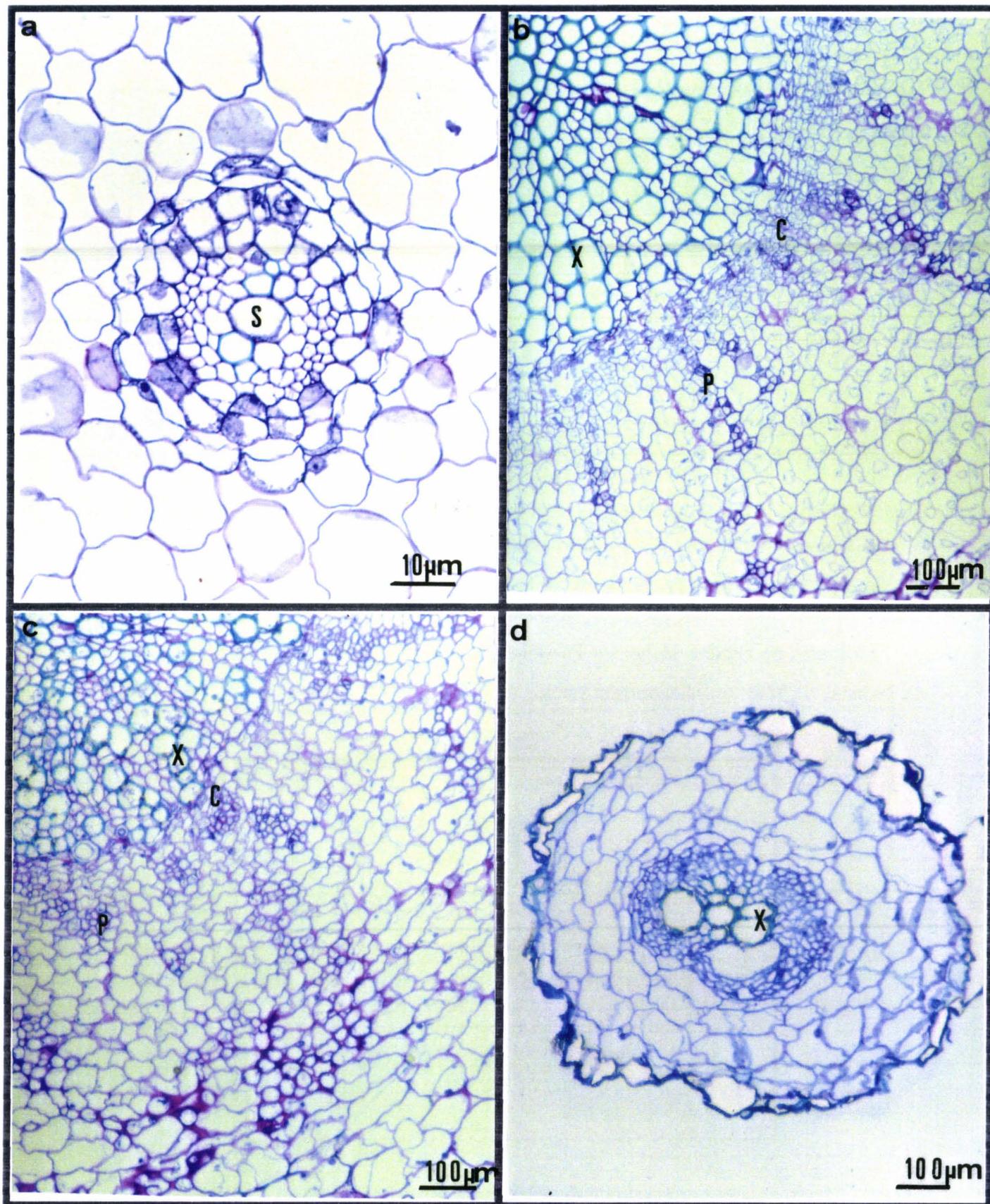


Figure 4 : Coupes transversales de racines de chicorée

a : plante âgée de 21 jours

b : au niveau du collet de la racine d'une plante âgée de 42 jours

c : au niveau médian de la racine d'une plante âgée de 42 jours

d : au niveau de l'apex de la racine d'une plante âgée de 42 jours

(X : xylème; P : phloème; C : cambium; S : stèle)

développement du bouquet foliaire, c'est-à-dire l'accroissement du nombre de feuilles et la forte augmentation de la taille des nouvelles feuilles apparues, par comparaison avec le développement de la racine.

3- Etude histologique

Les modifications morphologiques décrites précédemment nous permettent de positionner les mécanismes de la mise en place de la tubérisation aux alentours du quarante-deuxième jour. Il nous fallait, cependant, déterminer un paramètre susceptible de rendre compte de l'apparition de cette croissance radiale. L'épaississement d'une racine est corrélé à la mise en place de l'assise cambiale. Nous avons donc décidé d'effectuer une étude histologique comparative de la structure de la racine aux vingt et unième et quarante-deuxième jours de culture.

L'observation des coupes transversales du collet racinaire des jeunes plantes (21 jours) montre que seuls les tissus primaires (protoxylème et protophloème) sont présents (figure 4a). Chez une plante de 42 jours, une assise cambiale est présente au niveau du collet ainsi que dans la région médiane de la racine soit à environ 5 cm du collet (figures 4b, c). La région apicale des racines de ces mêmes plantes ne laisse apparaître aucune formation secondaire (figure 4d). Ces résultats indiquent l'existence du cambium dès la sixième semaine de culture, se développant de l'apex vers le collet.

4- Conclusion

Les différentes études concernant le développement des chicorées montrent que celles-ci présentent une croissance relativement lente au début de la phase de croissance végétative quel que soit l'organe observé. L'accélération de la croissance se situe aux alentours du quarante-deuxième jour. L'étude histologique confirme l'apparition d'une assise cambiale, responsable de la croissance radiale racinaire, chez les plantes prélevées à cette période. Tout ceci nous permet de conclure que les mécanismes menant à la mise en place de la tubérisation sont probablement présents vers le quarante-deuxième jour de culture.

II- L'assimilation du nitrate chez la chicorée

Des travaux effectués en champ ont montré que l'activité nitrate réductase des racines diminuait au cours de la tubérisation, celle-ci était alors localisée dans les feuilles vertes de la rosette (Dorchies et Rambour, 1985). Nous avons voulu savoir si ce phénomène était observable dans nos conditions de culture hors-sol. L'étude de l'activité enzymatique de la nitrate réductase et l'analyse de l'expression du gène *nia* ont été effectuées.

1- Effet de la photopériode sur l'activité nitrate réductase

Etant donné que la nitrate réductase présente une régulation par la lumière, la première étape dans l'étude de l'assimilation azotée a été de déterminer l'activité maximale de réduction des nitrates au cours de la journée. Cette donnée a permis de déterminer la période de prélèvement des plantes pour nos études ultérieures.

A cet effet, nous avons mesuré l'activité nitrate réductase *in vivo* dans les racines et les feuilles des jeunes plantules âgées de trois semaines cultivées en chambre de culture sous une photopériode 12 heures/12 heures (lumière/obscurité). Les mesures ont été effectuées à l'obscurité puis à intervalles réguliers lors de l'exposition à la lumière (figure 5).

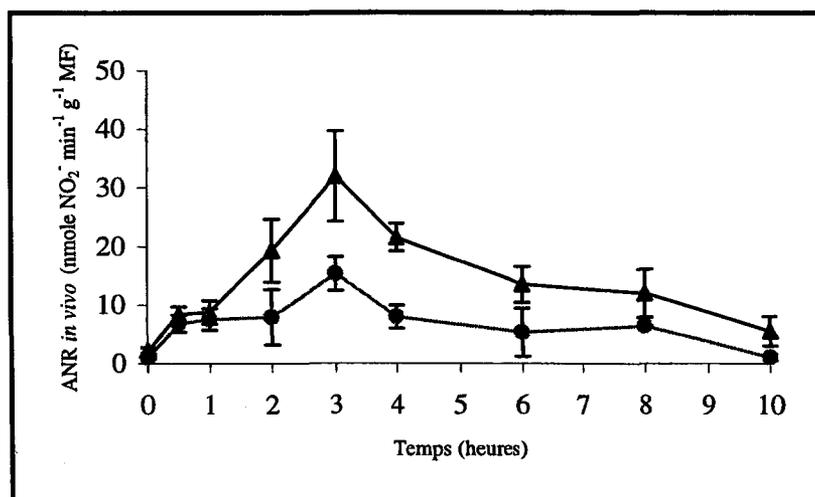


Figure 5 : Effet de la lumière sur l'ANR *in vivo* des racines (▲) et des feuilles (●) de chicorée. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de trois répétitions indépendantes.

A l'obscurité (t_0), l'expression de la nitrate réductase dans les racines et les feuilles est très faible (2,26 et 1,03 $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ respectivement). Nous observons une augmentation de l'activité enzymatique après 30 minutes d'exposition à la lumière. En effet, les activités sont respectivement multipliées par 4 et 6 dans les racines et les feuilles. Cette hausse se poursuit et atteint son maximum après 180 minutes d'exposition lumineuse dans les deux organes (32,00 et 15,36 $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ respectivement dans les racines et les feuilles).

Cette analyse a permis de conclure que l'activité nitrate réductase est maximale 3 heures après l'exposition des chicorées à la lumière. Tous les prélèvements ont ensuite été effectués à cette période afin d'optimiser nos résultats.

2- Evolution de l'activité nitrate réductase lors du développement

Les activités nitrate réductase ont été mesurées selon deux méthodes :

- la méthode de dosage *in vivo*
- la méthode de dosage *in vitro*

2.1- Activité nitrate réductase *in vivo*

La technique de dosage est réalisée avec un apport de nitrate exogène au cours de l'incubation. L'utilisation de propanol modifie la perméabilité des membranes et permet la pénétration du substrat dans les tissus. De nombreuses critiques ont ainsi été faites à l'encontre de ce protocole expérimental. Cependant, des études réalisées au laboratoire ont montré que l'addition du propanol ne modifiait pas l'activité nitrate réductase mesurable dans les tissus de la chicorée (Dorchies, 1984).

L'activité nitrate réductase montre de fortes variations au cours du développement (figure 6).

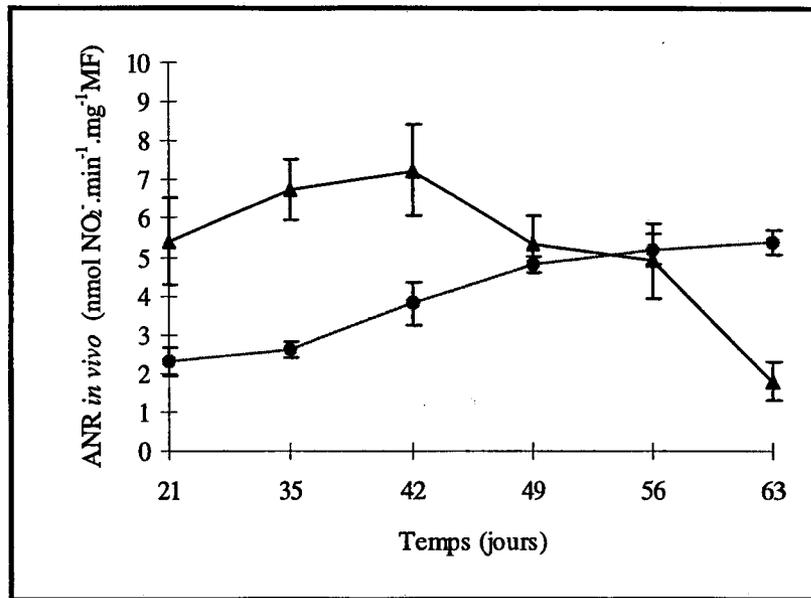


Figure 6 : ANR *in vivo* dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de cinq répétitions indépendantes.

L'activité enzymatique mesurée dans les racines augmente jusqu'au quarante-deuxième jour (7,2 nmol NO₂⁻.min⁻¹.g⁻¹MF). Celle-ci diminue ensuite régulièrement au cours des semaines suivantes. Par contre, l'activité dans les feuilles augmente progressivement au cours du développement de la chicorée jusqu'à atteindre 5,2 nmol NO₂⁻.min⁻¹.g⁻¹MF au soixante-troisième jour de culture. Ainsi, l'activité de réduction des nitrates a principalement lieu dans les racines durant les sept premières semaines puis elle est prise en charge par l'appareil foliaire.

2.2- Activité nitrate réductase *in vitro*

L'activité nitrate réductase *in vitro* est mesurée en présence de quantités non limitantes de nitrate, de NADH et de FAD. L'activité enzymatique dépend ainsi de la concentration en protéine nitrate réductase. Cependant, l'activité de la protéine nitrate réductase est modulée par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation comme nous l'avons évoqué lors de l'étude bibliographique (II 4.2).

L'addition d'EDTA dans le tampon de mesure libère la liaison entre la protéine nitrate réductase phosphorylée et la protéine inhibitrice (NIP) permettant la mesure de l'activité nitrate réductase extraite totale (figure 7a). A l'inverse, l'activité de la forme phosphorylée de

la nitrate réductase est inhibée en présence de Mg^{2+} par l'interaction entre la protéine phosphorylée et la protéine inhibitrice (MacKintosh *et al.*, 1995). L'activité alors mesurée représente la contribution des seules formes non complexées. Elle correspondrait à l'activité nitrate réductase mesurée *in vivo* (figure 7b) puisqu'elle présente un même profil ainsi que des valeurs de même ordre de grandeur que cette dernière.

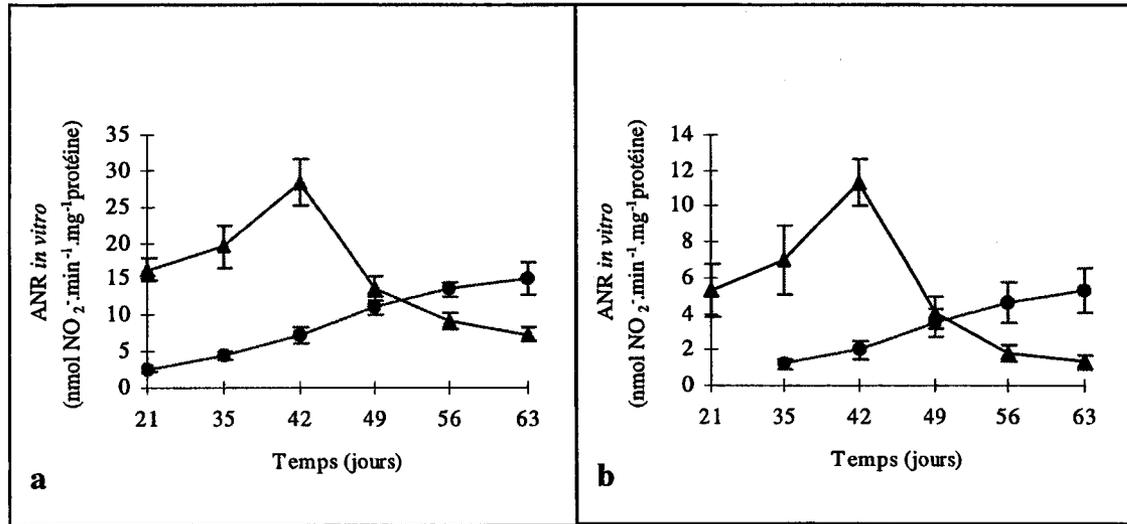


Figure 7 : ANR *in vitro* dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée en présence d'EDTA (a) et $MgCl_2$ (b) entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de trois répétitions indépendantes.

Les mesures effectuées dans les deux conditions (EDTA, $MgCl_2$) confirment les résultats obtenus précédemment avec la technique de dosage *in vivo*. La réduction des nitrates est racinaire au cours des sept premières semaines de culture puis foliaire. L'activité nitrate réductase racinaire est maximale à 42 jours et correspond respectivement à 28,4 et 11,3 $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéine en présence d'EDTA et de $MgCl_2$.

L'activité nitrate réductase foliaire est maximale à 63 jours et représente, en présence d'EDTA, 15,2 $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéine ainsi que 5,3 $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéine en présence de $MgCl_2$. Il faut cependant noter que l'activité nitrate réductase en présence de magnésium n'est pas détectable dans l'appareil aérien de plantules âgées de trois semaines.

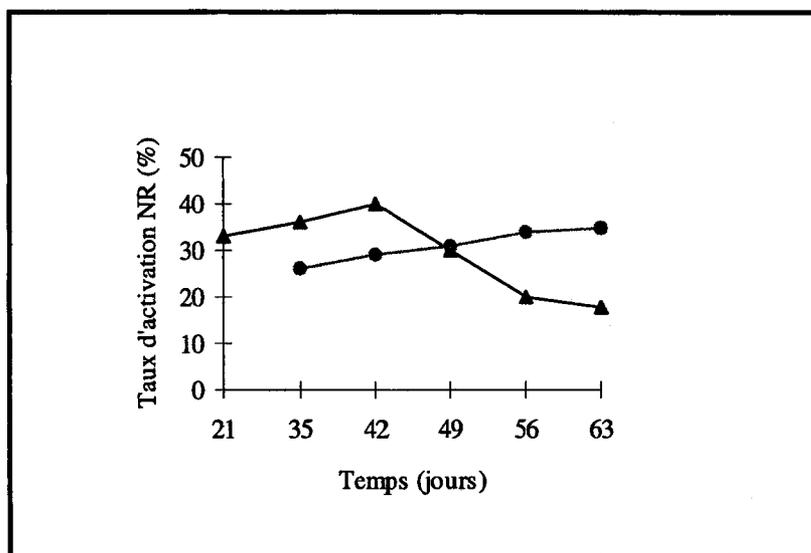


Figure 8 : Taux d'activation de la nitrate réductase dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite.

L'état d'activation de la nitrate réductase peut se déterminer en comparant l'activité *in vitro* obtenue en présence de $MgCl_2$ et celle obtenue en présence d'EDTA (figure 8). Nous remarquons que le taux d'activation augmente légèrement entre le quarante-deuxième et le cinquante-sixième jour puis chute rapidement pour ne plus représenter que 18% dans les racines au soixante-troisième jour. Par contre, le taux d'activation dans les feuilles croît continuellement jusqu'à la neuvième semaine (35%).

2.3- Teneur en nitrate

Il est bien établi que le nitrate induit l'activité nitrate réductase chez de nombreuses plantes ainsi que chez la chicorée (Palms *et al.*, 1996). Nous avons voulu vérifier si les teneurs en nitrate tissulaire correspondaient aux modifications de l'activité nitrate réductase chez la chicorée lors de son développement (figure 9).

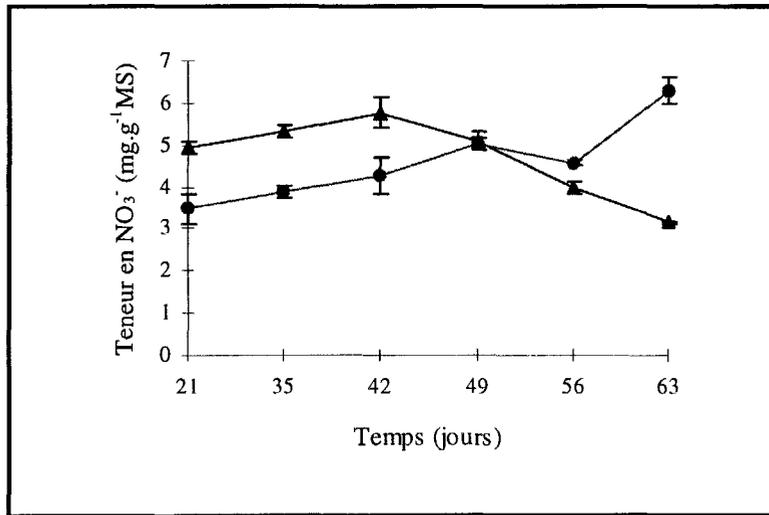


Figure 9 : Evolution de la teneur en nitrate de racines (▲) et de feuilles (●) de chicorée entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de quatre répétitions indépendantes.

Pendant les six premières semaines, les teneurs en nitrate augmentent régulièrement dans les racines et les feuilles (respectivement 5,8 et 4,3 mg NO₃⁻.g⁻¹ MS au jour 42). Celles-ci vont alors chuter dans les racines alors qu'elles continuent à croître dans les feuilles pour atteindre 6,3 mg NO₃⁻.g⁻¹ MS au soixante-troisième jour.

3- Expression du gène *nia*

Afin de vérifier si les modifications de l'assimilation du nitrate sont dues à une modulation de la transcription du gène *nia*, nous avons procédé à une hybridation de la sonde NRS de chicorée sur les ARN totaux extraits des racines et des feuilles prélevées aux différents stades de développement (figure 10).

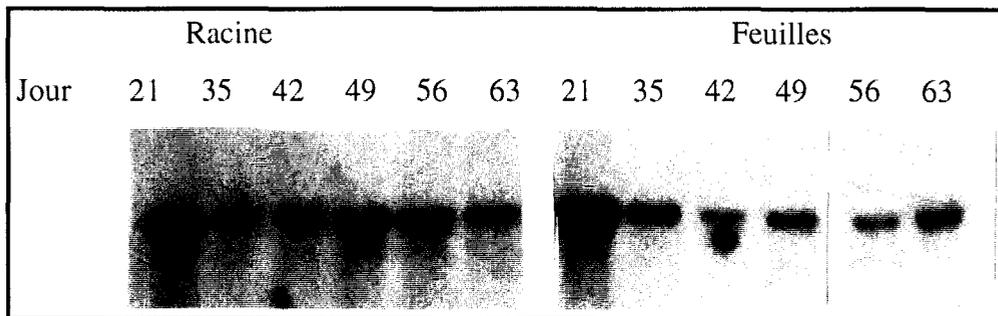


Figure 10 : Analyse par Northern blot de la transcription du gène *nia* de racines et de feuilles de chicorée.

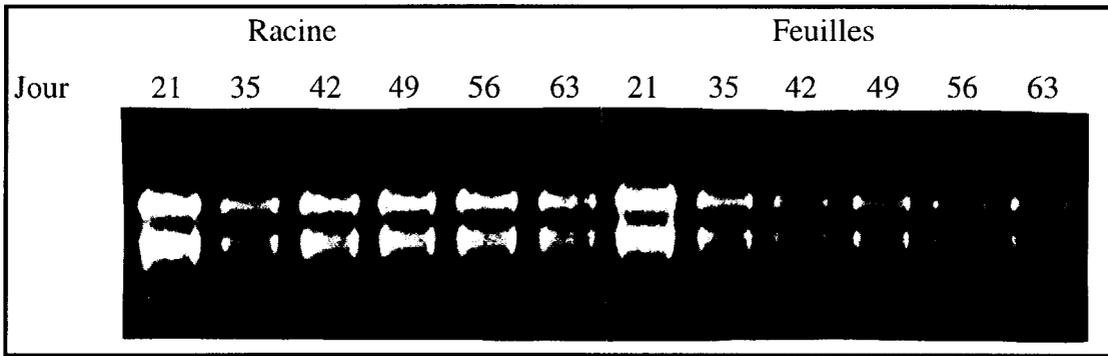


Figure 11 : Contrôle des quantités des ARN totaux déposés pour chaque échantillon par coloration au BET.

L'intensité relative des signaux d'hybridation du gène *nia* ainsi que les quantités d'ARNr déposées (figure 11) sont estimées après numérisation puis comparées (tableau 2).

Jours	21	35	42	49	56	63
R	1,00	0,98	1,12	0,92	0,92	1,08
F	1,05	0,85	0,98	0,95	0,93	0,95

Tableau 2 : Evolution des quantités d'ARNm *nia* dans des racines (R) et des feuilles (F) de chicorée. Les valeurs sont exprimées par rapport aux quantités d'ARNr déposées.

Nous constatons que les teneurs en ARNm *nia* ne sont pas modifiées significativement au cours de l'expérimentation quel que soit l'organe étudié (10% de variation). Dans notre cas, il semble donc que les fluctuations de l'activité nitrate réductase ne sont pas reliées à une régulation transcriptionnelle du gène *nia*.

Un effet post-transcriptionnel ou post-traductionnel peut être alors envisagé. De plus, les teneurs en ARNm *nia* sont pratiquement identiques dans les racines et dans les feuilles ce qui montre bien qu'une régulation post-transcriptionnelle opère.

4- Evolution de la teneur en acides aminés

L'inhibition de l'activité nitrate réductase par addition d'acides aminés a été largement décrite (Oaks, 1994, Li *et al.*, 1995, Sivasankar et Oaks, 1995). Afin de vérifier si le changement progressif de la localisation de la réduction des nitrates est corrélé à une modification de la teneur en acides aminés, nous avons décidé de déterminer le contenu en

Teneurs (nmol.mg ⁻¹ MS)	21 jours		35 jours		42 jours		49 jours		56 jours		63 jours	
	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F
Glu	7,36	20,32	9,55	19,22	12,34	21,00	12,75	18,75	18,73	17,51	16,56	20,45
Gln	4,72	5,64	5,47	4,86	5,28	13,01	6,17	6,36	10,21	9,08	8,78	12,44
Asp	5,31	9,95	7,52	7,43	8,08	7,66	8,07	6,26	11,25	7,60	8,85	6,22
Asn	1,76	1,86	1,40	2,59	1,48	10,40	1,55	1,87	2,87	4,92	2,18	5,21
Gly	0,44	1,64	0,63	0,95	0,83	1,11	1,26	0,54	0,93	0,82	0,93	0,96
Ser	2,64	9,10	3,20	8,88	3,96	9,87	3,93	8,42	5,49	6,51	5,65	8,22
Arg	0,14	0,24	0,30	0,36	0,30	0,83	0,36	0,22	0,53	0,33	0,30	0,71
Orn	0,12	0,17	0,21	0,05	0,17	0,12	0,11	0,14	0,19	0,25	0,10	0,18
Pro	1,21	0,81	0,60	0,67	0,80	3,23	0,86	0,83	2,30	0,71	2,01	1,17
Thr	0,69	1,42	0,83	1,32	1,08	1,68	1,03	1,28	1,87	1,38	1,23	1,41
Ile	0,21	0,32	0,19	0,32	0,23	0,48	0,18	0,25	0,34	0,31	0,20	0,13
Val	0,32	0,48	0,36	0,42	0,39	0,63	0,41	0,29	0,70	0,55	0,52	0,45
Leu	0,27	0,41	0,28	0,41	0,31	0,50	0,24	0,28	0,48	0,24	0,31	0,28
Ala	1,00	4,09	1,09	3,29	0,94	4,67	1,02	3,67	1,15	3,45	0,78	3,25
His	0,04	0,10	0,12	0,07	0,11	0,12	0,13	0,10	0,30	0,30	0,40	0,14
Lys	0,25	0,29	0,36	0,30	0,30	0,41	0,27	0,29	0,59	0,41	0,26	0,30
Phe	0,16	0,23	0,08	0,26	0,13	0,26	0,14	0,23	0,36	0,43	0,17	0,16
Gaba	0,50	1,57	0,40	1,62	0,39	2,78	0,39	2,18	0,59	1,71	0,57	2,47
a.a. totaux	27,16	58,63	32,55	53,01	37,13	78,77	38,86	51,97	58,88	56,54	49,81	64,14

Tableau 3 : Evolution des teneurs en acides aminés dans les racines (R) et les feuilles (F) de chicorée entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite.

acides aminés libres des racines et des feuilles provenant de plantules prélevées au cours de la cinétique de croissance (tableau 3).

Sur l'ensemble des dix-huit acides aminés dosés dans les racines, seuls le glutamate, la glutamine, l'aspartate, l'asparagine, la glycine et la sérine présentent des modifications de leurs teneurs au cours de la cinétique de croissance.

La glutamine, le glutamate et l'aspartate représentent environ 65% des acides aminés totaux de la racine au vingt et unième jour. En y ajoutant l'asparagine, la glycine et la sérine, nous obtenons 80% des acides aminés totaux. Dès le trente-cinquième jour, les quantités de glutamine, glutamate et aspartate constituent 70% des acides aminés totaux. Après 56 jours de culture, la teneur de ces six acides aminés a doublé. Au cours de la dernière semaine, nous observons une légère baisse des teneurs globales en acides aminés. Celle-ci peut provenir de la baisse de l'activité de réduction des nitrates dès le quarante-neuvième jour. Nous pouvons aussi noter que la teneur en arginine est très faible et ce quelle que soit la date de prélèvement.

Dans les feuilles, seuls la glutamine, l'aspartate et l'asparagine fluctuent lors du développement des plantes. Ainsi, les teneurs en glutamine et asparagine ont respectivement doublé et triplé alors que la quantité d'aspartate a chuté de 38% au jour 63. Les teneurs en glutamate, glycine et sérine restent relativement stables. Durant la cinétique de croissance, l'ensemble de ces acides aminés représente environ 80% des acides aminés totaux. Les teneurs en sérine et en alanine présentent des niveaux très élevés comparativement aux racines. Ceci pourrait être corrélé à l'activité photosynthétique et donc à la photorespiration puisque la sérine est l'un des acides aminés produit par ce métabolisme.

5- Conclusion

Les dosages d'activité nitrate réductase effectués à différentes périodes de croissance des chicorées montrent, quelle que soit la méthode utilisée, une modification de la localisation de la réduction des nitrates. Ainsi, lors des premières semaines de cultures (6 semaines), la nitrate réductase est principalement active dans les racines puis, au cours des semaines suivantes le bouquet foliaire devient le lieu majeur de réduction. L'analyse de la transcription du gène *nia* de chicorée ne révèle cependant aucune modification dans son expression.

En vue d'étudier une possible régulation par les métabolites, nous avons suivi l'évolution des teneurs en nitrate et en acides aminés libres dans les racines et les feuilles. Les teneurs en nitrate accompagnent étroitement les activités de réduction. L'étude des principaux acides aminés impliqués dans les premières réactions de l'assimilation de l'azote montre que la quantité de glutamine augmente dans les organes lors du développement des plantules. Par ailleurs, les acides aminés stockés dans la racine tubérisée mature de chicorée, en particulier l'arginine (Limami *et al.*, 1993), ne sont pas encore mis en réserve à ce stade de développement.

III- L'assimilation carbonée chez la chicorée en voie de tubérisation

Chez les végétaux, l'assimilation de l'azote est étroitement liée au métabolisme carboné, générateur d'énergie (ATP), de pouvoir réducteur (NADH, NADPH) et de squelettes carbonés. La mise en place de la tubérisation de la racine de chicorée se caractérisant par une accumulation de fructosanes (Fiala et Jolivet, 1984), il est donc important d'étudier l'évolution du métabolisme du saccharose à ce stade de développement.

Nous nous sommes intéressés à diverses enzymes intervenant dans la voie d'assimilation du saccharose aux différents stades de développement de la chicorée.

1- L'assimilation du saccharose dans la plante

1.1- L'activité invertase acide

L'invertase acide permet l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose. Cette enzyme est généralement active dans les tissus jeunes ou en voie de développement (Morris et Arthur, 1985; Berghall, 1997).

L'activité de l'invertase acide a été suivie durant soixante-trois jours dans les plantules de chicorée cultivées sur perlite (figure 12).

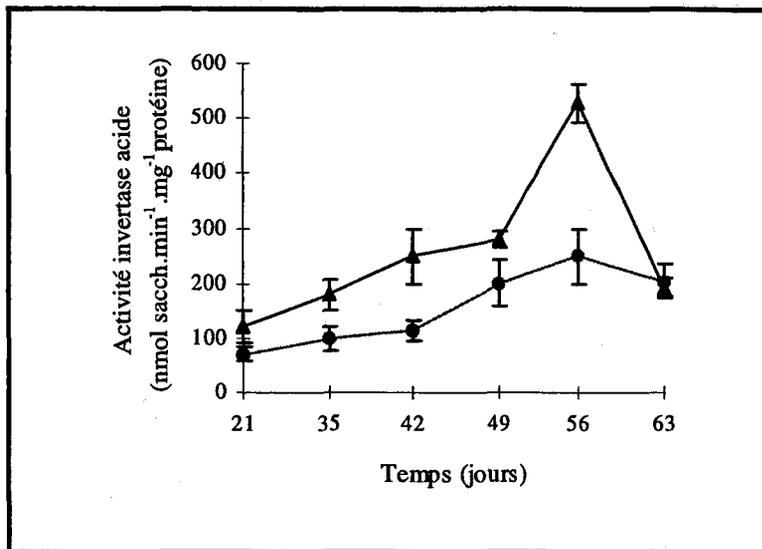


Figure 12 : *Activité invertase acide in vitro dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de quatre répétitions indépendantes.*

Nous constatons que l'activité augmente jusqu'au cinquante-sixième jour pour les deux organes atteignant respectivement 528,5 et 249,9 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine dans les racines et dans les feuilles. Au soixante-troisième jour, une chute des activités se produit notamment dans la racine où l'activité est estimée à 192,83 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine.

1.2- L'activité invertase neutre

L'invertase neutre est présente dans les organes dont la croissance est ralentie (Masuda, 1988). Elle intervient dans l'accumulation du saccharose dans la racine tubérisée de betterave (Berghall, 1997).

L'évolution de l'activité de l'invertase neutre chez la chicorée a été étudiée au cours du développement pendant soixante-trois jours (figure 13).

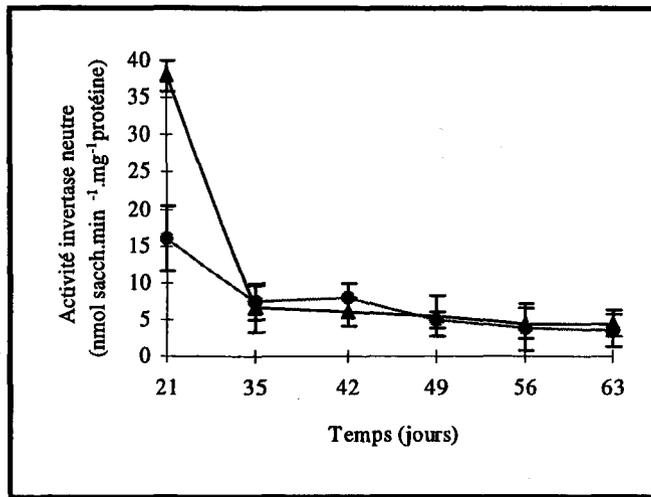


Figure 13 : Activité invertase neutre *in vitro* dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de quatre répétitions indépendantes.

Nous observons une activité maximale (38,0 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine dans les racines et 16,0 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine dans les feuilles) dans les jeunes plantules âgées de 21 jours. Celle-ci chute brutalement au trente-cinquième jour de culture puis reste stable jusqu'au soixante-troisième jour (respectivement 4,5 et 3,5 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine dans les racines et les feuilles).

1.3- L'activité saccharose synthase

La saccharose synthase peut catalyser *in vivo* une réaction réversible. Elle est donc capable de synthétiser et d'hydrolyser les molécules de saccharose. Nous avons mesuré la participation de la saccharose synthase dans l'hydrolyse potentielle du saccharose (figure 14).

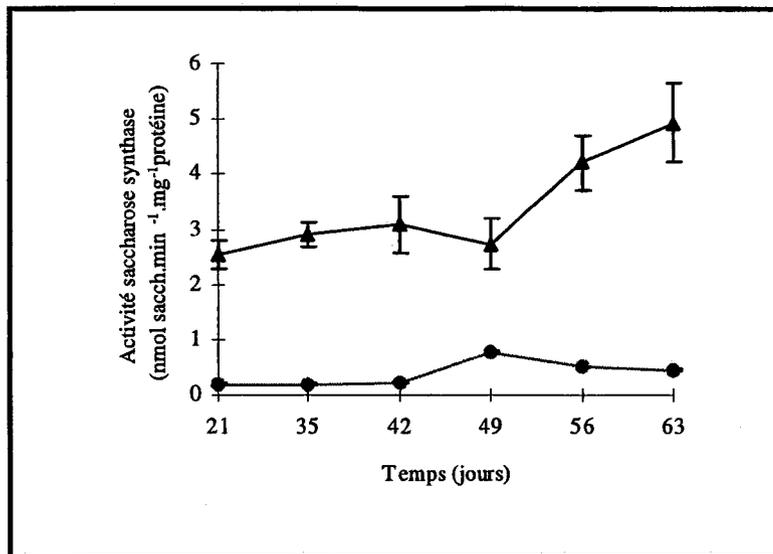


Figure 14 : *Activité saccharose synthase in vitro dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de quatre répétitions indépendantes.*

L'activité saccharose synthase mesurée dans les feuilles est relativement stable durant les neuf semaines de développement puisque celle-ci fluctue entre 0,2 et 0,8 nmole de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine. L'activité mesurée dans les racines est plus importante. Constante jusqu'au quarante-neuvième jour (2,7 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine), elle augmente ensuite régulièrement pour atteindre 4,9 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine au soixante-troisième jour.

1.4- La saccharose:saccharose fructosyltransférase

La saccharose:saccharose fructosyltransférase est la première enzyme menant à la formation des fructosanes. Ces molécules carbonées sont stockées lors de la tubérisation de la racine de chicorée. Ainsi, l'activité de la saccharose:saccharose fructosyltransférase a été mesurée dans les racines et les feuilles de chicorée prélevées à différents stades de culture (figure 15).

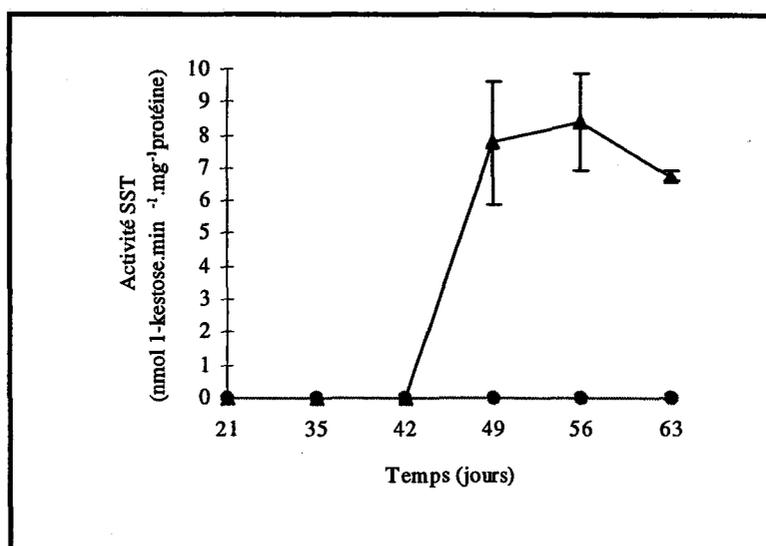


Figure 15 : *Activité saccharose:saccharose fructosyltransférase in vitro dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de quatre répétitions indépendantes.*

Aucune activité saccharose:saccharose fructosyltransférase n'est détectable dans les parties aériennes de la chicorée quel que soit le stade de développement. Dans les racines, nous observons une activité enzymatique à partir de la septième semaine de culture puis elle reste stable les semaines suivantes (7,6 nmoles de 1-kestose produit.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine en moyenne).

1.5- la fructosane:fructosane fructosyltransférase

La fructosane:fructosane fructosyltransférase est l'enzyme permettant l'élongation des chaînes de fructosanes. Il est donc intéressant de suivre son évolution dans nos plantes. Aucune activité saccharose:saccharose fructosyltransférase foliaire n'étant observable, nous nous sommes uniquement intéressés aux organes racinaires (figure 16).

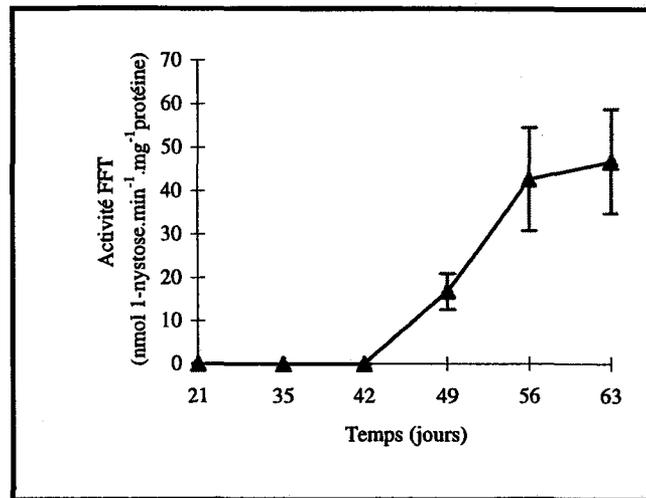


Figure 16 : *Activité fructosane:fructosane fructosyltransférase in vitro dans les racines de chicorée entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite. Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de trois répétitions indépendantes.*

Comme pour l'enzyme précédente, l'activité n'est décelable et mesurable qu'au cours de la septième semaine (16,9 nmoles de 1-nystose produit.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine). Toutefois, l'activité fructosane:fructosane fructosyltransférase va augmenter pour atteindre 46,9 nmoles de 1-nystose produit.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine au soixante-troisième jour.

1.6- Conclusion

L'analyse des divers profils d'activités enzymatiques du métabolisme du saccharose montre que certaines des enzymes étudiées s'expriment différemment selon le stade de développement dans nos conditions de culture. Ainsi, l'invertase acide, enzyme active dans les organes jeunes est pleinement active au cours des huit premières semaines de culture. La diminution d'activité dans la racine lors de la dernière semaine tend à suggérer que cet organe modifie la physiologie de sa croissance. L'apparition des activités saccharose:saccharose fructosyltransférase et fructosane:fructosane fructosyltransférase à sept semaines montrent qu'à cette période la racine acquiert sa fonction d'organe puits. L'invertase neutre et la saccharose synthase ne semblent pas apporter une contribution importante à l'hydrolyse du saccharose lors des premiers stades de la croissance végétative malgré la hausse de l'activité de cette dernière enzyme lors des dernières semaines. L'invertase acide semble donc métaboliser le saccharose aux stades précoces du développement racinaire puis les enzymes

du métabolisme des fructosanes interviennent utilisant le saccharose pour la mise en réserve des sucres sous la forme d'inuline.

2- Mécanisme de la régulation des activités métaboliques du saccharose

De façon à connaître le mécanisme de régulation des enzymes clés de la voie d'assimilation du saccharose, des hybridations moléculaires avec des sondes issues d'ADNc partiel de *Cichorium intybus* ont été entreprises.

2.1- Expression de l'invertase acide

Pour cette étude, nous avons utilisé une sonde correspondant à l'ADNc partiel de l'invertase acide de *Cichorium intybus* fournie par le laboratoire de Biologie du Développement de Louvain, Belgique (figure 17, tableau 4).

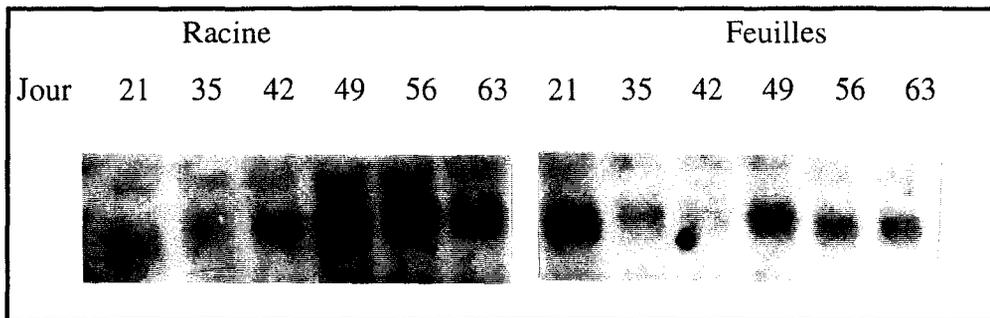


Figure 17 : Analyse par Northern blot de la transcription du gène invertase dans les racines et les feuilles de chicorée.

Jours	21	35	42	49	56	63
R	0,58	0,87	1,66	1,77	1,47	0,84
F	0,48	1,21	1,51	1,95	1,63	1,10

Tableau 4 : Evolution des quantités d'ARNm invertase acide dans les racines (R) et les feuilles (F) de chicorée. Les valeurs sont exprimées en comparaison avec les quantités d'ARNr (figure 10).

L'intensité des signaux d'hybridation augmente jusqu'au quarante-neuvième jour quel que soit l'organe étudié, puis chute lors des deux dernières semaines. Ces variations suivent les fluctuations des profils enzymatiques (page 14). Nous pouvons conclure qu'il s'agit, dans ce cas, d'une régulation transcriptionnelle, le gène invertase acide est exprimé dans les stades précoces du développement puis la transcription cesse lentement. Nous remarquons aussi une forte expression de ce gène dans les feuilles qui pourrait être liée au déchargement du phloème ou avec la croissance des feuilles.

2.2- Expression de la saccharose:saccharose fructosyltransférase

Une sonde correspondant à l'ADNc partiel de la saccharose:saccharose fructosyl transférase de *Cichorium intybus* a été employée pour notre analyse. L'analyse par Northern blot de la transcription (figure 18) ainsi que la quantification des signaux d'hybridation (tableau 5) révèlent des fluctuations significatives au cours du développement.

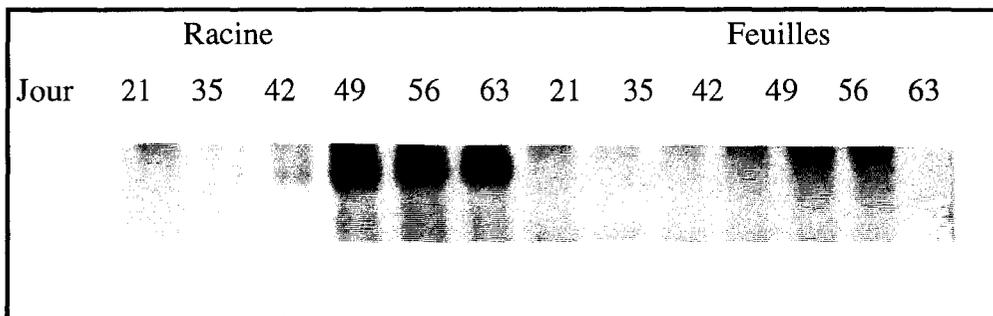


Figure 18 : Analyse par Northern blot de la transcription du gène SST dans les racines et les feuilles de chicorée.

Jours	21	35	42	49	56	63
R	0	0	0	0,58	0,52	1,01
F	0	0	0	0	0	0

Tableau 5 : Evolution des quantités d'ARNm SST dans les racines (R) et les feuilles (F) de chicorée. Les valeurs sont exprimées en comparaison avec les quantités d'ARNr (figure 10).

La transcription du gène saccharose:saccharose fructosyltransférase débute vers le quarante-neuvième jour et n'a lieu que dans les racines. Les activités observées précédemment (page 16) et la transcription varient parallèlement au cours du développement de la plante. Nous sommes donc en présence d'une très nette régulation au niveau transcriptionnel.

3- Modification de la teneur en glucides

Afin de mieux comprendre comment le métabolisme des glucides a évolué au cours de la croissance des plantes, nous avons procédé à l'analyse des glucides intratissulaires.

L'analyse a porté sur cinq glucides représentant les composés principaux du métabolisme du saccharose : le saccharose, le glucose, le fructose, le 1-kestose, le 1-nystose. Les dosages, effectués par HPLC, ont été réalisés sur des racines aux différents stades de développement (figure 19).

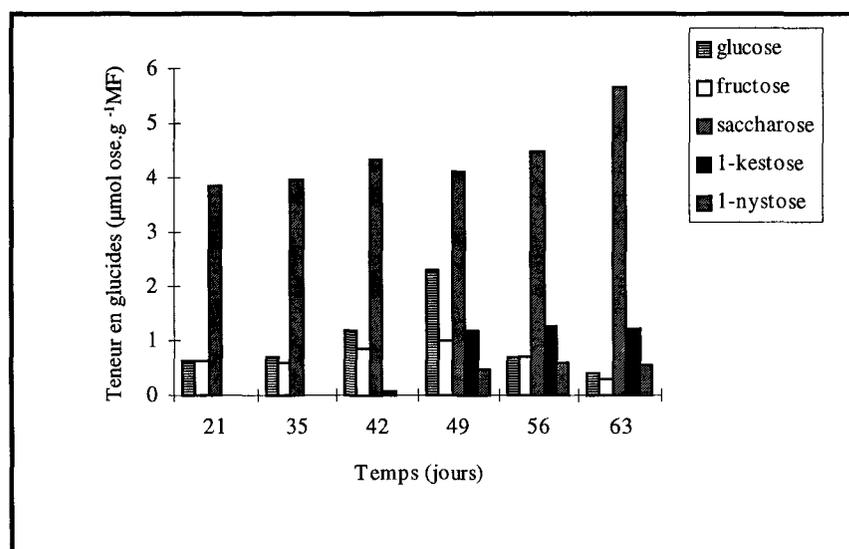


Figure 19 : Evolution des glucides dans les racines de chicorée entre le vingt-et-unième et le soixante-troisième jour de culture sur perlite.

Durant les cinq premières semaines de culture, seuls le saccharose, le glucose et le fructose sont présents dans les racines de chicorée à des teneurs constantes (figure 20a). A partir du quarante-deuxième jour, des modifications quantitatives et qualitatives des glucides apparaissent. En effet, durant les six premières semaines, les concentrations en saccharose et en hexoses augmentent et le 1-kestose est faiblement décelable. L'augmentation des teneurs en 1-kestose et 1-nystose dans les cellules racinaires dès le quarante-neuvième jour indique

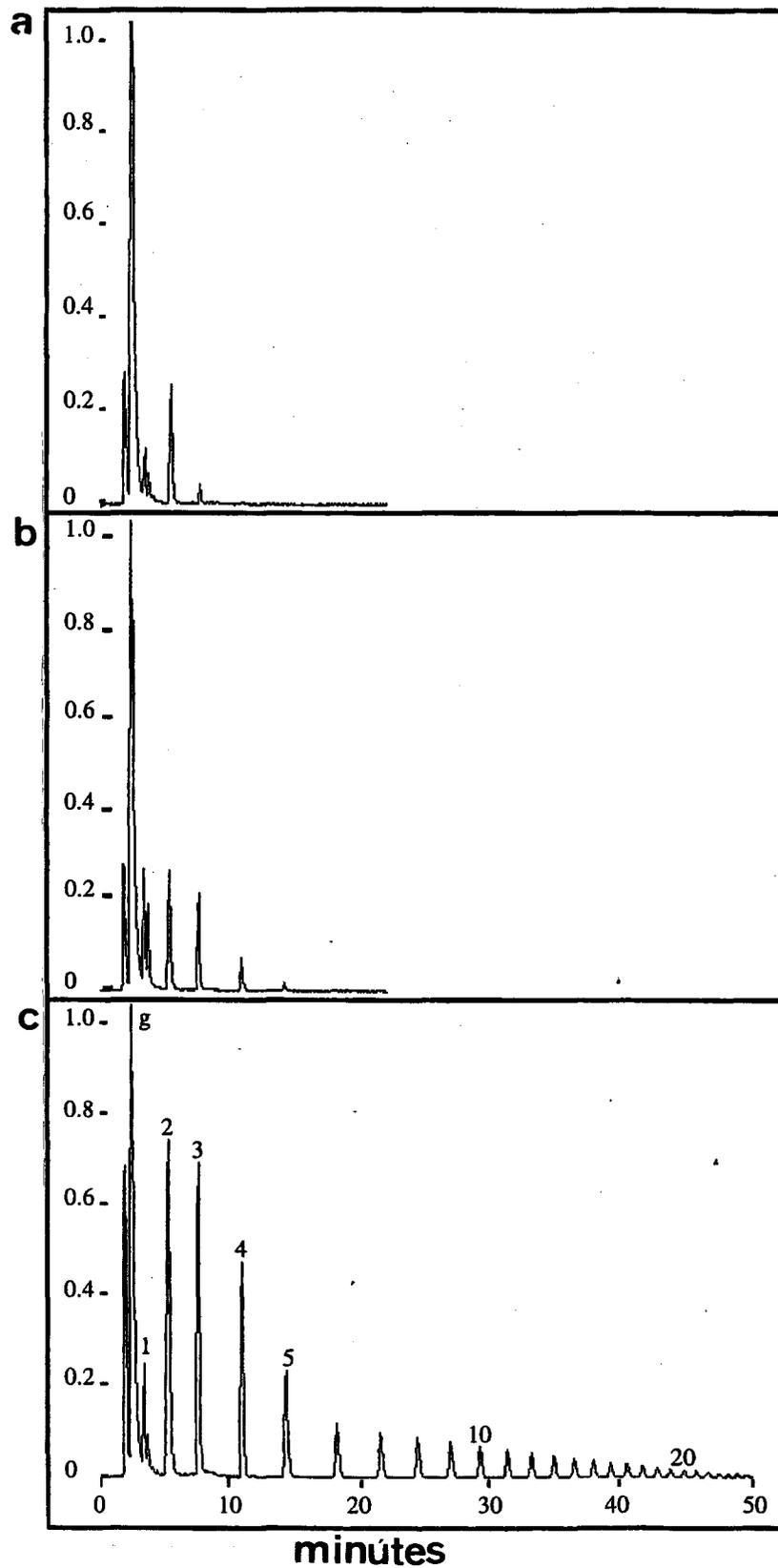


Figure 20 : Profils chromatographiques des glucides détectés dans les racines de chicorée après 21 jours de culture (a), 49 jours de culture (b), 63 jours de culture (c).
 g : glucose; 1 : fructose; 2 : saccharose; 3 : 1-kestose; 4 : 1-nystose; 5 : DP5

que le métabolisme des fructosanes est actif. Nous observons aussi une accumulation de fructosanes de degré de polymérisation plus important. En effet, dès le quarante-neuvième jour, le degré de polymérisation des fructosanes décelés est de l'ordre de 6 (figure 20b) alors qu'au soixante-troisième jour, il est équivalent à 18 (figure 20c). Ces changements s'accompagnent d'une hausse importante des quantités de saccharose observées lors des trois dernières semaines de culture. Si les teneurs en fructose chutent logiquement avec la mise en place des fructosanes, le fructose étant la molécule incluse dans l'élongation de ces molécules carbonées, nous constatons également dès la huitième semaine une baisse considérable des teneurs en glucose.

Cette analyse nous a permis de mettre en évidence une hausse des teneurs en saccharose racinaire au moment de la mise en place de la tubérisation suggérant une force d'appel du puits racinaire vis à vis de cette molécule au cours du développement de la chicorée.

4- Transport du ¹⁴C saccharose dans la plante

Afin de confirmer la force d'appel du puits racinaire dans les derniers stades de développement, nous avons procédé à un marquage *in situ* à l'aide de saccharose marqué au carbone 14. Le mélange radioactif est déposé sur la feuille la plus âgée après abrasion de la cuticule pour faciliter la pénétration du saccharose marqué dans les tissus. Les plantes sont prélevées après deux heures d'exposition et les organes sont séparés pour le dosage de la radioactivité.

Nous nous sommes intéressés particulièrement au comportement de deux puits, les feuilles jeunes et les racines afin d'évaluer leur force d'appel respective à des stades précis du cycle végétatif (tableau 6).

Jours	21	35	42	49	56	63
FD	75,1	76,3	80,2	74,6	75,6	72,1
R	3,6	17,6	18,4	20,6	22,8	25,0
FJ	21,3	6,1	1,4	4,8	1,6	2,9

Tableau 6 : Quantité de ¹⁴C-saccharose (%) détectée dans les feuilles donneuses (FD), les racines (R) et les feuilles jeunes (FJ) de chicorée après 2 h de transport.

Les résultats obtenus montrent que le transport du saccharose marqué au ^{14}C est détectable au niveau des puits dès deux heures de contact de la feuille donneuse avec le sucre marqué. Dans le cas des jeunes plantules (21 jours), nous constatons que la majorité du saccharose est exporté vers le bouquet foliaire à savoir les deux jeunes feuilles sur lesquelles il n'a pas été déposé de ^{14}C saccharose. Ceci s'explique parfaitement par un besoin de squelettes carbonés pour leur croissance. Dès le trente-cinquième jour de culture, l'exportation du saccharose marqué s'effectue principalement vers le puits racinaire. Ce transport augmente progressivement au cours de la culture jusqu'au jour 49. A ce stade, la feuille sur laquelle le saccharose a été déposé présente une sénescence marquée. Les mesures effectuées les semaines suivantes ont donc été réalisées sur la seconde feuille formée. Ceci nous permet de montrer que l'exportation des molécules marquées continue et s'accroît encore jusqu'au soixante-troisième jour, 25 % de la radioactivité totale se localisant dans les racines et seulement 3% dans les feuilles non utilisées pour le marquage.

5- Conclusion

L'étude de la voie d'assimilation du saccharose met en évidence de profondes modifications liées au stade de développement des chicorées. En effet, dans les premiers stades, l'invertase acide semble prédominer dans les racines et dans les feuilles des plantules. Dès la septième semaine, les activités saccharose:saccharose fructosyltransférase et fructosane:fructosane fructosyltransférase se mettent en place dans les racines, amorçant la baisse de l'activité invertase acide. Ces observations sont confortées par les analyses des glucides intratissulaires, laissant supposer que la racine âgée de sept semaines devient un organe puits très important. Le marquage *in situ* confirme une augmentation de l'importation du saccharose par les racines au cours du développement. Ainsi, lors de la mise en place de la tubérisation de la racine de chicorée, un transport massif de saccharose depuis le bouquet foliaire est observé. Cette donnée montre, qu'à cette période particulière de la croissance, une force d'appel du puits racinaire vis à vis des photoassimilats s'est développée.

- Influence du saccharose sur la tubérisation -



Planche A : A = Culture de chicorée in vitro
B = Morphologie des plants de chicorée âgés de 5 semaines et cultivés
en présence de concentrations croissantes en saccharose (H0 : 0 g.l⁻¹;
H5 : 5 g.l⁻¹; H10 : 10 g.l⁻¹, H15 : 15 g.l⁻¹; H20 : 20 g.l⁻¹; H30 : 30 g.l⁻¹)

I- Influence du saccharose sur le développement de la chicorée

Nos premiers travaux ont montré que la tubérisation de la racine de chicorée est corrélée à une importation massive de saccharose depuis l'appareil aérien vers les organes souterrains. Par ailleurs, ce phénomène morphologique s'accompagne d'une baisse de la réduction des nitrates dans la racine et de l'apparition des activités de synthèse de fructosanes. Il existerait une corrélation entre le métabolisme du nitrate et le métabolisme du saccharose.

Nous avons voulu étudier plus en détail ce phénomène. Pour cela, nous avons fourni aux chicorées une source de saccharose exogène suffisamment élevée pour modifier les rapports entre les voies d'assimilation du nitrate et du saccharose et pour voir si un apport plus ou moins massif de saccharose pouvait influencer soit la vitesse de mise en place de la tubérisation, soit l'importance de cette tubérisation.

Il nous fallait déterminer les conditions expérimentales optimales pour nos études ultérieures. Nous avons ainsi utilisé six milieux de culture contenant les éléments minéraux de la solution de Heller (1953) additionnés de 0; 5; 10; 15; 20; 30 g.l⁻¹ de saccharose. Afin d'éviter tout problème de contamination lié à la présence du saccharose, ces cultures sont effectuées *in vitro* c'est-à-dire en conditions aseptiques. La culture des plantules en tube sur ce milieu n'est possible que durant huit semaines, les plantules présentent ensuite des symptômes de nécrose. Afin de suivre l'évolution du développement des plantules, les prélèvements ont été réalisés tous les sept jours à partir de la deuxième semaine de culture (Planche A).

1- Effet du saccharose sur la croissance

1.1- Développement de la plante

Les courbes de croissance des plantules de chicorée cultivées en absence ou en présence de saccharose présentent, quelle que soit la condition de culture, le même profil : une croissance assez lente durant les trois premières semaines, une accélération entre la quatrième et la sixième semaine suivie d'un ralentissement de cette croissance (figure I).

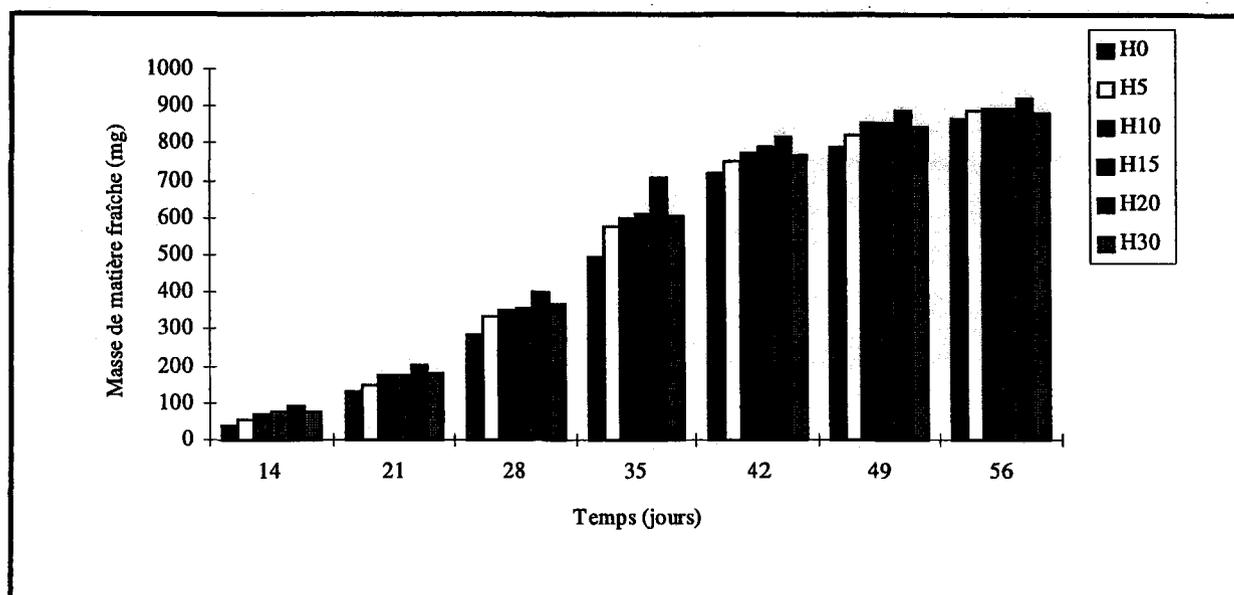


Figure I : Croissance des plantules de chicorée cultivées en absence (H0) ou en présence de saccharose 5 g.l⁻¹ (H5), 10 g.l⁻¹ (H10), 15 g.l⁻¹ (H15), 20 g.l⁻¹ (H20), 30 g.l⁻¹ (H30). Les valeurs figurées sont représentatives de trois répétitions indépendantes.

L'addition de saccharose dans le milieu de culture a pour conséquence de favoriser la croissance et le développement des plantules. En effet, nous remarquons qu'en présence de 20 g.l⁻¹ de saccharose, et ce quelle que soit la date de prélèvement, la quantité de masse de matière fraîche des plantules est toujours plus élevée que celle des plantules cultivées en présence de concentrations inférieures en saccharose.

Toutefois, en présence de 30 g.l⁻¹ de saccharose, la croissance est équivalente à celle obtenue en présence de 15 g.l⁻¹ de saccharose. Il est vraisemblable, qu'à forte concentration, le saccharose provoque une diminution du potentiel hydrique ce qui entraverait l'absorption d'eau et des ions minéraux.

1.2- Développement de la racine

Notre attention s'est portée plus particulièrement sur la mise en place de la tubérisation.

Pour cela, nous avons mesuré la masse de matière fraîche racinaire (figure II) et le diamètre du collet (figure 3) pour chaque condition de culture au cours des cinétiques de croissance.

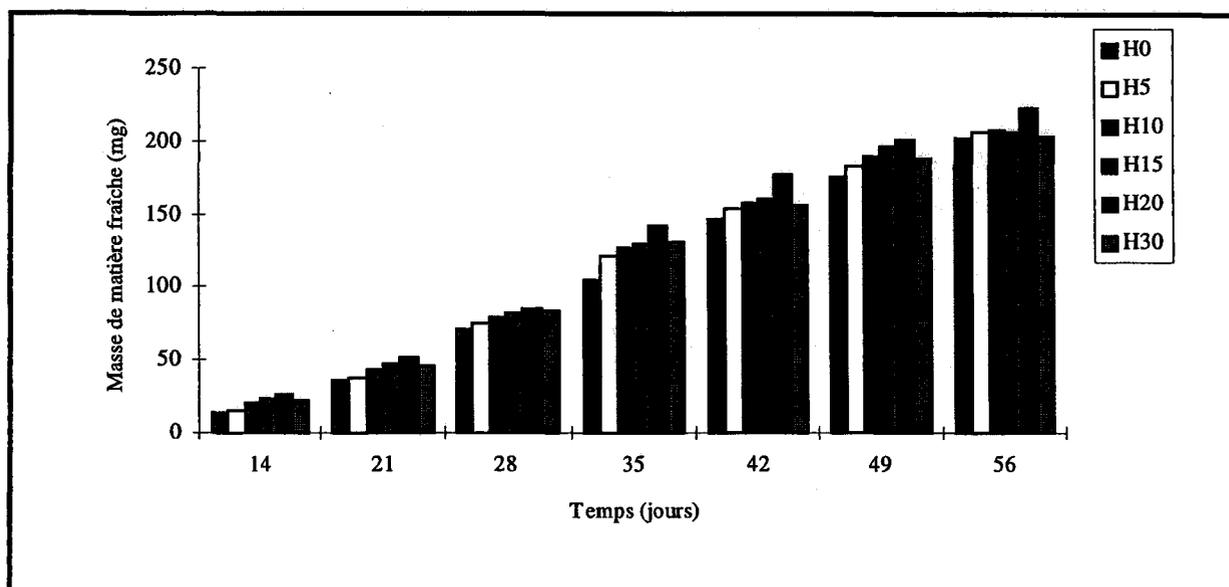


Figure II : Croissance des racines de chicorée cultivées en absence (H0) ou en présence de saccharose 5 g.l⁻¹ (H5), 10 g.l⁻¹ (H10), 15 g.l⁻¹ (H15), 20 g.l⁻¹ (H20), 30 g.l⁻¹ (H30). Les valeurs figurées sont représentatives de trois répétitions indépendantes.

Un profil similaire à celui obtenu précédemment pour le développement des plantes entières est observé : une augmentation de la croissance des racines consécutive à l'addition de saccharose avec un maximum atteint à 20 g.l⁻¹.

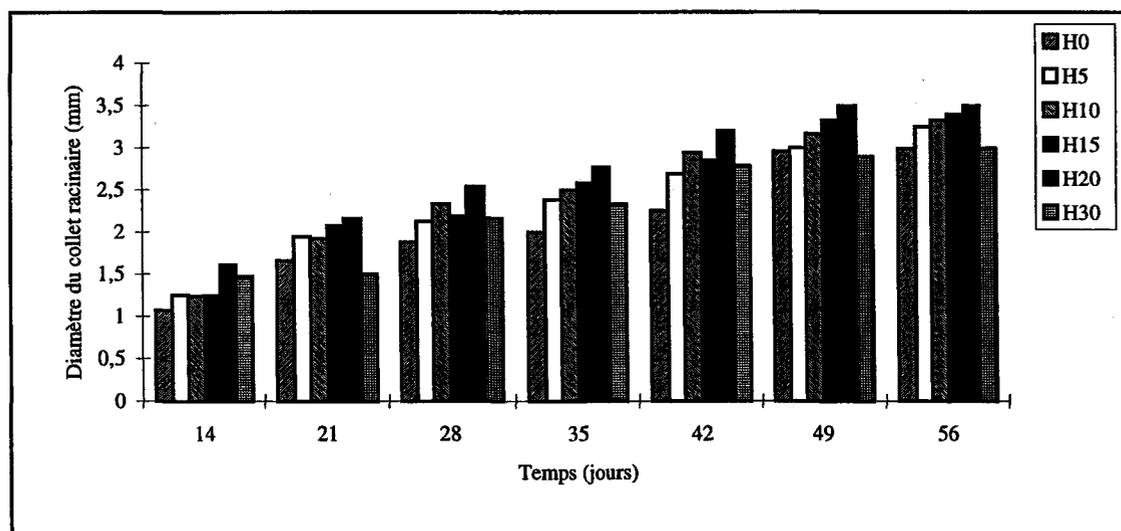


Figure III : Mesure du diamètre des racines de chicorée cultivées en absence (H0) ou en présence de saccharose 5 g.l⁻¹ (H5), 10 g.l⁻¹ (H10), 15 g.l⁻¹ (H15), 20 g.l⁻¹ (H20), 30 g.l⁻¹ (H30). Les valeurs figurées sont représentatives de trois répétitions indépendantes.

Dans tous les cas, la croissance du diamètre du collet est quasi linéaire jusqu'au quarante-deuxième jour puis elle se ralentit. Ce sont également les conditions sans saccharose (H0) et avec 20 g.l⁻¹ de saccharose (H20) qui présentent les différences les plus marquées. Le diamètre du collet est 1,33 fois plus important en moyenne en présence de saccharose.

2- Effet du saccharose sur la photosynthèse chez la chicorée

La photosynthèse fournit le saccharose et l'énergie nécessaire aux métabolismes de la plante. Un apport de saccharose exogène pourrait-il influencer ce mécanisme? Pour vérifier cela, nous avons déterminé le potentiel photosynthétique de plantes cultivées dans les différentes conditions.

La fluorescence a été utilisée comme un paramètre intrinsèque rendant compte de l'état du système photosynthétique. L'énergie lumineuse qui n'est pas utilisée par la photosynthèse est dissipée sous forme de fluorescence ($\lambda=650$ nm) ou de chaleur. La mesure *in vivo* de cette fluorescence permet d'apprécier l'ensemble des aspects de la photosynthèse (Baker, 1991).

La fluorescence variable (Fv) qui représente la différence entre la fluorescence maximale (Fm) et la fluorescence émise par les pigments de l'antenne avant que les excitons n'aient atteint les centres réactionnels (tous les accepteurs sont alors oxydés) (F0), exprime le nombre de centres réactionnels fonctionnels. Le rapport Fv/Fm, considéré comme un indicateur du potentiel photochimique du photosystème II, est proportionnel au rendement quantique des réactions photochimiques.

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur des plantules de chicorée âgées de cinq semaines cultivées *in vitro* (photopériode 16h/8h lumière/obscurité) sur des milieux contenant 0; 5; 10; 15; 20; 30 g.l⁻¹ de saccharose. Afin de pouvoir comparer les différentes mesures, nous avons pris soin d'effectuer les mesures sur la même feuille, c'est-à-dire la première apparue.

Le rapport Fv/Fm diminue de façon très nette avec l'addition de saccharose (figure IV).

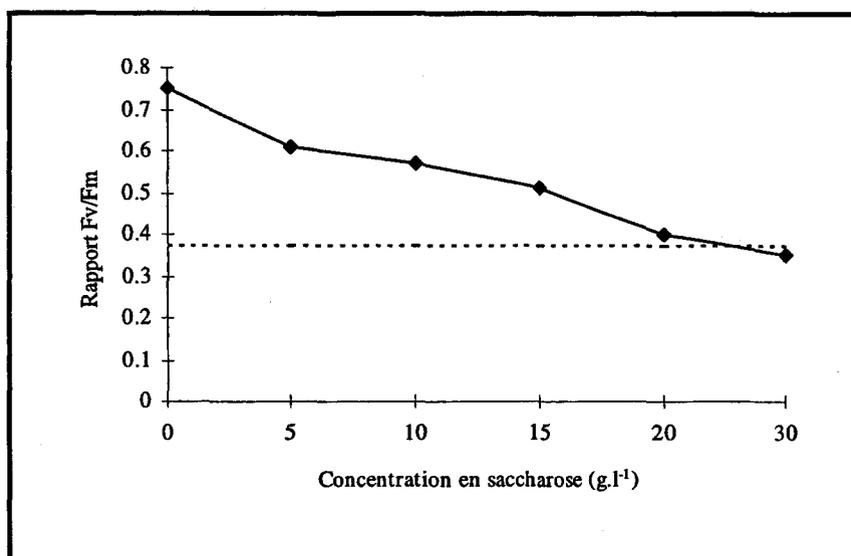


Figure IV : Effet du saccharose sur le potentiel photochimique chez la chicorée

Cette baisse est proportionnelle à la quantité de saccharose fournie. Nous constatons ainsi qu'environ 50% du potentiel photochimique n'est pas utilisé par la plante cultivée sur un milieu supplémenté avec 20 g.l⁻¹ de saccharose.

3- Conclusion

Un apport de saccharose affecte la croissance et le développement des chicorées. L'étude des cinétiques de croissance nous permet de conclure que le milieu contenant 20 g.l⁻¹ de saccharose représente le milieu de culture optimal. Une analyse du potentiel photochimique montre que la plante n'utilise que la moitié de ses capacités photosynthétiques lorsqu'elle est cultivée sur ce type de milieu en comparaison avec les plantes cultivées sur un milieu exempt de saccharose. Il semble donc que la fourniture de saccharose exogène influence les voies de sa production et que le saccharose présent dans le milieu serait prélevé et employé préférentiellement à celui pouvant être produit par la photosynthèse.

Pour effectuer la suite de nos recherches, nous conserverons le milieu de culture de Heller supplémenté avec 20 g.l⁻¹ de saccharose ainsi que le milieu de culture sans apport de saccharose qui constituera la référence pour nos études.

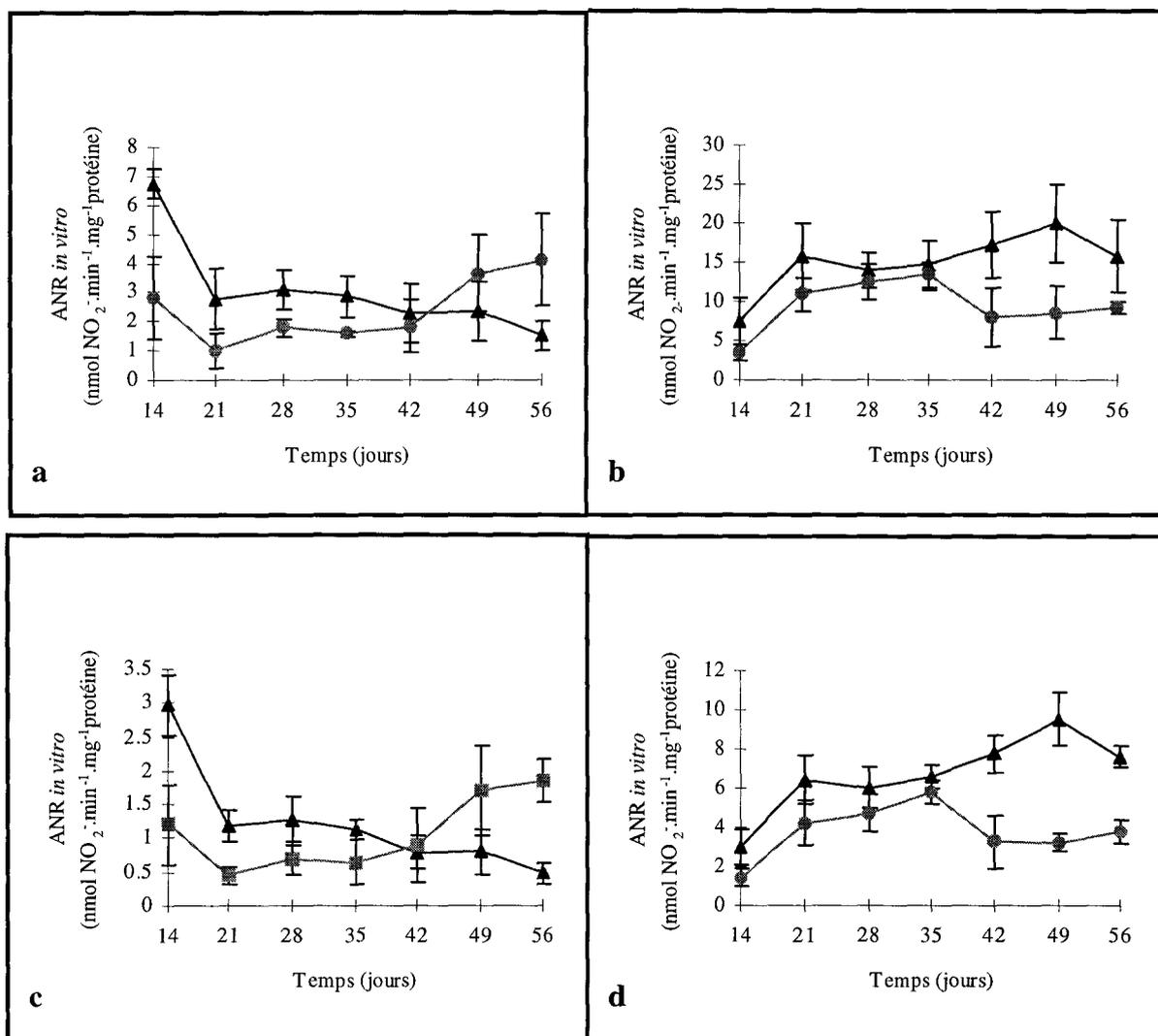


Figure V : ANR in vitro dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée en présence d'EDTA (a,b) ou de MgCl₂ (c,d) cultivées en absence (a,c) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b,d). Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de trois répétitions indépendantes.

II- Influence du saccharose sur le métabolisme azoté

La réduction du nitrate nécessite la présence de squelettes carbonés ainsi qu'un apport d'énergie. Le saccharose étant la forme la plus commune de transport des sucres. La première partie de nos travaux montre que l'assimilation du nitrate se délocalise vers le bouquet foliaire, lieu de la photosynthèse, au cours du développement de la chicorée. Le phénomène photosynthétique étant modifié par l'apport de saccharose exogène, il nous semblait judicieux d'étudier l'évolution de la réduction du nitrate sous de telles conditions environnementales. Pour cela, nous avons analysé la transcription du gène *nia*, parallèlement à la mesure de l'activité enzymatique en fonction du stade de développement.

1- Répartition de l'activité nitrate réductase *in vitro* entre racines et feuilles

Nous avons procédé à des dosages de l'activité nitrate réductase *in vitro* en présence d'EDTA et de $MgCl_2$.

Dans les cultures témoins (figure Va), la réduction des nitrates est principalement localisée dans les racines jusqu'au quarante-deuxième jour de culture. Les deux dernières semaines, les feuilles deviennent le site préférentiel d'assimilation azotée.

La cinétique effectuée sur des plantules cultivées en présence de saccharose révèle une différence fondamentale sur la localisation de l'assimilation du nitrate (figure Vb). En effet, l'activité racinaire augmente régulièrement jusqu'au quarante-neuvième jour de culture, puis chute légèrement lors de la semaine suivante (environ $7 \text{ nmol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéine). Le profil d'activité enzymatique du bouquet foliaire montre, quant à lui, une hausse des activités nitrate réductase jusqu'au trente-cinquième jour suivi d'une baisse se stabilisant au quarante-deuxième jour de culture aux environs de $3 \text{ nmol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéine.

La voie d'assimilation du nitrate est donc modifiée en présence de saccharose puisqu'elle se maintient dans les racines pendant toute la durée de l'expérimentation.

Quelle que soit la condition de culture, la présence de magnésium réduit fortement l'activité enzymatique ne représentant plus que 30 à 50% de l'activité nitrate réductase mesurée en présence d'EDTA (figures VIa, b). Ainsi, les modifications du métabolisme azoté pourraient être liées à des modifications dans la phosphorylation de la protéine nitrate réductase et à sa liaison à l'inhibiteur NIP.

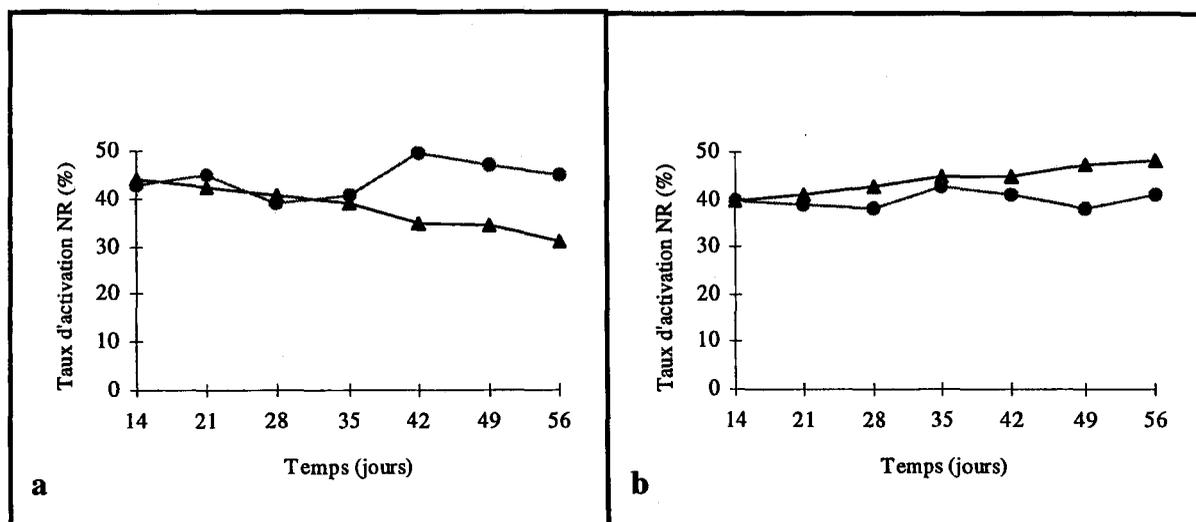


Figure VI : Taux d'activation de la dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b).

2- Evolution des teneurs en nitrate

Dans les conditions témoins (figure VIIa), la concentration en nitrate dans la racine est plus importante que celle mesurée dans les feuilles jusqu'au vingt et unième jour de culture atteignant respectivement 21,6 mg NO₃⁻.g⁻¹ MS et 19,6 mg NO₃⁻.g⁻¹ MS pour les racines et les feuilles. A cette période, nous observons une diminution régulière des teneurs dans les racines jusqu'au quarante-neuvième jour où celles-ci atteignent des valeurs très faibles de l'ordre de 0,5 mg NO₃⁻.g⁻¹ MS. Dans les feuilles, la quantité de nitrate continue d'augmenter, mais dès le quarante-deuxième jour de culture, celle-ci chute puis se stabilise entre le quarante-neuvième et le cinquante-sixième jour (3,0 mg NO₃⁻.g⁻¹ MS).

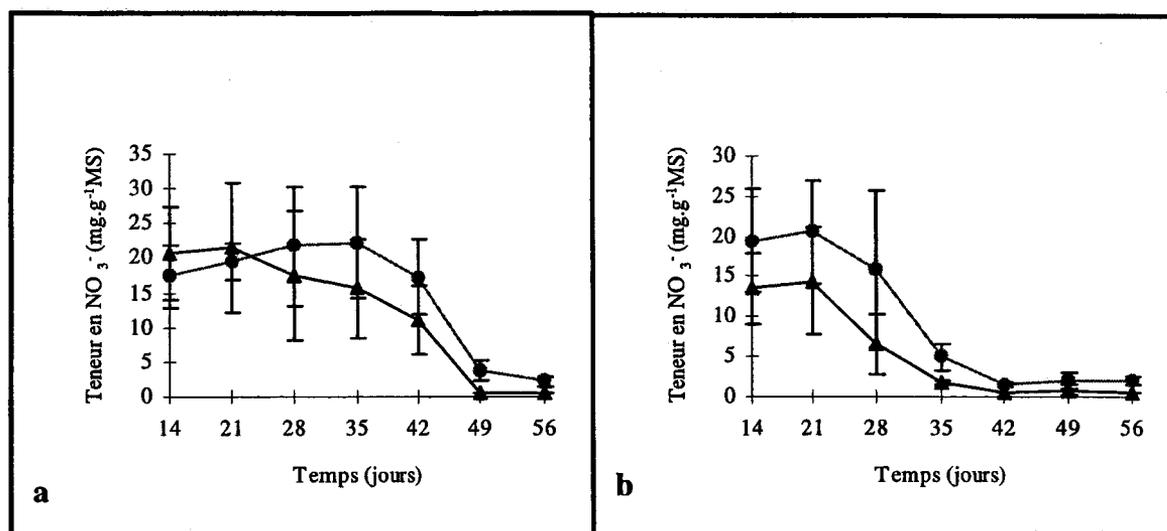


Figure VII : Evolution des teneurs en nitrate dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b). Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de trois répétitions indépendantes.

Les concentrations en nitrate chez les plantes cultivées sur le milieu contenant 20 g.l⁻¹ de saccharose (figure VIIb) présentent un profil similaire pour les racines et les feuilles. Des quantités importantes de nitrate sont détectées jusqu'au jour 21 (respectivement 14,4 et 20,6 mg NO₃⁻.g⁻¹ MS pour les racines et les feuilles), celles-ci diminuent entre les jours 21 et 35 puis se stabilisent pendant les trois dernières semaines (0,8 mg NO₃⁻.g⁻¹ MS pour les racines et 2,0 mg NO₃⁻.g⁻¹ MS pour les feuilles). Toutefois, les analyses montrent que les teneurs en nitrate sont supérieures dans les parties foliaires durant toute la cinétique de croissance.

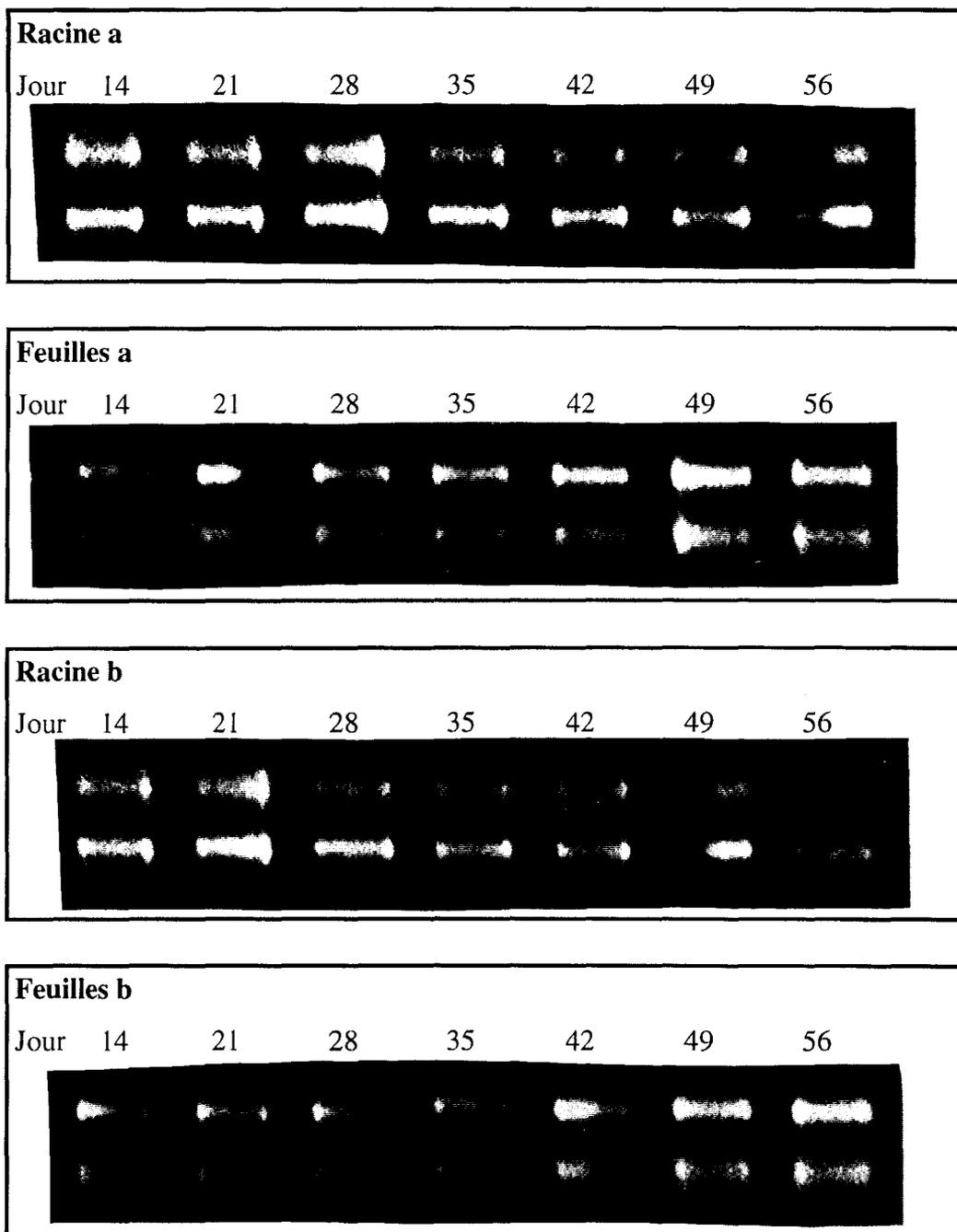


Figure 1 X: Contrôle des quantités des ARN totaux déposés pour chaque échantillon par coloration au BET.

3- Effet du saccharose sur la transcription du gène *nia*

Afin d'étudier si l'effet du saccharose sur le gène *nia* se situe au niveau transcriptionnel, nous avons procédé à l'extraction des ARN totaux des plantes cultivées en présence ou non de saccharose 20 g.l⁻¹ puis à l'hybridation avec la sonde NRS.

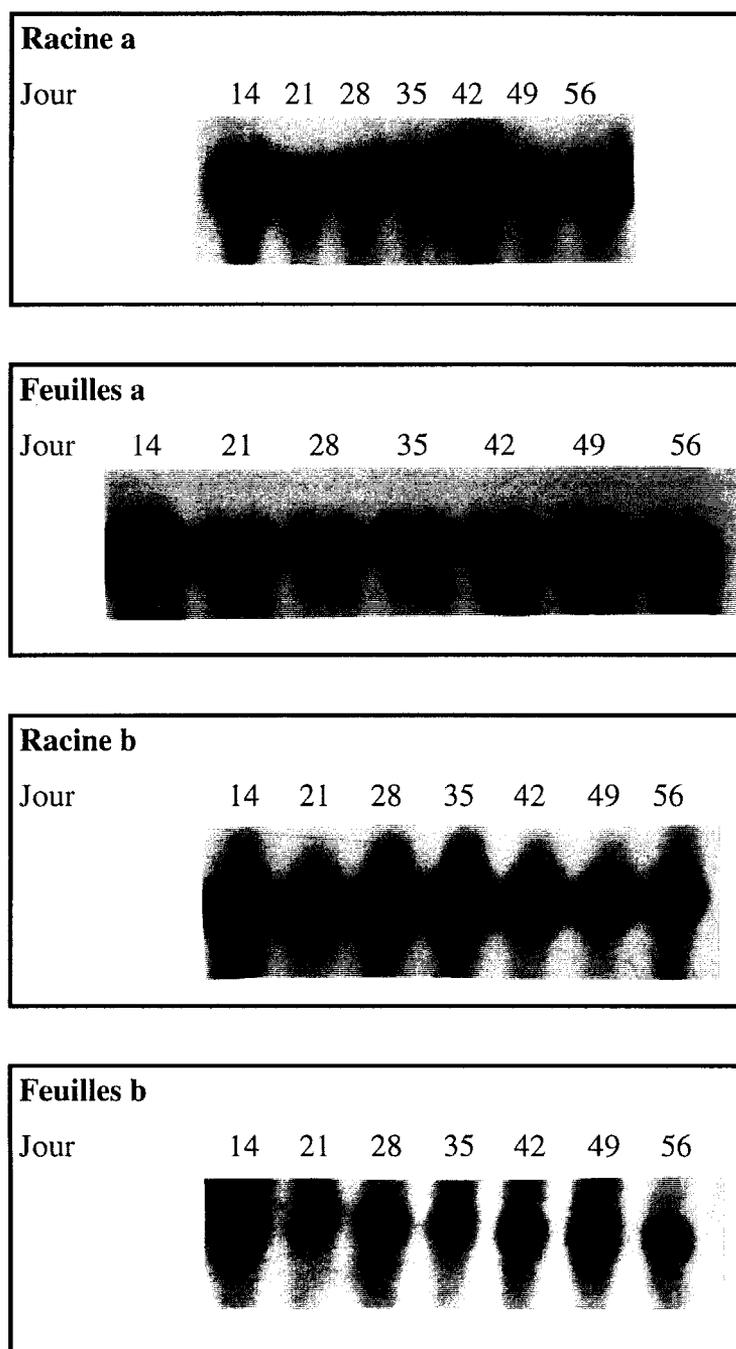


Figure VIII Analyse par Northern blot de la transcription du gène *nia* dans les racines et les feuilles de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b).

L'intensité relative des signaux d'hybridation du gène *nia* (figure VIII) ainsi que les quantités d'ARNr déposées (figure IX) sont estimées après numérisation puis comparées (tableau I).

Jours	14	21	28	35	42	49	56
R (a)	1,10	0,95	1,00	0,96	1,10	0,92	0,90
F (a)	1,02	0,98	0,95	0,95	0,98	1,10	1,05
R (b)	0,95	1,02	1,08	1,08	0,95	0,92	0,95
F (b)	1,03	0,98	1,05	1,02	1,01	1,03	0,99

Tableau I : Evolution des quantités d'ARNm *nia* dans les racines (R) et les feuilles (F) de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b). Les valeurs sont exprimées en comparaison avec les quantités d'ARNr déposées.

Aucun effet du saccharose n'est observé sur l'activité transcriptionnelle du gène *nia* (moins de 10% de fluctuations). Il semble donc que le saccharose n'exerce aucun effet sur la transcription du gène *nia* de la chicorée pendant la durée de l'expérimentation.

4- Conclusion

Les activités nitrate réductase des plantules cultivées en condition témoin présentent un profil identique à celles obtenues chez les plantes cultivées en hors-sol. En effet, quelle que soit la technique de dosage utilisée, l'activité enzymatique se localise dans les racines jusqu'à la sixième semaine puis dans les feuilles durant les dernières semaines de culture.

En présence de saccharose, nous avons mis en évidence une modification de la localisation des activités de réduction. En effet, dans cette condition, l'assimilation des nitrates reste principalement racinaire quelle que soit la date de prélèvement.

Il semble que le saccharose n'ait aucun effet sur l'activité transcriptionnelle du gène *nia*. Le saccharose doit alors exercer ses effets à un niveau post-transcriptionnel et/ou post-translationnel à moins qu'il n'ait un effet indirect sur l'activité de l'enzyme. Nous avons d'ailleurs montré une forte inhibition des activités nitrate réductase *in vitro* en présence de

magnésium comparativement aux activités mesurées en présence d'EDTA. Ceci pourrait être un premier élément de réponse sur une intervention éventuelle de la réaction réversible de phosphorylation de la protéine nitrate réductase.

III- Influence du saccharose sur le métabolisme carboné

Le saccharose est le substrat de diverses enzymes clés du métabolisme carboné. Afin de savoir si la fourniture de saccharose exogène entraînait des changements dans l'évolution des enzymes de son catabolisme, nous avons analysé les activités enzymatiques et la transcription des gènes codant pour l'invertase acide et la saccharose:saccharose fructosyltransférase.

1- Evolution des enzymes du catabolisme du saccharose

1.1- L'activité invertase acide

Dans les cultures témoins (figure Xa), nous observons une hydrolyse importante dans les racines jusqu'au trente-cinquième jour où elle atteint 311 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine. L'activité invertasique décline ensuite d'une façon régulière jusqu'au cinquante-sixième jour. Bien que plus faible, l'activité mesurée dans les feuilles est parallèle à celle mesurée dans les racines jusqu'au trente-cinquième jour. Dès le quarante-deuxième jour, l'hydrolyse du saccharose est principalement observée dans le bouquet foliaire.

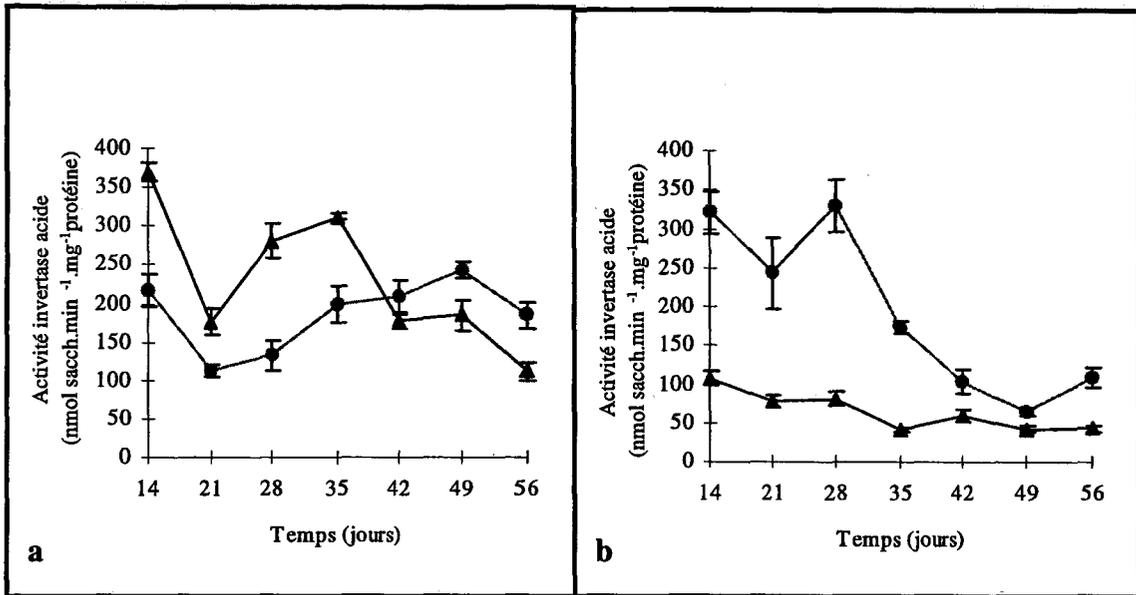


Figure X : Activité invertase acide *in vitro* dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l-1 (b). Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de trois répétitions indépendantes

Par contre, l'activité invertasique acide mesurée sur des plantules cultivées en présence de saccharose est constamment plus importante dans les feuilles que dans les racines (figure Xb). L'activité dans la racine est quasi constante durant l'expérience, son niveau variant de 50 à 100 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine. Une chute brutale de l'activité enzymatique foliaire est à signaler entre le vingt-huitième et le trente-cinquième jour (environ 50% d'inactivation).

1.2- L'activité invertase neutre

Dans le cas de la cinétique témoin (figure XIa), nous remarquons peu de différences entre les deux organes étudiés. Les activités chutent légèrement et régulièrement jusqu'à la huitième semaine de culture.

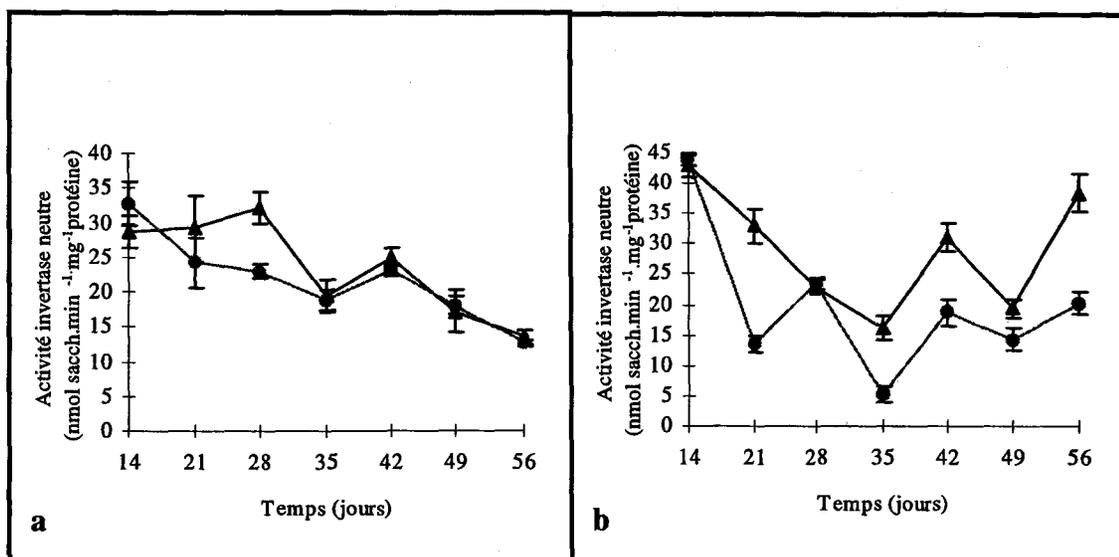


Figure XI : Activité invertase neutre *in vitro* dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b). Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de trois répétitions indépendantes.

Concernant les plantules cultivées sur le milieu enrichi en saccharose (figure XIb), les activités invertasiques neutres mesurées dans les racines sont supérieures à celles mesurées dans les feuilles. Cependant, les activités présentent des profils en dent de scie dans les deux organes variant de 16,1 à 42,9 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine pour les racines et de 5,3 à 43,9 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine pour les feuilles. Cette de 5,3 à 43,9 nmoles de saccharose hydrolysé.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine pour les feuilles. Cette activité contribue donc faiblement à l'hydrolyse du saccharose dans nos conditions expérimentales.

1.3- L'activité saccharose synthase

Des mesures de l'activité saccharose synthase ont également été réalisées dans des plantes cultivées en absence ou en présence de saccharose.

Les activités saccharose synthase racinaires et foliaires mesurées lors des cinétiques témoins sont relativement stables entre le quatorzième et le quarante-neuvième jour de culture (figure XIIa). Une baisse de l'activité est ensuite observable au jour 56.

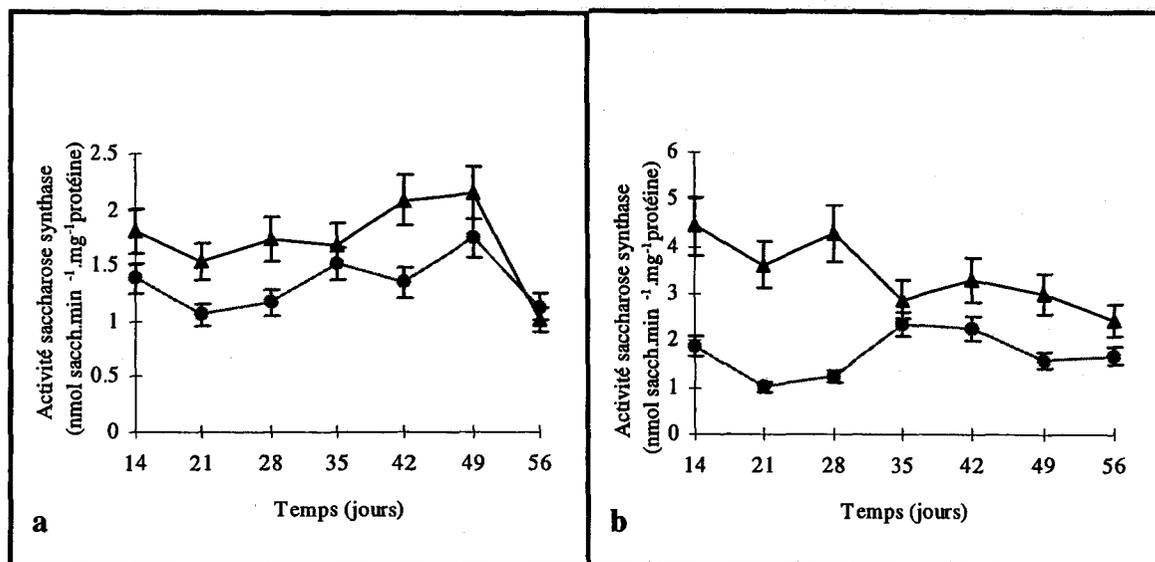


Figure XII : Activité saccharose synthase *in vitro* dans les racines (▲) et les feuilles (●) de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b). Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de trois répétitions indépendantes.

En présence de saccharose, les activités enzymatiques sont légèrement modifiées (figure XIIIb). Nous distinguons deux phases : du jour 14 au jour 35, l'activité racinaire est deux à quatre fois plus importante que l'activité foliaire alors que dès le jour 35, nous notons une baisse des activités racinaires parallèlement à une hausse des activités foliaires.

Quelle que soit la condition de culture, nous constatons que l'activité hydrolytique de la saccharose synthase est toujours supérieure dans les racines au cours du développement.

1.4- L'activité saccharose:saccharose fructosyltransférase

Nous avons montré que l'expression de cette enzyme pouvait être corrélée à une importation du saccharose depuis les feuilles adultes vers le puits racinaire (cf A III-4). Il est donc intéressant de suivre l'évolution de l'activité enzymatique dans nos conditions de culture. A l'instar des résultats obtenus au III.1.4-, seules les activités racinaires ont été suivies durant huit semaines (figures XIIIa, b).

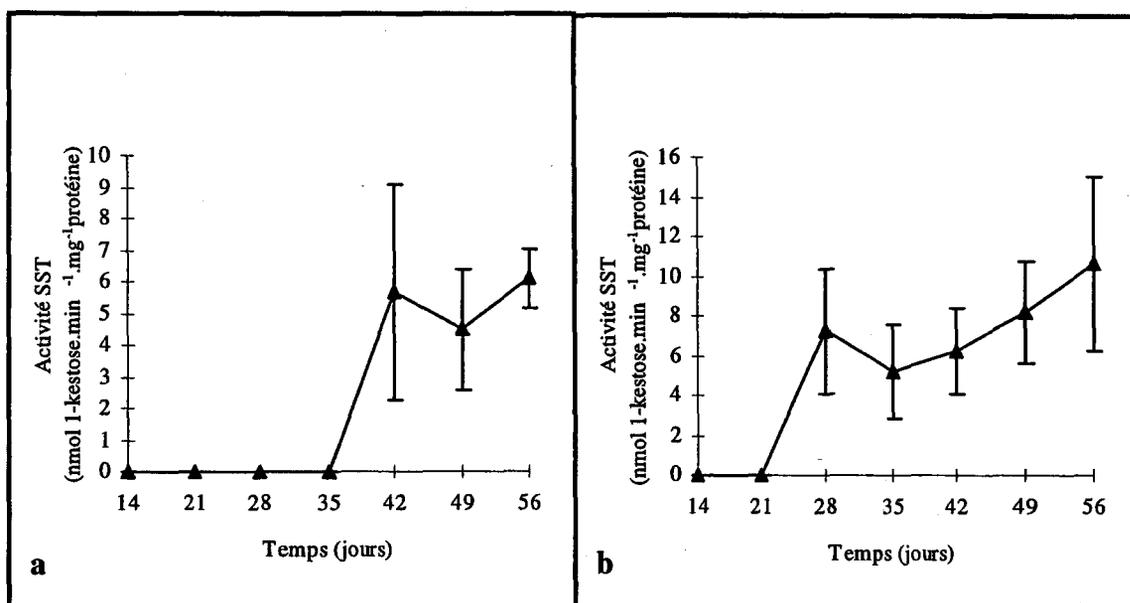


Figure XIII : Activité saccharose:saccharose fructosyltransférase *in vitro* dans les racines de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b). Les valeurs figurées sont les moyennes obtenues à partir de trois répétitions indépendantes.

Alors que l'activité saccharose:saccharose fructosyltransférase apparaît au quarante-deuxième jour de culture en condition témoin, celle-ci est détectée plus précocément chez les plantes cultivées sur un milieu contenant 20 g.l⁻¹ de saccharose (vingt-huitième jour). Dans les deux conditions, les activités enzymatiques augmentent légèrement au cours des dernières semaines de cinétique. Au jour 56, l'activité saccharose:saccharose fructosyltransférase obtenue dans les plantes cultivées en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ est 1,75 fois supérieure à celle obtenue en condition témoin.

1.5- Conclusion

Les diverses analyses des activités enzymatiques nous montrent que seules l'invertase acide et la saccharose:saccharose fructosyltransférase semblent fortement modifiées par la présence de saccharose dans le milieu de culture. En effet, les activités invertase neutre et saccharose synthase sont fortement masquées par l'activité invertase acide puisqu'elles sont respectivement 10 à 100 fois inférieures à cette dernière. Dans le cas de l'invertase acide, nous observons une activité essentiellement localisée dans les feuilles laissant supposer que le surplus de saccharose absorbé par les racines serait transporté jusqu'au bouquet foliaire. De plus, il est intéressant de noter que cette enzyme, très active dans les tissus jeunes, présente

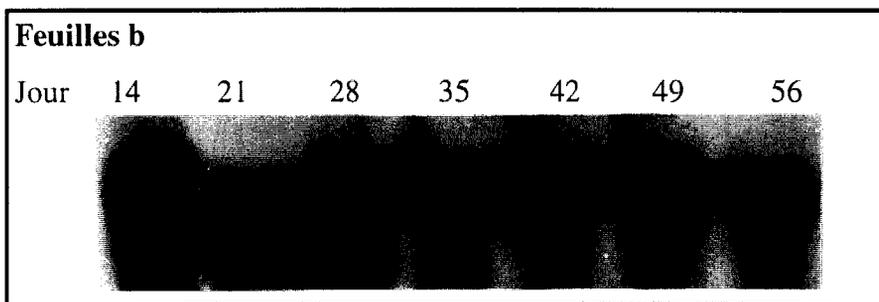
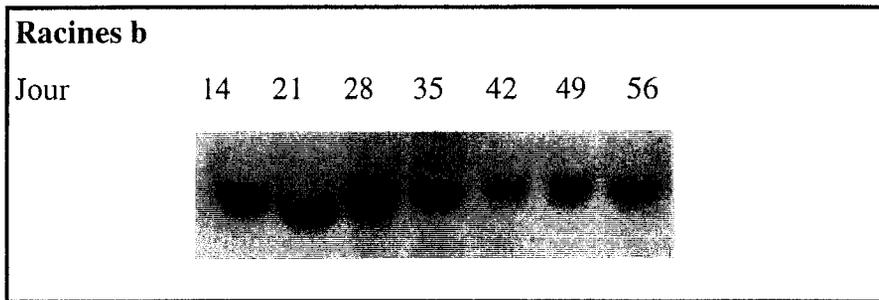
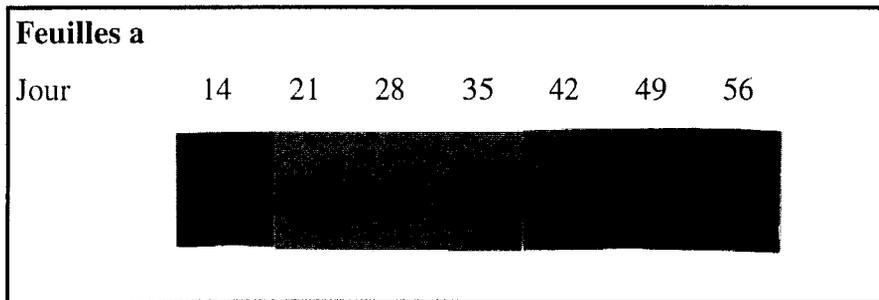
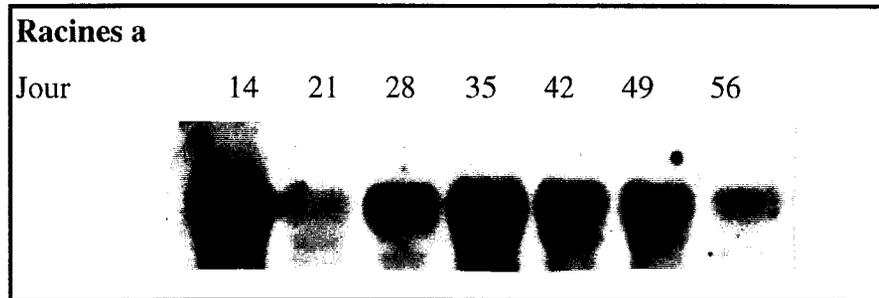


Figure 14: Analyse par Northern blot de la transcription du gène invertase acide dans les racines et les feuilles de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b).

une baisse d'activité respectivement à la sixième et à la quatrième semaine de culture pour les conditions témoins et saccharose 20 g.l⁻¹. Ces résultats suggèrent qu'à ces différentes périodes de développement, la racine évolue vers la fonction d'organe de réserve et donc commence à tubériser. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse des activités saccharose:saccharose fructosyltransférase. En effet, l'enzyme est activée à partir de la sixième semaine pour les plantes cultivées sur le milieu exempt de saccharose alors qu'une activité est déjà décelable à quatre semaines pour les plantes cultivées en présence de saccharose.

2- Mécanisme de la régulation des enzymes du métabolisme du saccharose

L'effet du saccharose sur l'invertase acide et la saccharose:saccharose fructosyltransférase a été analysé au niveau transcriptionnel. Nous avons pour cela effectué des hybridations sur des ARN totaux de chicorée avec une sonde invertase acide et saccharose:saccharose fructosyltransférase de chicorée.

2.1- Expression de l'invertase acide

L'intensité des signaux d'hybridation de l'invertase acide (figure XIV) a été numérisée et comparée aux quantités d'ARNr déposées (figure IX; tableau II)

Jours	14	21	28	35	42	49	56
R (a)	1,52	0,43	1,13	1,27	1,09	1,04	0,62
F (a)	0,94	0,52	0,45	0,63	0,82	0,93	0,88
R (b)	0,94	0,89	0,91	0,93	0,88	0,65	0,66
F (b)	1,98	0,98	1,65	1,52	1,32	1,35	1,42

Tableau 2 : Evolution des quantités d'ARNm d'invertase acide dans les racines (R) et les feuilles (F) de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b). Les valeurs sont exprimées par comparaison avec les quantités d'ARNr déposées.

En condition témoin (figure XIVa; tableau IIa) ainsi qu'en condition 20 g.l⁻¹ de saccharose (figure XIVb; tableau IIb), nous observons des fluctuations nettes de la

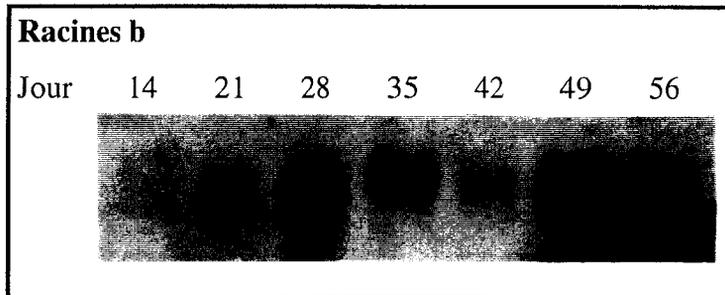
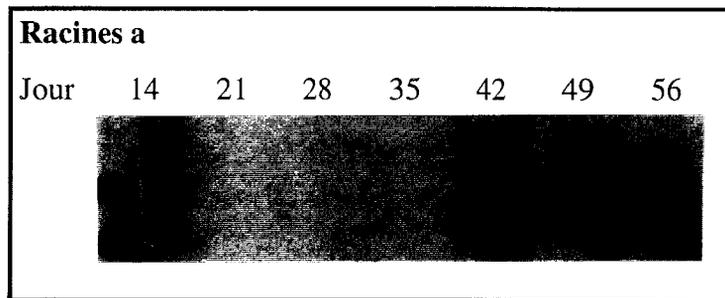


Figure XV: Analyse par Northern blot de la transcription du gène SST dans les racines de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b).

transcription du gène invertase acide dans les racines et les feuilles. Nous remarquons que l'activité de transcription du gène invertase acide est plus élevée dans les racines des cultures témoins en comparaison avec les feuilles alors que les teneurs en ARNm invertase acide des cultures complémentées en saccharose sont supérieures dans les feuilles par rapport aux racines. Ces modifications d'expression des ARNm de l'invertase acide s'effectuent parallèlement à celles des activités de l'enzyme. Ceci pourrait indiquer, qu'en condition témoin, le saccharose est importé dans les racines puis hydrolysé sur place alors qu'en présence de saccharose exogène, le saccharose absorbé par la plante est directement transporté vers les feuilles où il sera hydrolysé et utilisé pour la croissance du bouquet foliaire. Il semble que l'effet du saccharose sur l'expression de l'invertase acide se situe donc au niveau de la transcription.

2.2- Expression de la saccharose:saccharose fructosyltransférase

Les hybridations ont été réalisées sur des extraits racinaires des plantes cultivées sur milieu témoin (figure XVa) et milieu complémenté en saccharose (figureXVb).

Jours	14	21	28	35	42	49	56
Témoin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52	0,63	0,95
Saccharose 20 g.l ⁻¹	0,00	0,00	1,02	0,88	0,33	1,01	1,13

Tableau III : Evolution des quantités d'ARNm SST dans les racines de chicorée cultivées en absence ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹. Les valeurs sont exprimées par comparaison avec les quantités d'ARNr déposées.

Les ARNm de la saccharose:saccharose fructosyltransférase sont détectables dans les racines à partir de la sixième semaine de culture en condition témoin (tableau III). En présence de saccharose, les premiers signaux d'hybridation apparaissent dès la quatrième semaine. Il semble que le saccharose induise une transcription plus précoce du gène saccharose:saccharose fructosyltransférase.



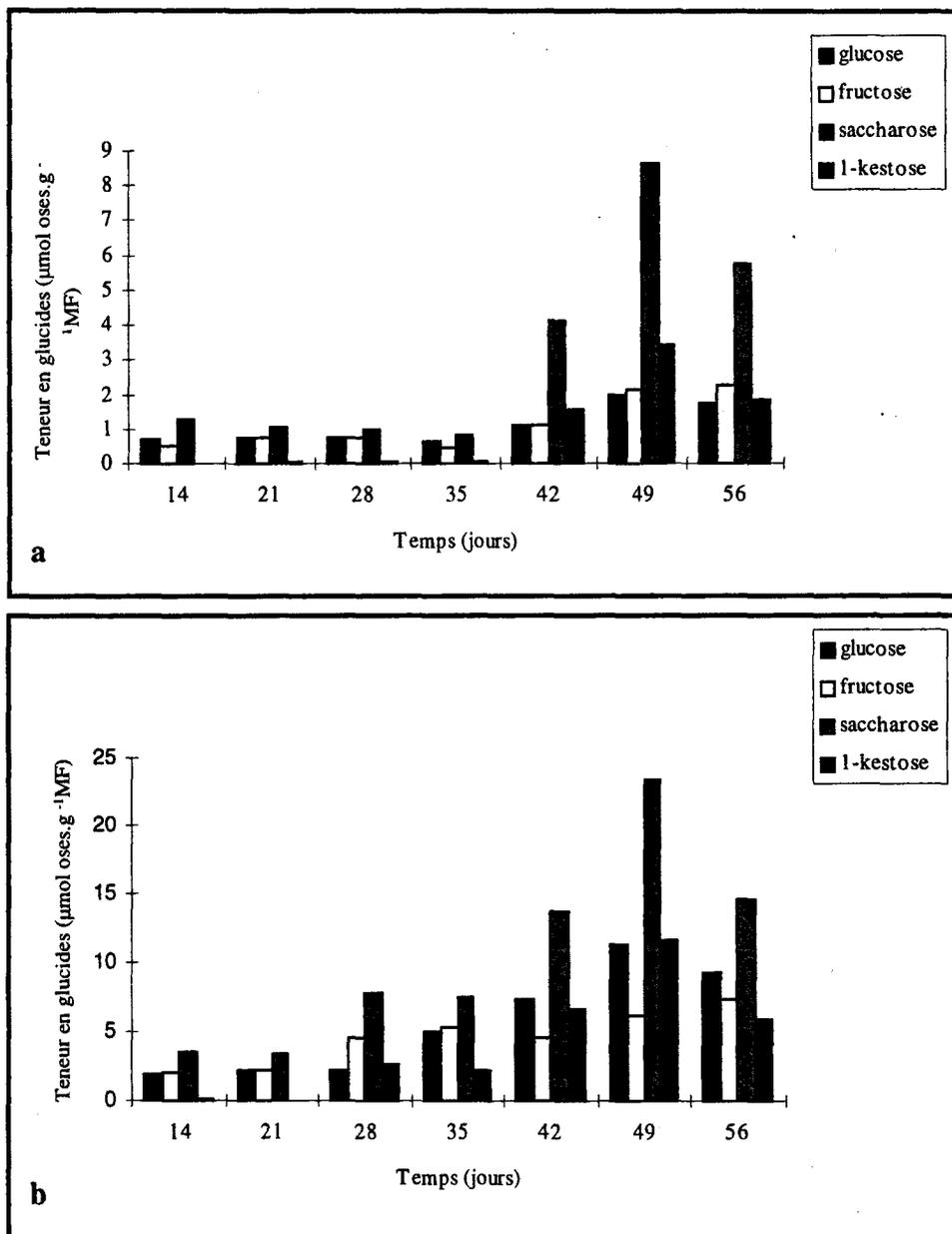


Figure XVI Evolution des teneurs en glucides des racines de chicorée cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l⁻¹ (b)

3- Analyse de la teneur en glucides intratissulaires

La présence de saccharose dans le milieu de culture provoque des changements dans l'expression de certaines enzymes clés du métabolisme carboné. Pour en connaître les conséquences sur la composition glucidique, les teneurs en divers glucides ont été déterminées à partir de racines provenant de plantules cultivées sur milieu témoin et enrichi en saccharose.

L'analyse a porté sur quatre glucides particuliers représentant les intervenants principaux des enzymes du métabolisme du saccharose étudiées précédemment : le glucose, le fructose, le saccharose et le 1-kestose.

Concernant les racines témoins (figure XVIa), nous constatons une légère diminution de la concentration en saccharose jusqu'au jour 35 ($0,84 \mu\text{mole d'ose.mg}^{-1} \text{MF}$) parallèlement à une légère hausse des concentrations en glucose et fructose. Entre le quarante-deuxième et le quarante-neuvième jour de culture, les teneurs en glucose, fructose et saccharose augmentent (respectivement $1,98$; $2,12$; $8,67 \mu\text{mole d'oses.mg}^{-1} \text{MF}$), et nous observons l'apparition du 1-kestose ($3,44 \mu\text{mole d'ose.mg}^{-1} \text{MF}$). A 56 jours, les concentrations des différents glucides chutent.

La comparaison quantitative et qualitative des sucres contenus dans les racines cultivées en présence de saccharose (figure XVIb) et les racines témoins indique une évolution différentielle des glucides au cours de la culture. Nous observons des teneurs glucidiques globalement supérieures dans les plantes cultivées en présence de saccharose pouvant s'expliquer par une absorption massive de cette molécule présente dans le milieu de culture. En début de culture, nous notons une légère diminution de la teneur en saccharose suivie d'une hausse du vingt-huitième au cinquante-sixième jour ($23,35 \mu\text{moles d'ose.mg}^{-1} \text{MF}$ à 56 jours). Les teneurs en hexoses, quant à elles, s'accroissent constamment jusqu'au quarante-neuvième jour (respectivement $11,28$ et $6,18 \mu\text{moles d'ose.mg}^{-1} \text{MF}$ de glucose et fructose). Par ailleurs, il faut signaler que, dès la sixième semaine, les teneurs en glucose ont pratiquement doublé par rapport aux teneurs en fructose. Le 1-kestose est déjà fortement présent au vingt-huitième jour de culture ($2,69 \mu\text{moles d'ose.mg}^{-1} \text{MF}$). Comme pour la condition témoin, nous observons une chute des diverses teneurs en glucides à huit semaines.

Si nous nous intéressons au degré de polymérisation des fructosanes apparaissant au cours du développement des plantules, nous constatons qu'en absence de saccharose, seul le

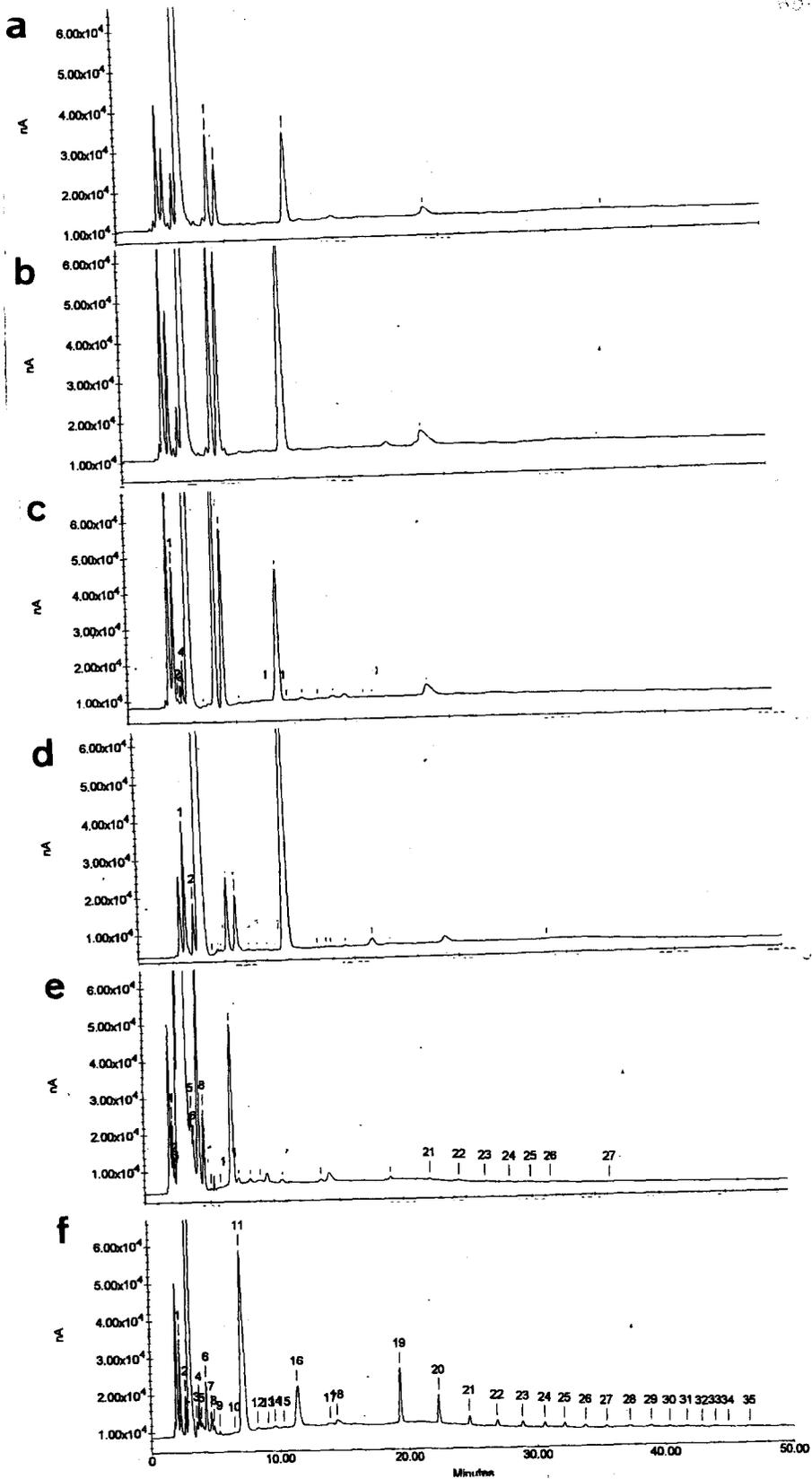


Figure XVII. Profils chromatographiques des glucides détectés dans les racines de chicorée après 14 jours de culture en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l^{-1} (b); 35 jours de culture en absence (c) ou en présence de saccharose 20 g.l^{-1} (d); 63 jours de culture en absence (e) ou en présence de saccharose 20 g.l^{-1} (f)
 g : glucose; 1 : fructose; 2 : saccharose; 3 : l-kestose; 4 : l-nystose; 5 : DP5

glucose, le fructose et le saccharose sont présents à 2 semaines (figure XVIIa), à 5 semaines, le degré de polymérisation s'accroît légèrement (figure XVIIb) et atteint à 8 semaines une valeur équivalente à 15 (figure XVIIc). L'observation du degré de polymérisation des fructosanes contenus dans les racines des plantules cultivées en présence de saccharose montre une forte augmentation entre la deuxième et la cinquième semaine de culture puisque nous passons du saccharose à la présence de fructosanes d'un degré de polymérisation supérieur à 5 (figure XVII d,e). Enfin, à 8 semaines, nous remarquons des fructosanes d'un degré de polymérisation équivalent à 20 (figure XVII f).

4- Conclusion

L'analyse des glucides intratissulaires montre que l'apparition du 1-kestose, c'est-à-dire du premier maillon menant à la formation des fructosanes, présente une corrélation étroite avec la hausse des teneurs en saccharose quelle que soit la condition de culture. Cette étude permet de mettre en évidence une force d'appel du puits racinaire vis à vis du saccharose lors du stockage des fructosanes.

La chute des teneurs en glucides à huit semaines peut être imputée à notre technique de culture qu'est la culture *in vitro* en milieu confiné non renouvelé.

IV- Modifications histologiques induites par le saccharose

L'addition de saccharose provoque une augmentation des masses de matière fraîche des racines de chicorée. Nous observons notamment un épaississement prononcé au niveau du collet. De façon à étudier plus précisément la croissance radiale obtenue en présence de saccharose, nous avons entrepris un examen histologique des racines. Pour cela, dans les deux conditions étudiées, nous avons prélevé les plantules après quatre semaines de culture. La date de prélèvement a été définie en fonction des activités saccharose:saccharose fructosyltransférase. En effet, à quatre semaines, cette enzyme est déjà active dans les plantules cultivées avec 20 g.l⁻¹ de saccharose alors qu'elle ne l'est pas encore dans les plantules témoins. Cette activité étant corrélée aux dépôts de fructosanes, nous avons donc supposé que cette période était la plus propice pour la mise en évidence d'une croissance en épaisseur.

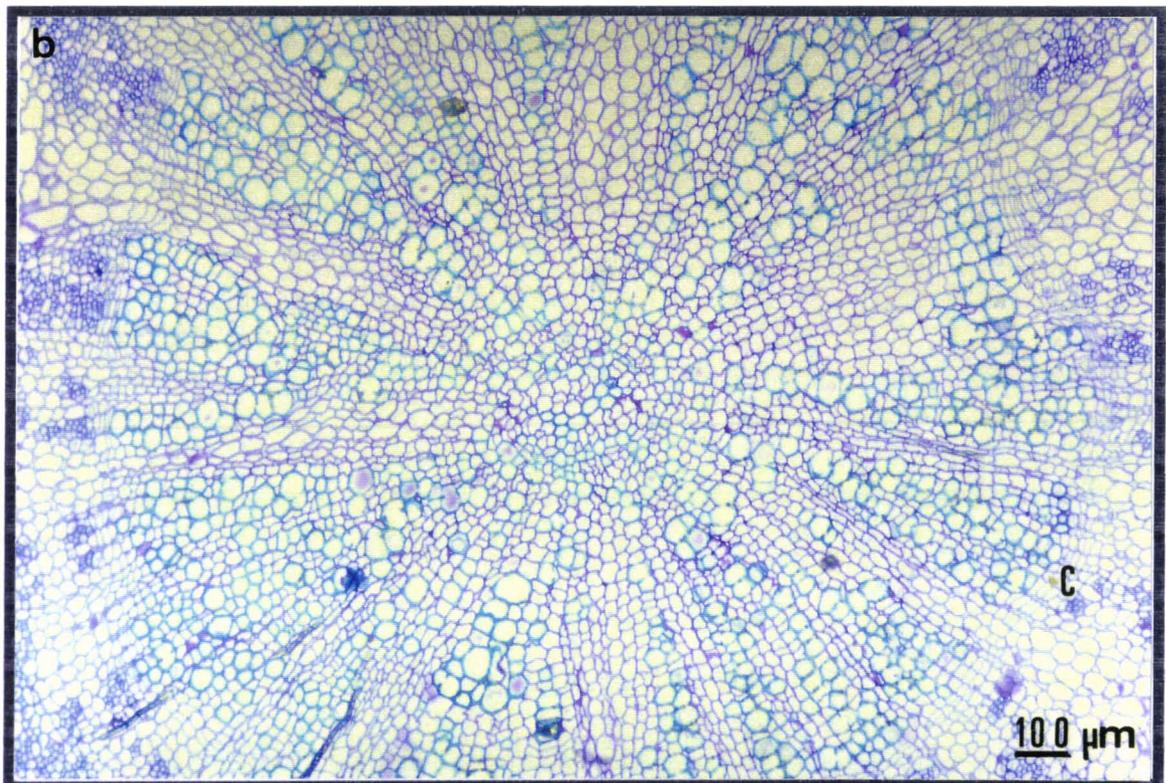
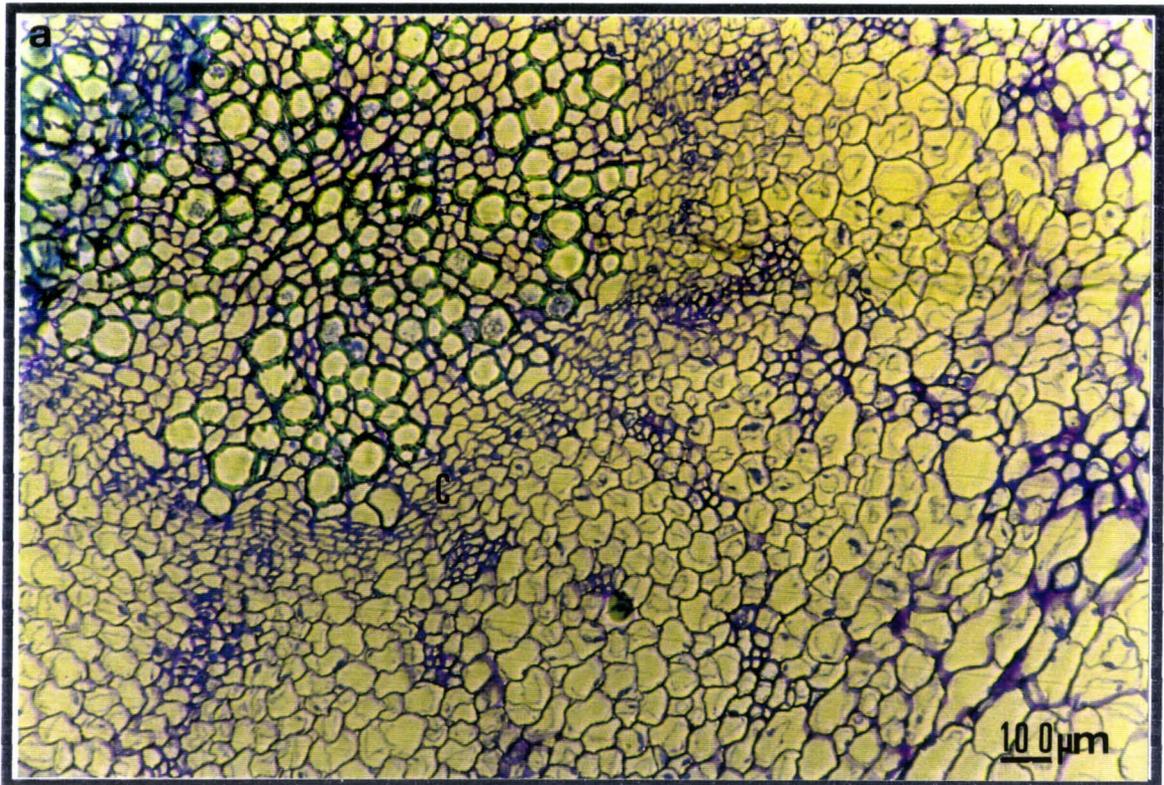


Figure XMII: Coupes transversales au niveau du collet de racines de chicorées cultivées en absence (a) ou en présence de saccharose 20 g.l^{-1} (b). C = cambium.

1- Etude histologique

Nos travaux ont été réalisés sur quatre racines différentes pour chaque milieu de culture. Les résultats obtenus montrent qu'en condition témoin (figure XVIIIa), les racines présentent déjà, au niveau du collet, une assise cambiale d'une taille voisine de 20µm composée de 4 couches cellulaires d'une largeur de 5µm chacune. Les analyses effectuées sur les racines cultivées en présence de saccharose (figure XVIIIb) révèlent, quant à elles, que l'assise cambiale est trois fois plus importante, soit environ 60 à 70 µm d'épaisseur (7 à 8 couches cellulaires).

2- Conclusion

La présence du saccharose accélère la croissance des racines de chicorée et intervient notamment sur la mise en place de l'assise cambiale. Même si cette assise cellulaire existe dans les racines témoins, il semble que celle-ci ne produise pas suffisamment de parenchyme phloémien, lieu de dépôt des fructosanes (De Proft, communication personnelle), pour permettre une accumulation de ces réserves.

DISCUSSION

I- Régulation diurnale de l'activité nitrate réductase

Comme nous l'avons mentionné dans l'analyse bibliographique, l'assimilation du nitrate est fortement induite par la lumière (pour revue Lillo, 1994). L'activité nitrate réductase *in vivo*, par la simplicité de la mise en oeuvre et la faible quantité de matériel nécessaire, nous a servi d'indicateur des modifications de l'activité de réduction du nitrate lors des transitions lumière/obscurité.

Dans nos conditions expérimentales, les jeunes plantules (21 jours) mises en culture sur un milieu inerte (perlite) contenant 7 mM de NO_3^- comme seule source azotée, présentent des variations dans l'activité nitrate réductase *in vivo* tant au niveau racinaire qu'au niveau foliaire. Celle-ci augmente rapidement dès la première demi-heure d'exposition à la lumière. Cette augmentation se poursuit pour atteindre une valeur maximale après 180 minutes, puis l'activité décroît durant les heures suivantes. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés chez d'autres espèces comme le maïs et la tomate. En effet, Lillo (1984), Galangau *et al.* (1988), Deng *et al.* (1989) ainsi que Lillo et Ruoff (1989) ont montré que l'activité nitrate réductase était élevée au début de la photopériode, puis chutait durant l'après-midi même si les plantes étaient exposées à de fortes intensités lumineuses. Ces mêmes auteurs ont observé un phénomène similaire au niveau protéique ainsi qu'au niveau moléculaire puisque les quantités d'ARNm *nia* observées fluctuaient de la même manière.

Après la réduction du nitrate en nitrite dans le cytosol, le nitrite est converti en ammonium par la nitrite réductase dans les plastes. La réduction du nitrite est totalement dépendante de la lumière puisque le donneur d'électron de cette réaction est la ferrédoxine réduite par le transport d'électron lors de la phase claire de la photosynthèse. L'inhibition de l'activité nitrate réductase à l'obscurité empêcherait l'accumulation dans les tissus des ions NO_2^- qui seraient toxiques pour la plante. La réactivation de la nitrate réductase à la lumière serait due à un apport de NADH puisque la photosynthèse représente le fournisseur principal d'ATP et de NADPH. Toutefois, la hausse de l'activité nitrate réductase s'effectue uniquement durant les premières heures d'exposition à la lumière. Ensuite, nous observons une diminution progressive de celle-ci. Ceci suggère que lorsque certains métabolites dérivés de l'assimilation du nitrate ont atteint un certain niveau de concentration cellulaire, la synthèse d'ARNm *nia* est graduellement ralentie. Deng *et al.* (1991) ainsi que Shiraishi *et al.* (1992)

ont montré que la glutamine était capable d'exercer un rétrocontrôle sur l'expression de la nitrate réductase. Le contrôle positif de la lumière associé au contrôle négatif de la glutamine prévient donc une surexpression du gène codant pour la nitrate réductase et répond à l'exigence d'un rythme soutenu de l'assimilation du nitrate.

II- L'activité nitrate réductase au cours du développement

1- La répartition de l'activité nitrate réductase dans la plante

L'étude du métabolisme azoté des végétaux supérieurs a montré que le nitrate peut être réduit dans les racines ou dans les feuilles selon les espèces. De plus, la répartition de l'assimilation du nitrate entre la racine et les feuilles varie de manière importante selon l'âge et la concentration externe en nitrate chez les non-légumineuses des régions tempérées (Andrews, 1986). Quand la réduction du nitrate a lieu dans les feuilles, le coût énergétique en terme de carbone est relativement faible car la majeure partie du pouvoir réducteur provient directement de la lumière via la ferrédoxine à partir du photosystème I. Il n'existe pas dans ce cas de compétition avec la réduction photosynthétique du CO₂. Au contraire, quand l'assimilation du nitrate a lieu dans les racines, cela implique une oxydation importante des photoassimilats transportés depuis les feuilles (Gojon, 1994).

Dans notre modèle expérimental, l'activité enzymatique est principalement observée dans les racines des jeunes plantes (21 jours) puis se localise dans la rosette de feuilles dès le quarante-neuvième jour. Des observations similaires ont été rapportées chez les chicorées cultivées en champ (Dorchies et Rambour, 1985) ainsi que chez d'autres espèces comme le coton (Radin 1974, 1975). Ainsi, l'analyse de l'évolution des activités nitrate réductase *in vitro* montre que la localisation de l'assimilation du nitrate change au cours du développement de la chicorée.

Nous mettons en évidence au cours de notre étude que les variations des teneurs en nitrate sont étroitement liées aux modifications des sites de réduction des nitrates. Comme chez de nombreuses espèces, entre autres l'orge, le maïs et le tabac, (Oaks et Hirel, 1985), il semble donc que le nitrate soit l'inducteur de la nitrate réductase. Cette induction est d'ordre

transcriptionnel chez la jeune plantule de chicorée (Palms *et al.*, 1996). Les teneurs en ARNm *nia*, estimées par Northern blot, ne sont pourtant pas modifiées lors du développement de la chicorée que ce soit dans les racines ou dans les feuilles. Aucune intervention du nitrate endogène sur la transcription du gène *nia* n'a pu être mise en évidence dans les plantules de chicorée. Toutefois, notre étude est réalisée sur une période de culture relativement longue (63 jours) avec un apport constant de nitrate. Il se pourrait donc que la présence constante de nitrate exogène induise la transcription du gène *nia* de façon constante. La divergence observée entre nos résultats et ceux de Palms *et al.* (1996) peut donc être expliquée par la différence des conditions expérimentales. En effet, Palms *et al.* (1996) ont travaillé sur des plantules sevrées durant quelques jours en azote puis de nouveau mises en présence de nitrate.

Il semble que, dans nos conditions culturales, la totalité du nitrate ne soit pas soumise à la réduction. En effet, notre analyse repose sur les variations des quantités totales de nitrate intratissulaire. Or, divers auteurs comme Ferrari *et al.* (1973), Sechley *et al.* (1991) ou King *et al.* (1992) admettent l'existence de deux pools nitriques dans les cellules, l'un serait vacuolaire et constituerait le pool de stockage inaccessible à la réduction, l'autre serait cytoplasmique et correspondrait au pool métabolique, c'est-à-dire, la fraction réductible. Nous pouvons donc penser que, dans notre cas, la majorité des ions nitrate n'aurait un rôle qu'au niveau osmotique et interviendrait dans l'équilibre ionique et qu'une faible partie serait utilisée dans l'assimilation azotée. Ainsi, la teneur en nitrate d'un organe donné de la chicorée ne constitue pas le facteur déterminant de la variation de l'activité nitrate réductase. Conformément aux observations de Shaner et Boyer (1976), c'est probablement le flux de nitrate qui régule l'activité nitrate réductase et non la teneur endogène qui est relativement faible dans les tissus de *Cichorium intybus*. De plus, il est acquis que l'assimilation du nitrate dans les feuilles est déterminée par le flux de nitrate atteignant la partie aérienne et donc par la sécrétion du nitrate dans le xylème racinaire (Gojon *et al.*, 1994).

2- Origines de la délocalisation de l'activité nitrate réductase

Quelle peut donc être la cause du changement progressif de la localisation de la réduction des nitrates? Nous allons nous intéresser aux différents facteurs qui pourraient intervenir dans ce phénomène.

2.1- Modifications morphologiques

La chicorée est une plante bisannuelle produisant, en fin de première année de culture, une racine tubérisée et une rosette de feuilles. Durant cette période de croissance végétative, trois stades de développement peuvent être distingués : un stade jeune (1,5 à 2 mois), un stade adulte (2 à 2,5 mois) et un stade sénescant (1 mois) (Améziane *et al.*, 1995).

Pour notre étude, nous nous sommes intéressés au stade jeune plantule (21 jours) et au stade correspondant à la transition entre le stade jeune et le stade adulte (35 à 63 jours). Nous remarquons une croissance des plantules lente jusqu'au quarante-neuvième jour qui s'accélère ensuite. Le diamètre du collet racinaire devient plus important à partir de la sixième semaine de culture traduisant la formation du cambium qui est à l'origine du grossissement du pivot comme le montrent les études histologiques effectuées sur des plantes âgées de six à sept semaines. Avec l'apparition du cambium un axe de développement radial se superpose à l'axe longitudinal et la croissance en épaisseur devient prépondérante.

En fait, la jeune chicorée présenterait des caractéristiques des espèces à croissance lente au niveau de l'assimilation azotée (Gojon *et al.*, 1994). En effet, au cours des six premières semaines de culture, la croissance du bouquet foliaire est lente. Durant cette période, l'activité de la nitrate réductase se situe principalement dans les racines. La mise en place de la tubérisation (croissance radiale) aux environs de la sixième semaine coïncide avec un développement plus important de l'appareil aérien. Or, à ce moment, les activités de réduction sont principalement localisées dans les feuilles. Ces travaux suggéreraient que la localisation de la réduction du nitrate dans la racine est corrélée à l'absence d'un appareil foliaire fonctionnel. Sachant que, dans les feuilles, l'ATP et le pouvoir réducteur sont fournis directement par les réactions photosynthétiques, il semblerait qu'à la mise en place de la tubérisation, l'appareil foliaire se soit suffisamment développé pour prendre en charge l'assimilation azotée.

Sechley *et al.* (1991), chez les chicorées pérennes, ont aussi montré que les modifications saisonnières de l'activité étaient corrélées aux défoliations saisonnières. Ainsi, la diminution de l'activité nitrate réductase racinaire durant l'été correspond en fait au transfert d'activité vers les feuilles. Cette activité nitrate réductase redevenait principalement racinaire lorsque l'appareil foliaire était peu présent (automne et hiver).

Durant la tubérisation, la chicorée stocke des réserves carbonées (fructosanes) mais aussi des réserves azotées principalement sous forme de nitrate, de protéine de réserve végétative (VSP) et d'acides aminés libres. A la fin de la croissance végétative, l'azote total racinaire représente 1% de la masse de matière sèche racinaire. Les protéines représentent 40% de l'azote total, le reste est stocké sous forme d'acides aminés, notamment l'arginine (Limami *et al.*, 1993). Dans nos conditions expérimentales, la glutamine, le glutamate, l'aspartate et l'asparagine augmentent au cours de la culture et représentent environ 70% des acides aminés racinaires totaux lors des dernières semaines de culture. Toutefois, comme l'ont également montré Améziane *et al.* (1997), les quantités d'arginine décelées sont très faibles dans les racines jusqu'au soixante-troisième jour. Ces auteurs précisent qu'entre le dixième et le cinquante-cinquième jour de culture l'arginine, les réserves azotées, et les VSP sont pratiquement absentes des racines des chicorées carencées en azote et présentes uniquement en faible taux dans les racines de chicorées cultivées sur de fortes concentrations d'azote.

Dans les feuilles, les teneurs en glutamine et asparagine augmentent fortement au cours de la culture alors que la teneur en aspartate diminue. La hausse des teneurs en glutamine dans la racine pourrait expliquer l'inhibition progressive de l'activité nitrate réductase racinaire. En effet, les produits finaux de l'assimilation du nitrate sont des inhibiteurs potentiels de l'activité nitrate réductase. Ainsi, l'addition de glutamine dans les milieux de culture entraîne une baisse de l'activité nitrate réductase et de la protéine nitrate réductase chez l'épinard (Shiraishi *et al.*, 1992). Des observations similaires sont rapportées par Vuylsteker (1996) qui montre que l'addition de glutamine inhibe l'activité nitrate réductase *in vivo* de racines excisées de chicorée. Cependant, cette inhibition peut être due à l'effet direct de la glutamine sur la régulation de la nitrate réductase ou à un effet inhibiteur de l'absorption du nitrate. En effet, Touraine *et al.* (1994) et Muller *et al.* (1995) ont montré que des fortes teneurs en acides aminés telle que la glutamine sont inhibitrices de l'absorption du nitrate. L'évolution des teneurs en glutamine dans les feuilles, tout en étant plus faibles que celles des racines ne permettent pas d'expliquer le transfert des activités vers les feuilles. Il semblerait que la glutamine puisse inhiber l'activité nitrate réductase mais n'ait pas d'effet prononcé dans les tissus foliaires. Deng *et al.* (1991) ont observé que l'addition de glutamine dans la solution de culture réduisait fortement l'accumulation des ARNm *nia* dans les racines de tabac mais avait des effets mineurs dans les feuilles. De tels effets de la glutamine ont été également observés chez le maïs par Li *et al.* (1995). Ainsi, la glutamine pourrait agir à différents niveaux : modulation de la transcription, modulation de la protéine nitrate réductase, inhibition de

l'absorption du nitrate. Dans notre cas, seules les deux dernières actions de l'acide aminé peuvent être retenues puisque nous n'observons pas de modification de l'activité transcriptionnelle.

2.3- Mécanismes de phosphorylation-déphosphorylation

Le taux d'activation de la nitrate réductase chute dans les racines dès le quarante-deuxième jour de culture alors qu'il croît continuellement dans les feuilles. Ces données peuvent nous permettre d'attribuer l'inhibition de la protéine au moins au mécanisme de la phosphorylation de la nitrate réductase. Ainsi, la teneur en nitrate réductase racinaire phosphorylée augmente au cours du développement des plantules alors que la teneur en nitrate réductase phosphorylée foliaire chute. La présence d'une protéine inhibitrice (NIP 14-3-3) provoquerait l'inactivation réversible de l'enzyme (MacKintosh *et al.*, 1995) et justifierait les profils d'activités obtenus. De plus, la phosphorylation des protéines représente un mécanisme important concernant le contrôle des métabolismes azoté et carboné dans les tissus végétaux. Plusieurs auteurs ont suggéré que la protéine kinase nitrate réductase pouvait être régulée par un produit final du métabolisme carboné plutôt que par un produit dérivé du métabolisme azoté (Huber *et al.*, 1993, Kaiser et Huber, 1994). Mac Michael *et al.* (1995) ont aussi démontré que les protéines kinases impliquées dans le mécanisme de phosphorylation de la nitrate réductase et de la saccharose phosphate synthase représentaient le même type de protéine kinase pour les deux enzymes.

2.4- Le pouvoir réducteur

Dans les cellules de chicorée, l'activité nitrate réductase est dépendante du NADH (Chraïbi, 1988). La fourniture du NADH à la nitrate réductase par le biais de la glycolyse a été prouvée au cours de nombreux travaux (Bloom *et al.*, 1989; pour revue Sivasankar et Oaks, 1996). Lillo (1994) a également montré que l'enzyme pouvait être sensible au rapport NADH/NAD⁺ c'est-à-dire active lorsque ce rapport est supérieur à 1 ou inactive lorsque ce rapport est inférieur à 1. La mise en place de la tubérisation en affectant la disponibilité en NADH pourrait modifier l'activité nitrate réductase racinaire. Une baisse de NADH pourrait rapidement inactiver la nitrate réductase (Lillo, 1994). Il s'agirait dans notre cas d'une compétition entre le métabolisme azoté et le métabolisme carboné. Cependant, pour valider

cette hypothèse, il faudrait effectuer des dosages de NADH dans nos tissus racinaires au cours du développement. Toutefois, la labilité du NADH endogène et la faiblesse des signaux obtenus par les dosages de bioluminescence rendent difficiles sa quantification (Vuylsteker, 1996). En physiologie animale, une technique de quantification de NADH par fluorescence a été développée et permet de mesurer *in situ* les variations de la quantité de NADH dans les tissus des cellules isolées ou même des mitochondries isolées (Riepe *et al.*, 1996, Wakita *et al.*, 1995). L'adaptation de cette technique aux tissus végétaux devrait permettre de quantifier le NADH de manière satisfaisante dans les racines de chicorée.

III- L'assimilation du saccharose au cours du développement

L'assimilation du nitrate exige un apport d'énergie et de pouvoir réducteur qui peuvent provenir du catabolisme des sucres. De plus, la tubérisation de la racine de chicorée s'accompagne d'une accumulation de réserves carbonées sous forme de fructosanes qui vont représenter jusqu'à 80% de la matière sèche (Fiala et Jolivet, 1984). C'est pourquoi il est nécessaire de comprendre comment évolue le métabolisme du saccharose, produit de la photosynthèse, lors des premiers stades de la croissance végétative de la chicorée.

1- Assimilation carbonée dans les jeunes plantes de chicorée (0 à 42 jours)

Les activités des invertases acide et neutre, de la saccharose synthase, de la saccharose:saccharose fructosyltransférase et de la fructosane:fructosane fructosyltransférase, cinq enzymes impliquées dans l'hydrolyse du saccharose ont été étudiées. Durant cette période de croissance, seules les activités des trois premières enzymes sont mesurables tant au niveau racinaire qu'au niveau foliaire. L'invertase acide est l'enzyme présentant l'activité la plus importante dans les organes précités. Il semble donc que cette enzyme fournisse les racines et les feuilles en hexoses pour leur croissance et leurs divisions cellulaires. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Wang *et al.* (1993), Harn *et al.* (1993) et Sung *et al.* (1994) qui montrent que l'activité invertase acide est principalement décelée dans les puits métaboliques au sein desquels les hexoses nécessaires à la respiration et à la production des squelettes carbonés seront produits.

Jusqu'au quarante-deuxième jour de culture, les teneurs en glucose et fructose augmentent régulièrement dans les racines indiquant une étroite corrélation avec les activités invertase acide.

2- Assimilation carbonée dans les jeunes plantes de chicorée (49 à 63 jours)

Entre le quarante-neuvième et le soixante-troisième jour, le carbone assimilé est préférentiellement utilisé pour la mise en réserve plutôt que pour la croissance des plantes. En effet, nous observons une chute de l'activité invertase acide et surtout l'apparition des activités saccharose:saccharose fructosyltransférase et fructosane:fructosane fructosyltransférase dans les racines. Ces activités enzymatiques, menant à la formation des fructosanes, augmentent régulièrement dès leur apparition. Nous notons aussi une légère hausse de l'activité saccharose synthase dans les racines. Ces données nous suggèrent que la production de la racine tubérisée, et donc de tissus de réserves et que la phase de croissance structurale sont séparées temporellement durant les premiers stades de la croissance végétative. Heilmeyer et Monson (1993) ainsi que Steinlein *et al.* (1993) ont montré ainsi que, chez certaines espèces, la production de tissus de réserves pouvait être séparée temporellement de plusieurs semaines de la croissance des feuilles et des racines.

Durant cette période de croissance, les teneurs en glucides sont fortement modifiées. En effet, dès le quarante-neuvième jour, le 1-kestose et le 1-nystose, produits respectivement par la saccharose:saccharose fructosyltransférase et la fructosane:fructosane fructosyltransférase, apparaissent dans les tissus racinaires et le fructose diminue, ce qui confirme les activités enzymatiques. Une hausse des teneurs en glucose est observable au quarante-neuvième jour suivie d'une baisse au cours des deux dernières semaines. Le glucose libéré par les activités de la saccharose:saccharose fructosyltransférase et de la fructosane:fructosane fructosyltransférase pourrait être recyclé en saccharose par l'intermédiaire de la saccharose synthase. La plante aurait ainsi à sa disposition de nouvelles molécules de substrat en complément à celles produites par la photosynthèse. Améziane *et al.* (1997) ont d'ailleurs montré que l'activité saccharose synthase des racines de chicorée en phase de sénescence (120 à 165 jours après l'ensemencement) était trois à quatre fois supérieure à celle détectée chez les jeunes plantes. Cette enzyme permettrait peut-être de recycler le glucose produit pendant la phase d'accumulation des fructosanes ainsi que le fructose produit par l'hydrolyse de l'inuline durant la croissance de la rosette de feuilles en début de deuxième année de culture.

L'analyse des glucides indique une augmentation des teneurs en saccharose dans les racines au cours de cette période. Il semblerait qu'une force d'appel du puits racinaire vis à vis du saccharose se mette en place lors des trois dernières semaines de culture. Des études réalisées par Labhart *et al.* (1983) chez *Festuca pratensis* ont également montré une augmentation des concentrations en saccharose au début de l'accumulation des fructosanes. La création d'un gradient de concentration en saccharose est contrôlée, entre autres, par le niveau d'utilisation du saccharose dans les tissus puits (Ho, 1988).

3- Le transport du saccharose au cours du développement

Nous avons utilisé la technique de marquage *in situ* en déposant du saccharose marqué radioactivement sur une feuille adulte après abrasion de la cuticule.

Au stade jeune plantule, il apparaît que le saccharose est principalement utilisé par le bouquet foliaire. Le saccharose alloué à la plante servirait surtout à la croissance plutôt qu'à la mise en réserve. Ensuite, nos résultats permettent de confirmer la mise en oeuvre d'une force d'appel du puits racinaire puisque le pourcentage de saccharose exporté vers la partie racinaire augmente du trente-cinquième au soixante-troisième jour. Selon Pollock et Chatterton (1988), la synthèse de fructosanes à partir de saccharose augmenterait sans conteste la concentration de cette molécule dans les tissus mais agirait aussi sur le transport des sucres. Améziante *et al.* (1995) montrent également que le carbone assimilé durant la formation des fructosanes est, pour la majeure partie, dirigé vers les compartiments de stockage de la racine (au moins 80%), alors qu'une large proportion de carbone assimilé par les jeunes plantes est utilisé immédiatement pour fournir de l'énergie nécessaire à la croissance de la chicorée tant au niveau racinaire qu'au niveau foliaire.

4- Régulation du métabolisme carboné

La forte corrélation entre le niveau de transcription des enzymes hydrolysant le saccharose (l'invertase acide et la saccharose:saccharose fructosyltransférase) et leurs activités enzymatiques indique que la régulation de ces gènes se situe au niveau transcriptionnel. L'invertase acide est active dans les tissus jeunes et fournit des hexoses nécessaires à la croissance des systèmes racinaire et foliaire. Dès la mise en place de la tubérisation, le gène codant pour la saccharose:saccharose fructosyltransférase est exprimé dans la racine où il

entraîne la synthèse et l'accumulation des fructosanes alors que le gène codant pour l'invertase acide est peu à peu réprimé. Sturm *et al.* (1995). ont également montré, chez la carotte, que les gènes de l'invertase acide et de la saccharose synthase sont exprimés différemment selon l'organe étudié (feuille ou racine) et selon le stade de développement de la plante. L'expression du gène codant pour l'invertase acide pariétale évolue en fonction du développement de la carotte. Ainsi, de hauts niveaux de transcription sont observés uniquement dans les plantes présentant des racines primaires avec des teneurs équivalentes dans les racines et les feuilles. Les transcrits de la saccharose synthase ont été décelés en de très faibles quantités dans tous les organes en développement mais étaient présents dans les jeunes feuilles ainsi que dans la racine tubérisée. Il semblerait que le modèle chicorée et le modèle carotte soient très proches puisque nous observons, dans les deux systèmes étudiés, une expression de l'invertase acide dans les tissus jeunes ainsi qu'une activité saccharose synthase faible et surtout localisée dans les organes tubérisés (Améziane *et al.*, 1997)

IV- Influence du saccharose sur le développement de la chicorée

Nous avons montré que l'apparition des activités des enzymes du métabolisme des fructosanes était corrélée à une augmentation de l'allocation des sucres à la racine ainsi qu'à une baisse de l'activité nitrate réductase. Lors de la mise en place de la tubérisation, la réduction des nitrates entrerait en compétition avec les activités de synthèse d'inuline, en particulier l'activité saccharose:saccharose fructosyltransférase qui catalyse la première étape de la synthèse des fructosanes et ainsi utilise le saccharose. Il nous a donc semblé intéressant d'analyser l'influence d'un apport exogène de saccharose sur la morphologie et la physiologie de la chicorée.

La présence de saccharose dans le milieu de culture modifie la croissance des plantules en favorisant le développement de la chicorée lorsqu'il est apporté à raison de 5 à 20 g.l⁻¹. La plus forte croissance, tant au niveau foliaire qu'au niveau racinaire est observée en présence de 20 g.l⁻¹ de saccharose. Toutefois, une concentration équivalente à 30 g.l⁻¹ limite la croissance des plantes de façon significative. La croissance des chicorées cultivées en présence de 30 g.l⁻¹ est alors voisine de la croissance des plantes cultivées en présence de 15 g.l⁻¹ de saccharose. Cet effet inhibiteur observé en présence d'une très forte concentration en

saccharose pourrait avoir pour origine un stress osmotique du fait de l'influence de la molécule sur le potentiel hydrique du milieu. La plante, dans ces conditions, rencontrerait des difficultés pour absorber de l'eau et par conséquent des éléments minéraux contenus dans le milieu.

La fourniture de saccharose 20 g.l^{-1} accélère l'épaississement de la racine et donc la mise en place de la tubérisation. Des analyses histologiques effectuées sur des racines de plantules de chicorée cultivées en présence de saccharose 20 g.l^{-1} montrent, au niveau du collet racinaire, un cambium trois fois plus développé que celui observé en absence de saccharose. Le saccharose induirait une accélération de l'activation des cellules corticales qui vont donner naissance à un cambium. Ceci montrerait que le saccharose serait sur une voie de signalisation de la tubérisation.

L'analyse des capacités photosynthétiques des plantules de chicorée révèle une hausse corrélée à l'augmentation de la concentration de saccharose exogène. A l'inverse, le rapport Fv/Fm (indicateur du potentiel photochimique du photosystème II) diminue en présence de concentrations croissantes en saccharose. Nous obtenons ainsi une utilisation de seulement 50% du potentiel photochimique en présence de 20 g.l^{-1} de saccharose.

L'augmentation des capacités photosynthétiques pourrait s'expliquer par l'amélioration de la croissance des plantes, et notamment par le développement accru des parties foliaires, en présence de saccharose. La baisse du potentiel photochimique, quant à elle, correspondrait à une utilisation préférentielle du saccharose fourni à la plante dans le milieu de culture par rapport à celui produit par le mécanisme de la photosynthèse.

De nombreux travaux sur les relations entre les teneurs en glucides et les taux de photosynthèse ont été réalisés. Selon la teneur en métabolites et/ou des produits finaux sous des conditions spécifiques, des mécanismes de régulation sont activés afin de coordonner le niveau photosynthétique et le niveau de synthèse du saccharose. Ainsi, l'utilisation des tabacs et des tomates transgéniques surexprimant une invertase pariétale de levure a permis de montrer que l'accumulation d'hydrates de carbone inhibait la photosynthèse, et influençait positivement la croissance (Von Schaewen *et al.*, 1990; Dickinson *et al.*, 1991). L'accumulation excessive de glucides dans les feuilles, lorsque la demande des puits est inférieure à la production de photoassimilats, entraîne également des altérations de la photosynthèse et de distribution des hydrates de carbone dans les feuilles (Krapp *et al.*, 1991;

Goldschmidt et Huber, 1992; Daie, 1993). A partir de ces observations, plusieurs équipes ont suggéré que le rétrocontrôle par le saccharose ou les hexoses correspondait à un mécanisme à long terme impliquant la régulation de l'expression des gènes (Sheen, 1990, 1994; Stitt *et al.*, 1990).

Ces études renforcent donc notre hypothèse selon laquelle le saccharose exerce, entre autre, un rétrocontrôle sur la photosynthèse. La plantule pourrait absorber une quantité plus importante de saccharose qui modifierait la distribution des glucides dans la plante entière et par conséquent les rapports source/puits de la plante qui semblent être à la base du contrôle de la photosynthèse (Goldschmidt et Huber, 1992).

V- Influence du saccharose sur le métabolisme azoté

1- La répartition de l'activité nitrate réductase dans la plante

Chez les chicorées cultivées en absence de saccharose, l'assimilation des nitrates est dans un premier lieu localisée dans les racines puis se déplace vers le bouquet foliaire aux alentours de la sixième semaine de culture. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux observés pour la culture sur perlite et en champ (Dorchies et Rambour, 1985). Etonnamment, la localisation de l'assimilation du nitrate est modifiée par un apport de saccharose exogène. En présence de 20 g.l⁻¹ de saccharose dans le milieu de culture, l'assimilation se situe majoritairement dans les racines durant toute l'expérimentation (8 semaines). La réduction des nitrates est consommatrice d'importantes quantités de saccharose, qui fournissent à la fois le pouvoir réducteur et les squelettes carbonés (Huppe et Turpin, 1994).

En effet, ces fonctions du saccharose pourraient expliquer la persistance de l'assimilation racinaire. Il se pourrait que cet apport soit suffisant pour éviter que la réduction ait lieu sur le site même de la photosynthèse. Ceci peut d'ailleurs être corrélé à la baisse de l'efficacité photosynthétique du bouquet foliaire en présence de saccharose ce qui signifie que l'apport de saccharose dans la racine évite un flux d'assimilats des feuilles vers la racine et qu'un signal d'origine racinaire renseigne la partie aérienne qu'il peut y avoir une économie de photosynthèse.

L'observation des teneurs en nitrate dans les racines et les feuilles montre que le saccharose favorise la distribution foliaire du nitrate dans la plante. Trois hypothèses peuvent être émises :

(1) La présence du nitrate dans les feuilles est corrélée aux faibles activités de réduction.

(2) La présence du nitrate dans les feuilles est corrélée à la fonction d'osmoticum de l'ion nitrate pour équilibrer la présence du saccharose.

(3) La présence de saccharose favorise l'absorption et le flux de nitrate vers les parties foliaires. En effet, l'absorption du nitrate par les racines nécessite de l'énergie (Bloom *et al.*, 1992, Grignon *et al.*, 1997) qui pourrait être fournie directement par l'absorption du saccharose.

Seule une étude basée sur l'utilisation du nitrate marqué à l'azote ^{15}N et sur le suivi des produits de son assimilation dans les différents organes ainsi que dans la sève brute permettrait d'obtenir une réponse.

L'analyse de l'expression du gène *nia* dans les racines et les feuilles de chicorée cultivées en absence ou en présence de saccharose ne révèle aucune modification du niveau de la transcription quels que soient la condition de culture et/ou l'organe étudié. Ceci suggère donc que l'effet du saccharose ne se situe pas au niveau transcriptionnel. Pourtant, Cheng *et al.* (1992) rapportent un effet transcriptionnel du saccharose sur la nitrate réductase. Cette divergence peut s'expliquer par la différence des conditions expérimentales utilisées. En effet, dans notre cas, nous cultivons les chicorées sur un milieu contenant du saccharose et nous observons l'expression du gène *nia* au cours de la croissance donc à long terme. Par contre, Cheng *et al.* (1992) sévrent les plantules d'*Arabidopsis* sur un milieu exempt de saccharose afin de diminuer les réserves carbonées. Leur étude porte ensuite sur une induction de la nitrate réductase par le saccharose après quelques heures de contact donc à court terme.

Aucune régulation transcriptionnelle n'étant observable, nous nous sommes intéressés aux modifications post transcriptionnelles. Le taux d'activation de la nitrate réductase racinaire et foliaire en condition témoin devient plus important dans les feuilles dès la sixième semaine. Par contre, en condition 20 g.l⁻¹ de saccharose, le taux d'activation de la nitrate réductase racinaire est constamment supérieur à celui des feuilles. Ces données permettraient de montrer que l'effet du saccharose sur la régulation de l'assimilation du nitrate se situerait

au niveau post-transcriptionnel par un système de phosphorylation/déphosphorylation de la protéine nitrate réductase.

VII- Influence du saccharose sur le métabolisme carboné

L'analyse des activités des diverses enzymes du métabolisme du saccharose révèle un point important : seules l'invertase acide et la saccharose:saccharose fructosyltransférase ont une activité modifiée par la présence de saccharose dans le milieu de culture. En condition témoin, les profils d'activités enzymatiques de l'invertase acide sont similaires à ceux observés pour l'activité nitrate réductase ; ceci indique que les voies d'assimilation du nitrate et du saccharose sont étroitement liées. Cependant, de façon surprenante, en présence de 20 g.l⁻¹ de saccharose, l'activité de l'invertase acide est constamment située dans les parties foliaires de la plante.

Ces données nous suggèrent que le surplus de saccharose absorbé par les racines serait transporté jusqu'aux feuilles. Cette observation peut tout à fait être corrélée aux résultats concernant le potentiel photosynthétique. En effet, la diminution de ce dernier dans les plantules cultivées en présence de saccharose comparativement aux plantules cultivées en absence de saccharose peut s'expliquer par la présence de concentrations importantes de saccharose dans les feuilles. Pour vérifier cette hypothèse, il nous faudrait effectuer une expérience de marquage à l'aide de saccharose marqué au ¹⁴C présent dans le milieu de culture. Celle-ci nous permettrait de suivre et de comprendre la distribution des glucides dans la plante cultivée en présence de saccharose.

De plus, il est intéressant de noter que cette enzyme, caractérisant les tissus jeunes à croissance rapide (Morris et Arthur, 1985; Berghall, 1997), voit son activité chuter respectivement à la sixième et à la quatrième semaine de culture pour les conditions témoin et saccharose 20 g.l⁻¹. Ces résultats suggèrent que, selon les conditions expérimentales, la racine des chicorées évolue vers la fonction d'organe de stockage de réserves carbonées à ces différentes périodes de développement.

Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par les activités saccharose:saccharose fructosyltransférase et par l'analyse qualitative des glucides racinaires. En effet, l'activation de la saccharose:saccharose fructosyltransférase et l'apparition du 1-kestose sont parallèles à la baisse de l'activité invertase acide.

Les analyses de l'expression des gènes invertase acide et saccharose:saccharose fructosyltransférase montrent que les modifications des pools enzymatiques seraient d'ordre transcriptionnel.

Le dosage des glucides racinaires permet de confirmer les résultats obtenus dans la première partie de notre travail. En effet, nous remarquons une hausse des hexoses au cours des premières semaines de culture reflétant l'activité invertase acide. Nous observons également une hausse des concentrations en saccharose respectivement à la sixième et la quatrième semaine de culture en absence et en présence de saccharose c'est à dire l'existence d'une force d'appel du puits racinaire vis à vis du saccharose lors du stockage des fructosanes (Pollock et Chatterton, 1988; Améziane *et al.*, 1995).

L'ensemble de ces résultats tend à suggérer que le saccharose permet une accélération de la mise en place de la tubérisation. Il agirait en activant l'expression d'enzymes menant à la synthèse de sucres de réserve. Parallèlement, il atténuerait la compétition naturelle entre les voies d'assimilation du nitrate et du saccharose au cours de la tubérisation.

Les résultats montrent que l'architecture de la racine dépend effectivement du métabolisme carboné. Nous pouvons supposer que, dans les conditions habituelles de croissance, c'est l'intensité de la photosynthèse qui gouverne la mise en place de la structure racinaire. L'évolution vers une croissance radiale nécessite une activation des cellules corticales qui vont constituer un cambium. La division des cellules cambiales va nécessiter de l'énergie et la fréquence des divisions va donc dépendre de la vitesse d'importation du saccharose. Le fait d'apporter du saccharose dans le milieu de culture démontre bien la compétition qui peut exister entre l'assimilation du nitrate, la croissance et la division cellulaire. Si la source carbonée est présente directement dans la racine, elle doit fournir suffisamment d'énergie pour soutenir la réduction du nitrate indispensable à la synthèse protéique et à la division cellulaire.

En absence de saccharose exogène la source énergétique est localisée dans la feuille et la vitesse de photosynthèse constitue le facteur limitant de la division cellulaire.

Au champ, la graine semée au début du mois de mai va, après germination, structurer sa racine dans le sens d'une absorption d'eau et de sels minéraux, d'où une croissance longitudinale et la production de racines latérales. Puis, après environ six semaines, la durée du jour et l'intensité lumineuse permettent vraisemblablement une photosynthèse active qui va

donc supporter la réduction du nitrate ainsi que l'exportation de saccharose vers la racine où il sera utilisé pour la croissance et progressivement mis en réserve sous forme d'inuline.

Cette programmation spatio-temporelle est sous le contrôle des gènes qui codent pour les enzymes impliquées dans ce métabolisme. Il est, en effet, vraisemblable que la transcription de la nitrate réductase dans les cellules du tubercule est nulle lorsque ce dernier est totalement développé. La question demeure de savoir quels sont les signaux qui régulent le passage d'un programme à l'autre.

**CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES**

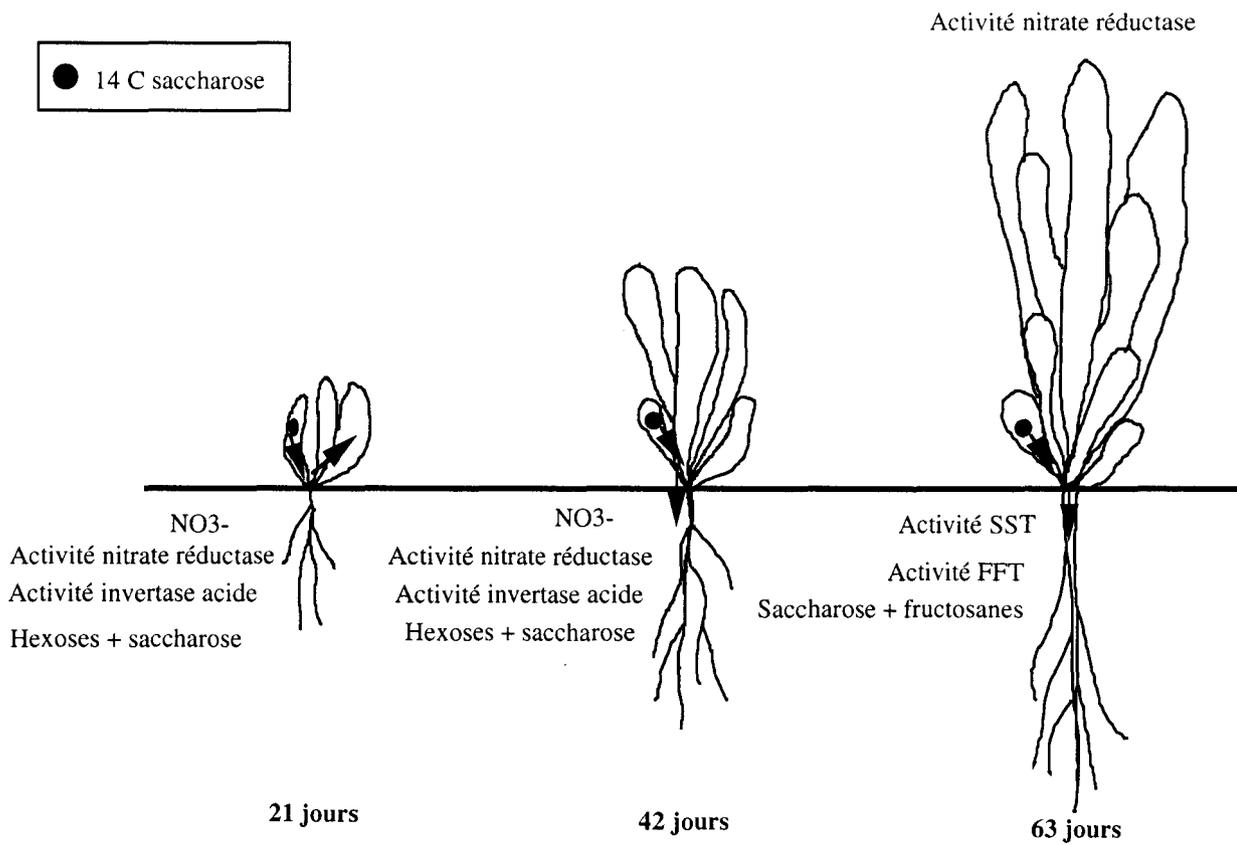


Figure 1: Modifications morphologiques et physiologiques durant le développement de la chicorée cultivée sur perlite.

I- Conclusions

Des études entreprises au laboratoire et concernant la localisation de la réduction du nitrate au cours du développement de chicorées cultivées en champs ont montré que, lors de la mise en place de la tubérisation, l'activité nitrate réductase était transférée de la racine vers les feuilles. Nous avons repris cette étude sur des plantes cultivées en environnement contrôlé afin de caractériser plus précisément ce phénomène.

Les résultats obtenus au cours de la première partie de ce travail montrent que, dans notre modèle expérimental, de nombreuses modifications morphologiques et physiologiques s'établissent au cours du développement.

Lors des premiers stades de développement, entre 21 et 42 jours, les activités de réduction du nitrate sont principalement situées dans les racines. De même, les teneurs en nitrate sont plus élevées dans ces organes. Concernant le métabolisme carboné, seule l'activité invertase acide est fortement représentée dans les racines; ceci est d'ailleurs en parfaite corrélation avec les teneurs en hexoses et saccharose racinaires. Durant cette période, le saccharose synthétisé dans les feuilles les plus âgées est transporté vers les feuilles les plus jeunes. Puis, à la fin de cette période, il se forme un cambium et nous observons un transport du saccharose marqué au carbone 14 vers les racines plutôt que vers les feuilles. Ces deux dernières constatations sont les prémices des modifications qui se mettent en place dès cette période.

Ainsi, chez les plantes âgées de 63 jours, nous observons un changement important dans les métabolismes azoté et carboné des chicorées. L'assimilation du nitrate a lieu dans les parties foliaires et l'activité invertase acide, caractéristique des tissus jeunes, a brutalement diminué dans les racines. L'apparition des activités saccharose:saccharose fructosyltransférase et fructosane:fructosane fructosyltransférase dans les racines, la présence de fructosanes et de teneurs élevées en saccharose ainsi qu'une importation massive du saccharose marqué depuis les feuilles âgées indiquent que la racine de chicorée acquiert sa fonction d'organe puits et de mise en réserves; la croissance radiale a débuté. Il s'agirait d'une régulation au niveau post-transcriptionnel (mécanisme de phosphorylation /déphosphorylation) de la nitrate réductase et au niveau transcriptionnel du métabolisme carboné. Ces modifications sont présentées dans la figure 1.

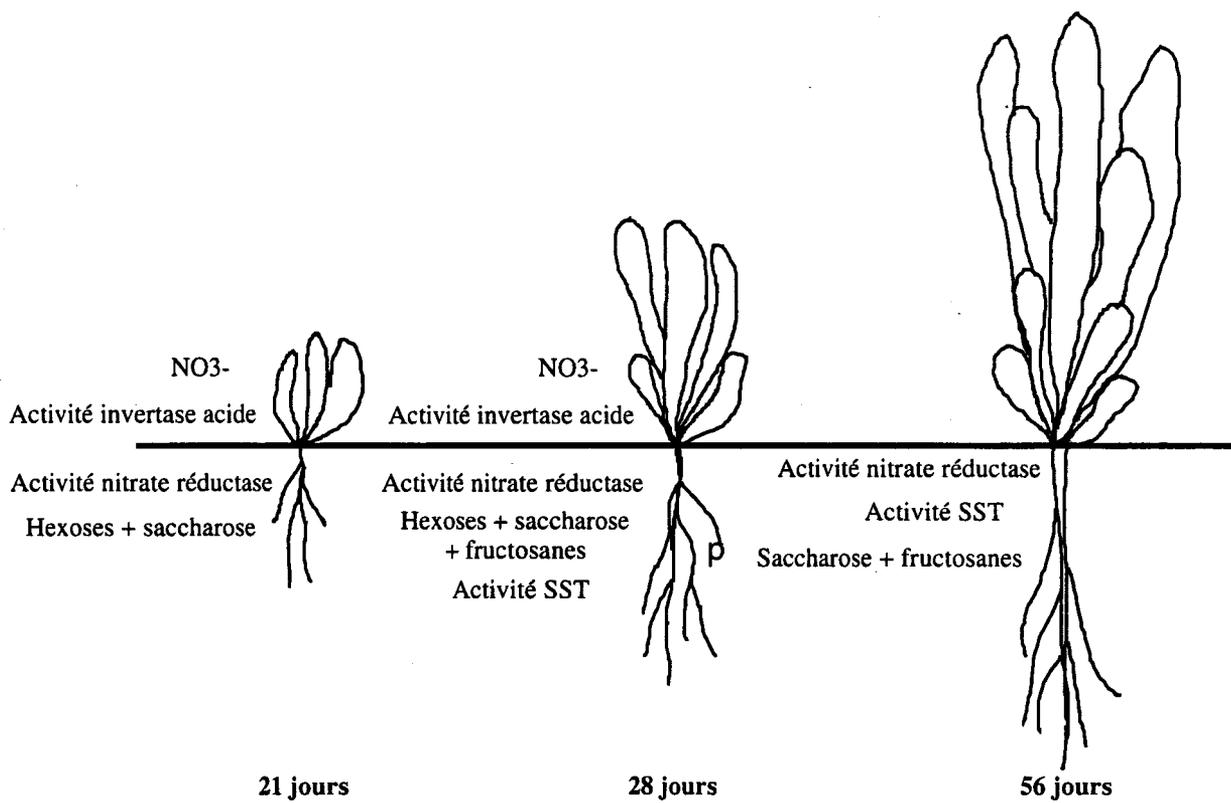


Figure 2 : Modifications morphologiques et physiologiques durant le développement de la chicorée cultivée en présence de saccharose.

A la fin de ce travail, nous privilégions l'hypothèse d'une modification de la localisation de l'assimilation azotée liée à la modification du métabolisme carboné. Cette modification est due au changement d'orientation de la fonction racinaire au cours du développement de la chicorée. Le métabolisme carboné utilise le saccharose non plus à des fins purement énergétiques mais surtout à des fins de mise en réserves qui s'accompagne de la mise en place de la tubérisation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris une étude concernant l'influence d'un apport massif de saccharose dans le milieu de culture sur la mise en place de la tubérisation.

Dans de telles conditions de culture (figure 2), nous montrons que l'assimilation du nitrate est majoritairement réalisée dans les racines durant le développement de la chicorée. A l'opposé, le nitrate et les activités invertase acide sont principalement détectées dans le bouquet foliaire. Ces données suggèrent que le saccharose, puisque les capacités photosynthétiques sont fortement diminuées - et peut-être les ions nitrates - présents dans le milieu de culture, sont transportés vers les parties aériennes de la plante. De plus, dès le vingt-huitième jour, l'activité saccharose:saccharose fructosyltransférase est observée dans les racines ainsi que l'apparition de composés de réserves : les fructosanes. Des analyses histologiques montrent également qu'une assise cambiale se développe à ce stade de croissance alors que ce n'est pas le cas en condition témoin (sans saccharose). Il semble donc que l'apport de saccharose exogène accélère la mise en place de la tubérisation ainsi que le dépôt d'inuline dans le parenchyme phloémien. Il atténuerait la compétition naturelle existant entre les métabolismes azoté et carboné dans la racine de chicorée en cours de tubérisation. Le saccharose serait en fait utilisé à la fois comme source de squelettes carbonés et d'énergie pour l'assimilation du nitrate dans la racine et comme précurseur de composés de réserves par la formation de fructosanes.

II- Perspectives

Notre travail a permis de déterminer que la mise en place de la tubérisation était corrélée à une baisse de l'activité nitrate réductase dans les racines et à l'apparition de l'activité saccharose:saccharose fructosyltransférase.

Les modifications observées dans le métabolisme azoté ne sont pas d'ordre transcriptionnel. Dans la mesure où les teneurs en nitrate sont étroitement corrélées aux activités de la nitrate réductase, nous pouvons retenir pour l'instant l'hypothèse d'une régulation « métabolique ». Afin de vérifier celle-ci, des tests ELISA, une étude approfondie des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation ainsi qu'une étude du métabolisme des acides aminés sont à envisager. Des résultats préliminaires montrent d'ailleurs une possible intervention des deux derniers mécanismes.

La différenciation des tissus secondaires (xylème II et phloème II) coïnciderait avec l'apparition des activités saccharose:saccharose fructosyltransférase. Cette enzyme pourrait être un marqueur de la différenciation du parenchyme phloémien. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression spatio-temporelle de celle-ci par hybridation *in situ* mais, également, de définir de façon précise la relation entre les modifications morphologiques de la racine (croissance longitudinale puis croissance radiale) et la mise en réserve des fructosanes ainsi que la localisation du dépôt d'inuline dans les racines de chicorées.

La recherche de signaux potentiels marquant le passage de la croissance longitudinale à la croissance radiale de la racine représente aussi un point essentiel dans la suite de nos travaux. Cette recherche peut être actuellement envisagée par l'utilisation de la technique dite AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Cette technique très récente est basée sur l'amplification simultanée par PCR de plusieurs fragments de restriction et sur leur détection par gel de séquençage (Zabeau et Vos, 1993). Nous avons par notre étude déterminé que le passage vers la tubérisation avait lieu aux environs de la sixième et de la septième semaine. Ainsi, en utilisant des jeunes plantules (3 semaines) et des plantules en début de tubérisation (6/7 semaines), nous serons à même d'analyser l'expression différentielle de gènes à chacun des stades physiologiques. La comparaison des séquences obtenues nous permettra de caractériser les gènes présents uniquement lors de la mise en place de la tubérisation. Il s'agira ensuite de les isoler et de les cloner. Cette étude ouvre de larges perspectives puisqu'une analyse précise de chacun des gènes clonés sera à effectuer (séquençage, détermination, étude de la régulation par Northern et par hybridation *in situ* ...). Il est en effet probable que nous puissions retrouver les modifications de l'expression des gènes qui codent pour les fonctions métaboliques décrites précédemment, mais aussi l'expression de gènes qui régulent

l'activation puis la division cellulaire des cellules cambiales et la différenciation des tissus secondaires.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Albrecht G., Biemelt S., Baumgartner S. (1997). Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances. *New Phytol.* **136**, 137-144.

Améziane R., Limami M.A., Noctor G., Morot-Gaudry J.F. (1995). Effect of nitrate concentration during growth and carbon partitioning and sink strength in chicory. *J. Exp. Bot.* **46**, 1423-1428.

Améziane R., Deléens E., Noctor G., Morot-Gaudry J.F., Limami M.A. (1997a). Stage of development is an important determinant in the effect of nitrate on photoassimilate (^{13}C) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). *J. Exp. Bot.* **48**, 25-33.

Améziane R., Richard-Molard C., Deléens E., Noctor G., Morot-Gaudry J.F., Limami M.A. (1997b). Nitrate ($^{15}\text{NO}_3$) limitation affects nitrogen partitioning between metabolic and storage sinks and nitrogen reserve accumulation in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Planta* **202**, 303-312.

Andrews M. (1986). The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant, Cell Environ.* **9**, 511-519.

Andrews M., Sutherland J.M., Thomas R.J., Sprent J.I. (1984). Distribution of nitrate reductase activity in six legumes : The importance of the stem. *New Phytol.* **98**, 301-310.

Ap Rees T. (1974). Pathways of carbohydrate breakdown in higher plants. Dans DH Northcote ed. Biochemistry, Series 1, vol. II : Plant biochemistry. Butterworth, London. 89-127.

Ap Rees T. (1988). Hexose phosphate metabolism by non photosynthetic tissues of higher plants. Dans The biochemistry of plants, vol. 14, Carbohydrates. J. Preiss ed. Academic press, San Diego, CA. ISBN 0-12-675414-4. 1-33.

Arai M., Mori H., Imaseki H. (1992). Cloning and sequence of cDNAs for an intracellular acid invertase from etiolated hypocotyls of mung bean and expression of the gene during growth of seedlings. *Plant Cell Physiol.* **33**, 245-252.

Aslam M., Travis R.L., Huffaker R.C. (1992). Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **99**, 1124-1133.

Avigad G. (1982). Sucrose and others disaccharides. Dans encyclopedia of plant physiology. Plant carbohydrate. Pirson et Zimmermann eds.. Springer et Verlag. **13A**, 233-241.

Bachmann M., Huber J.L., Athwal G.S., Wu K., Ferl R.J., Huber S.C.(1996). 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Letters* **398**, 26-30.

Baker N.R. (1991). A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Plant* **81**, 563-570.

Barr R., Böttger M., Crane F.L., Morré D.J. (1995). Nitrate reductase activity of plasma membranes from cultured carrot cells. *Protoplasma* **184**, 151-157.

Beevers L., Hageman R.H. (1969). Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**, 495-522.

Berghall S., Briggs S., Elsegood S.E., Eronen L., Kuusisto J.O., Philip E.J., Theobald T.C., Walliander P. (1997). The role of sugar beet invertase and related enzymes during growth, storage and processing. *Zuckerind.* **122** , 520-530

Bialeski R.L. (1993). Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. *Plant Physiol.* **103**, 213-219.

Bloom A.J., Caldwell R.M., Finazzo J., Warner R.L., Weissbart J. (1989). Oxygen and carbon dioxide fluxes from barley shoots depend on nitrate assimilation. *Plant Physiol.* **91**, 352-356.

Bloom A.J., Sukrapanna S.S., Warner R.L. (1992). Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol.* **99**, 1294-1301.

Borkid C., Sungh Z.R. (1985). Expression of tubulin genes during somatic embryogenesis. Dans Terzy M., Pitto L., Sungh Z.R., eds. Workshop Held. Incremento produttività risorse agricole, Rome. 14-21.

Bowsher C.G., Hucklesby D.P., Emes M.J. (1989). Nitrite reduction and carbohydrate metabolism in plastids purified from roots of *Pisum sativum* L.. *Planta* **177**, 359-366.

Bowsher C.G., Hucklesby D.P., Emes M.J. (1993). Induction of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase and ferredoxin synthesis in pea root plastids during nitrate assimilation. *Plant J.* **3**, 463-467.

Bowsher C.G., Long D.M., Oaks A., Rosthein S.J. (1990). Effect of light/dark cycles on expression of nitrate assimilatory genes in maize shoots and roots. *Plant Physiol.* **95**, 281-285.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 254-284.

Buczynsky S.R., Thom M., Chourey P., Maretski A. (1993). Tissue distribution and characterization of sucrose synthase isozymes in sugarcane. *J. Plant Physiol.* **142**, 641-646.

Bush D.R., Chiou T.Z., Chen L. (1996). Molecular analysis on plant sugar and amino acid transporters. *J. Exp. Bot.* **47**, 1205-1210.

Caboche M., Rouzé P. (1990). Nitrate reductase : a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet.* **6**, 187-192.

Campbell W.H., Kinghorn J.R. (1990). Functional domains of assimilatory nitrate and nitrite reductases. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 315-319.

Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E., Youngs V.L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communication in Soil Science. Plant Ann.* **6**, 71-80.

Champigny M.L., Van Quy L., Valadier M.H., Moyse A. (1991). Effet immédiat des nitrates sur la photoassimilation du CO₂ et la synthèse de saccharose dans les feuilles de blé. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **312**, 469-476.

Champigny M.L., Brauer M., Bismuth E., Manh C.T., Siegl G., Van Quy L., Stitt M. (1992). The short-term effect of NO₃⁻ and NH₃ assimilation on sucrose synthesis in leaves. *J. Plant Physiol.* **139**, 361-368.

Chaner D.L., Boyer J.S. (1976). Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol.* **58**, 499-504.

Chen J.Q., Black C.C. (1992). Biochemical and immunological properties of alkaline invertase activities in leaf extracts of six temperate grasses grown in warm and cool temperatures. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 61-69.

Cheng C., Acedo G.N., Cristinsin M., Conkling M.A.A. (1992). Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 1861-1864.

Chraïbi A. (1988). Régulation de l'activité nitrate réductase dans des suspensions cellulaires de chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* L.). Thèse Université des Sciences et Technologies de Lille Flandres.

Chraïbi A., Palms B., Druart N., Goupil P., Gojon A., Rambour S. (1995). Influence of abscisic acid on nitrogen partitioning, sucrose metabolism and nitrate reductase activity of chicory suspension cells. *J. Exp. Bot.* **46**, 1525-1533.

- Claussen W.** (1983). Investigations on the relationship between the distribution of assimilates and sucrose synthase activity in *Solanum melongena* L. 1. Characterization and distribution of sucrose synthetase. *Z. Pflanzenphysiol.* **110**, 165-173.
- Copeland L.** (1990). Enzymes of sucrose metabolism. *Methods Plant Biochem.* **3**, 73-85.
- Crawford N.M., Wilkinson J.Q., LaBrie S.T.** (1992). Metabolic control of nitrate reduction in *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J Plant Physiol.* **19**, 377-385.
- Crawford N.M., Arst Jr H.N.** (1993). The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 115-146.
- Crawford N.M.** (1995). Nitrate : nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* **7**, 859-868.
- Daie J.** (1993). Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase : a key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. *Photosynth. Res.* **38**, 5-14.
- Delrot S.** (1993). Membranes and assimilate translocation. *Current Topics in Plant Physiol.* **1**, 229-244.
- de Marco A., Jia C., Fischer-Schielbs E., Varanini Z., Lüttge U.** (1994). Evidence for two different nitrate-reducing activities at the plasma membrane in roots of *Zea mays* L. *Planta* **194**, 557-564.
- Deng M., Moureaux T., Caboche M.** (1989). Tungstate, a molybdate analog inactivating nitrate reductase, deregulates the expression of the nitrate reductase structural gene. *Plant Physiol.* **91**, 304-309.
- Deng M., Moureaux T., Chérel I., Boutin J.P., Caboche M.** (1991). Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. *Plant Physiol. Biochem.* **29**, 239-247.

Dickinson C.D., Altabella T., Chrispeels M.J. (1991). Slow-growth phenotype of transgenic tomato expressing apoplastic invertase. *Plant Physiol.* **95**, 420-425.

Dorchies V. (1984). Activité de la nitrate réductase de *Cichorium intybus* L. : étude à différents stades de développement de la plante et dans les tissus cultivés *in vitro*. Thèse Université des Sciences et Technologies de Lille-Flandres.

Dorchies V., Rambour S. (1983). Activité nitrate réductase mesurée *in vivo* chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) au cours du forçage. *Physiol. Vég.* **21**, 705-713.

Dorchies V., Rambour S. (1985). Activité nitrate reductase chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) à différents stades de développement et dans les tissus cultivés *in vitro*. *Physiol. Vég.* **23**, 25-35.

Douglas P., Morrice N., Mac Kintosh C. (1995). Identification of a regulatory phosphorylation site in the hinge 1 region of nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves. *FEBS Letters* **377**, 113-117.

Druart N. (1994). Régulation de la nitrate réductase en relation avec le métabolisme carboné en présence d'acide abscissique dans des suspensions cellulaires de chicorée de Bruxelles. D.E.A. Université Technologique de Compiègne.

Duchateau N., Bortlik K., Simmen U., Wiemken A., Bancal P. (1995). Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves. *Plant Physiol.* **107**, 1249-1255.

Edelman J., Jefford T.G. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Heliantus tuberosus*. *New Phytol.* **67**, 517-531.

Evans J.R. (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* **78**, 9-19.

Federova E., Greenwood L.S., Oaks A. (1994). *In-situ* localization of nitrate reductase in maize roots. *Planta* **194**, 279-286.

Feinberg A.P., Vogelstein B. (1984). Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**, 266.

Fellows R.J., Geiger D.R. (1974). Structural and physiological changes in sugar beet leaves during sink-to-source conversion. *Plant Physiol.* **54**, 877-884.

Ferrari T.E., Yoder O.C., Filner P. (1973). anaerobic nitrite production by plants cells and tissues : evidence for two nitrate pools. *Plant Physiol.* **51**, 423-431.

Ferrari, Warner J.E. (1980). Intact tissue assay for nitrate reductase in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* **47**, 790-794.

Ferrario S., Valadier M.H., Foyer C.H., (1996). Short-term of nitrate reductase activity by exogenous nitrate in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Zea mays* leaves. *Planta* **199**, 366-371.

Ferrario S., Foyer C.H., Morot-Gaudry J.F. (1997). Coordination entre métabolismes azoté, photosynthétique et respiratoire. Dans Assimilation de l'azote chez les plantes. J.F. Morot-Gaudry ed. 235-248.

Fiala V., Jolivet E. (1984). Mise en évidence d'une nouvelle fraction glucidique dans la racine de chicorée et son évolution au cours de la formation des réserves. *Physiol. Vég.* **22**, 315-321.

Filleur S., Daniel-Vedele F. (1998). Characterization of a high-affinity nitrate transporter in *arabidopsis thaliana*.

Fouldrin K., 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 for chicon growth. *J. Exp. Bot.* **44**, 1313-1319.

Fraisier V., Krapp A., Dorbe M.F., Daniel-Vedele F. (1998). Characterization of a high affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*.

Frommer W.B., Sonnewald U. (1995). Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *J. Exp. Bot.* **46**, 587-607.

Furbank R.T., Pritchard J., Jenkins C.L.D. (1997). Effects of exogenous sucrose feeding on photosynthesis in the C₃ plant tobacco and the C₄ plant *Flaveria bidentis*. *Aust. J. Plant Physiol.* **24**, 291-299.

Gahrtz M., Schmelzer E., Stolz J., Sauer N. (1996). Expression of the *PmSUC1* sucrose carrier gene from *Plantago major* L; is induced during seed development. *Plant J.* **9**, 93-100.

Gahrtz M., Stolz J., Sauer N. (1994). A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. *Plant J.* **6**, 697-706.

Galangau F., Daniel-Vedele F., Moureaux T., Dorbe M.F., Leydecker M.T., Caboche M. (1988). Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiol.* **88**, 383-388.

Gastal F., Lemaire G. (1997). Nutrition azotée et croissance des peuplements végétaux cultivés. Dans Assimilation de l'azote chez les plantes. J.F. Morot-Gaudry ed. 355-367.

Geigenberger P., Stitt M. (1993). Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* **189**, 329-339.

Getz H.P. (1991). Activity of cell wall bound acid invertase of mature red beet root tissue. *Plant Physiol. Biochem.* **29**, 585-593.

Getz H.P., Klein M. (1995). Characteristics of sucrose transport and sucrose-induced H⁺ transport on the tonoplast of red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiol.* **107**, 459-467.

- Giaquinta R.T.** (1980). Translocation of sucrose and oligosaccharides. *Biochem. of Plants* **3**, 271-320.
- Gifford R.M., Evans L.T.** (1981). Photosynthesis, carbon partitioning and yield. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**, 485-509.
- Glass A.D.M., Shaff J.E., Kochian L.V.** (1992). Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiol.* **99**, 456-463.
- Glass A.D.M., Siddiqi M.Y.** (1995). Nitrogen absorption by plant roots. Dans Nitrogen nutrition in higher plants, Srivastava H.S., Singh R.P., ed., Associated Publishing Co. of New Delhi, India 21-56.
- Glass A.D.M., Siddiqi M.Y., Ruth T.J., Rufty T.W.** (1990). Studies of the uptake of nitrate in barley. II. Energetics. *Plant Physiol.* **93**, 1585-1589.
- Gojon A., Plassard C., Bussi C.** (1994). Root/shoot distribution of NO₃⁻ assimilation in herbaceous and woody species. Dans Roy J., Garnier E., eds. A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions. The Hague : SPB Academic Publishing. 131-147.
- Goldschmith E.E., Huber S.C.** (1992). Regulation of photosynthesis by end-product accumulation leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiol.* **99**, 1443-1448.
- Goupil P., Loncle D., Druart N., Bellettre A., Rambour S.** (1998). Influence of ABA on nitrate réductase activity and carbohydrate metabolism in chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *J. Exp. Bot.* Sous presse.
- Gowri G., 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.

Gowri G., Kenis J.D., Ingemarsson B, Redinbaugh M.G., Campbell W.H. (1992). Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of maize to environmental nitrate. *Plant Mol. Biol.* **18**, 55-64.

Grignon C., Thibaud J.B., Lamaze T. (1997). Transport du nitrate par la racine. Dans Assimilation de l'azote chez les plantes. J.F. Morot-Gaudry ed. 27-43.

Guerin J., Carbonero P. (1997). The spatial distribution of sucrose synthase isozymes in barley. *Plant Physiol.* **114**, 55-62.

Gupta A.K., Mann P., Kaur N., Singh R. (1991). Profiles of enzymes of sucrose metabolism in the leaves of chicory (*Cichorium intybus*) during development. *Plant Science* **77**, 191-196.

Hageman R.H., Flesher D. (1960). Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiol.* **35**, 700-708.

Harn C., Khayat E., 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.

Heilmeyer H., Monson R.K. (1993). A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions. Dans Garnier E., Roy J. (eds) SPB Academic Publishing, The Hague, pp 149-171.

Heim U., Weber H., Bäumlein H., Wobus U. (1993). A sucrose synthase gene of *Vicia faba* L. : Expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* **191**, 394-401.

Heineke D., Sonnewald U., Büssis D., Günter G., Leidreiter K., Wilke I., Raschke K., Willmitzer L., Heldt H.W. (1992). Apoplastic expression of yeast-derived invertase in potato. Effects on photosynthesis, leaf solute composition, water relations, and tuber composition. *Plant Physiol.* **100**, 301-308.

In young plantlets of chicory (*Cichorium intybus* L.), nitrate reduction mainly occurred in the roots between 21 to 42 days after sowing. Analysis of acid invertase, neutral invertase, sucrose synthase, SST and FFT shows that acid invertase activity predominates at this developmental stage. At the onset of the tuber formation (42 to 63 days after sowing), nitrate reductase and acid invertase activities decreased in roots whereas nitrate reduction developed in leaves. Then, the expression of the enzymes of the fructan metabolism was detected in the roots. A tight correlation between the nitrate content, the amino-acid level and nitrate reductase activity as well as between the carbohydrate level in the roots and the expression of the enzymes involved in the sucrose metabolism was shown. Analysis concerning the *in situ* sucrose distribution shows that a sink strength develops in the roots. Nitrate reductase activity is not modified by modulations of transcriptional activity, but at least in part by a reversible phosphorylation/dephosphorylation mechanism. Transcriptional regulation of acid invertase and SST was detected.

Supplying sucrose (20 g.l⁻¹) lead to an increase of the chicory growth, decreased the photosynthetic capability and, surprisingly, maintained nitrate reductase activity in the roots during radial development. A post-transcriptional modification was probably responsible for this persistence. At 28 days after sowing, the appearance of SST activity involving the synthesis of fructans, the decrease of acid invertase activity and the presence of a developed cambium occurred as the tuber formation was set on. Modifications of acid invertase activity and SST activity were controlled at a transcriptional level. These data suggest that sucrose might activate the expression of enzymes leading to the synthesis of fructans and reduced the competition between the nitrate and the sucrose assimilatory pathways during the formation of the tuber.

Key-words : acid invertase, *Cichorium intybus* L., fructans, fructan:fructan fructosyltransferase, nitrate, nitrate reductase, sucrose:sucrose fructosyltransferase, tuber formation, sucrose.

Heller R. (1953). Recherche sur la nutrition minérale des tissus cultivés *in vitro*. *Annales de Sc. Nat. et de Bot. Vég.* **14**, 1-223.

Hellwege E.M., Raap M., Gritscher D., Willmitzer L., Heyer A.G. (1998). Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. *FEBS Letters* **427**, 25-28.

Hesse H., Willmitzer L. (1996). Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* **30**, 863-872.

Hirose T., Imaizumi N., Scofield G.N., Furbank R.T., Oshugi R. (1997). cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* **38**, 1389-1396.

Ho L.C. (1988). Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 355-378.

Hoff T., Stummann B.M., Henningsen K.W. (1992). Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiol. Plant.* **84**, 616-624.

Hoff T., Truong H.N., Caboche M. (1994). The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant, Cell and Env.* **17**, 616-624.

Hole D.J., Emran A.M., Fares Y., Drew M.C. (1990). Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiol.* **93**, 642-647.

House C.M., Anderson J.W. (1980). Light-dependent reduction of nitrate by pea chloroplasts in the presence of nitrate reductase and C₄ dicarboxylic acids. *Phytochem.* **19**, 1925-1930.

Huang X.F., Nguyen-Quoc B., Chourey P.S., Yelle S. (1994). Complete nucleotide sequence of the maize (*Zea mays* L.) sucrose synthase 2 cDNA. *Plant Physiol.* **104**, 293-294.

Huber S.C., Huber J.L., Campbell W.H., Redinbaugh M.G. (1992). Apparent dependence of the light activation of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in spinach leaves on protein synthesis. *Plant Cell Physiol.* **33**, 639-646.

Huber S.C., Huber J.L., McMichael R.W.Jr., Redinbaugh M.G., Campbell W.H. (1993). Modulation of nitrate reductase activity by protein phosphorylation. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* **12**, 7-8.

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

Hurst P.L., Hyndman L.M., Hannan P.J. (1993). Sucrose synthase, invertases, and sugars in growing asparagus spears. *New Zeal. J. Crop Hort. Sci.* **21**, 331-336.

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

Jenkinson D.S. (1990). An introduction to the global nitrogen cycle. *Soil Use Manag.* **6**, 56-61.

Jin T., Huppe H.C., Turpin D.H. (1998). *In vitro* reconstitution of electron transport from glucose-6-phosphate and NADPH to nitrite. *Plant Physiol.* **117**, 303-309.

Jones T.L., Ort D.R. (1997). Circadian regulation of sucrose phosphate synthase activity in tomato by protein phosphatase activity. *Plant Physiol.* **113**, 1167-1175.

Jorgensen O.S., Andersen B. (1973). An improved luose oxydase-peroxydase coupled assay for β -fructofuranosidase activity. *Anal. Biochem.* **53**, 141-145.

Kaiser W.M., Förster J. (1989). Low CO₂ prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiol.* **91**, 970-974.

Kaiser W.M., Huber S.C. (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.

Kaur N., Jain H., Mann P., Gupta A.K., Singh R. (1992). A comparison of properties of invertases and inulinase from chicory. *Plant Physiol. Biochem.* **304**, 445-450.

King B.J., Siddiqi M.Y., Glass A.D.M. (1992). Studies of the uptake of nitrate in barley. V. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity. Implications for nitrate influx.. *Plant Physiol.* **99**, 1582-1589.

King B.J., Siddiqi M.Y., Ruth T.J., Warner R.L., Glass A.D.M. (1993). Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. *Plant Physiol.* **102**, 1279-1286.

Klann E., Yelle S., Bennett A.B. (1992). Tomato fruit acid invertase complementary DNA. Nucleotide and deduced amino acid sequences. *Plant Physiol.* **99**, 351-353.

Kleinhofs A., Warner R.L. (1990). Advances in nitrate assimilation. Dans *The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise*. Vol. 16. Intermediary nitrogen metabolism, ed. B.J. Mifflin, P.J. Lea. pp 89-120. San Diego, CA : Academic Press.

Klepper L., Flesher D., Hageman R.H. (1971). Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.* **48**, 580-590.

Koops A.J., Jonker H.H. (1994). Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. I. Fructan:fructan fructosyltransferase. *J. Exp. Bot.* **45**, 1623-1631.

Koops A.J., Jonker H.H. (1996). Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis *in vitro* with purified

sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase. *Plant Physiol.* **110**, 1167-1175.

Kovtun Y., Daie J. (1995). End-product control of carbon metabolism in culture-grown sugar beet plants - Molecular and physiological evidence on accelerated leaf development and enhanced gene expression-. *Plant Physiol.* **108**, 1647-1656.

Krapp A., Quick W.P., Stitt M. (1991). Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase, other photosynthetic enzymes and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via transpiration stream. *Planta* **186**, 58-69.

Kruger N.J. (1990). Carbohydrate synthesis and degradation. Dans *Plant physiology, biochemistry, and molecular biology*. Dennis D.T., Turpin D.H. eds. Longman scientific and technical, Essex U.K. 55-79.

Labhart C.H., Nosberger J., Nelson C.J. (1983). *J. Exp. Bot.* **34**, 1037-1046.

LaBrie S.T., 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.* **169**, 14497-14501.

Lee H.S., Sturm A. (1996). Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. *Plant Physiol.* **112**, 1513-1522.

Lee J.S., Daie J. (1997). End-product repression of genes involving carbon metabolism in photosynthetically active leaves of sugarbeet. *Plant Cell Physiol.* **38**, 887-894.

Lee T.H., Sugiyama A., Ofosu-Anim J., Takeno K., Ohno H., Yamaki S. (1997). Activation of sucrose-metabolizing enzymes and stimulation of sucrose uptake by auxin and sucrose in eggplant (*Solanum melongena* L.). *J. Plant Physiol.* **150**, 297-301.

Lehrach H., Diamond D., Wozney J.M., Boedkter H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem.* **16**, 4743-4751.

Lemoine R., Gallet O., Gaillard C., Frommer W., Delrot S. (1992). Plasma membrane vesicles from source to sink leaves. Changes in solute transport and polypeptide composition. *Plant Physiol.* **100**, 1150-1156.

Lewis D.H. (1993). Nomenclature and digrammatic representation of oligomeric fructans- a paper for discussion. *New Phytol.* **124**, 583-594.

Li X.Z., Oaks A. (1993). Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*. Influence of NO_3^- . *Plant Physiol.* **102**, 1251-1257.

Li X.Z., Larson D.E., Glibetic M., Oaks A. (1995). Effect of glutamine on the induction of nitrate reductase. *Physiol. Plant.* **93**, 740-744.

Lillo C. (1984). Circadian rhythmicity of nitrate reductase activity in barley leaves. *Physiol. Plant.* **61**, 219-223.

Lillo C. (1994). Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.* **90**, 616-620.

Lillo C., Ruoff P. (1989). An unusually rapid light-induced nitrate reductase mRNA pulse and circadian oscillations. *Naturwissenschaften.* **76**, 526-528.

Lillo C., Ruoff P. (1992). Hysteretic behavior of nitrate reductase. Evidence of an allosteric binding site for reduced pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **267**, 13456-13459.

Limami A., Laville J. (1991). Agronomie et physiologie. Dans Leteinturier J., Cochet J.P., Marle M. and Benigni (eds) : L'endive, guide pratique, pp. 123-144. Les éditions du Ctifl, Paris ISBN 2-87911-014-9.

Limami A., Roux L., Laville J., Roux Y. (1993). Dynamics of nitrogen compounds in the chicory (*Cichorium intybus* L.) tuberised tap root during growing season and cold storage period. *J. Plant Physiol.* **106**, 477-484.

Limami A., Dufossé C., Richard-Molard C., Fouldrin K., Roux L., Morot-Gaudry J.F. (1996). Effect of exogenous nitrogen ($^{15}\text{NO}_3$) on utilization of vegetative storage proteins (VSP) during regrowth in chicory (*Cichorium intybus*). *J. Plant Physiol.* **149**, 564-572.

Lin S.S., Sung H.Y. (1993). Partial purification and characterization of soluble acid invertases from rice (*Oriza sativa*) leaves. *Biochem. Mol. Biol. Inter.* **31**, 945-953.

Lu J.I., Ertl J.R., Chen C.M. (1990). Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves.. *Plant Mol. Biol.* **14**, 585-594.

Lu J.I., Ertl J.R., 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.

Mac Clure P., Kochian L.V., Spanswick R.M., Shaff J.E. (1990). Evidence of cotransport of nitrate and protons in maize roots. II. Measurement of NO_3^- and H^+ fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol.* **93**, 290-294.

Mac Kintosh C., Douglas P., Lillo C. (1995). Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea* leaves). *Plant Physiol.* **107**, 451-457.

Mac Kintosh C. (1998). Regulation of plant nitrate assimilation : from ecophysiology to brain proteins. *New Phytol.* **139**, 153-159.

Mac Michael Jr. R.W., Bachmann M., Huber S.C. (1995). Spinach leaf sucrose-phosphate synthase and nitrate reductase are phosphorylated/inactivated by multiple protein kinases in vitro. *Plant Physiol.* **108**, 1077-1082.

Mac Naughton G.S., Presland M.R. (1983). Whole plant studies using radioactive 13-nitrogen. I. Techniques for measuring the uptake and transport of nitrate and ammonium ions in hydroponically grown *Zea mays*. *J. Exp. Bot.* **34**, 880-892.

Mahn C.T., Bismuth E., Boutin J.P., Provot M., Champigny M.L. (1993). Metabolite effectors for short term nitrogen-dependent enhancement of phosphoenolpyruvate carboxylase activity and decrease of net sucrose synthesis in wheat leaves. *Physiol. Plant.* **89**, 460-466.

Marschner H., Römheld V., Horst W.J., Martin P. (1986). Root-induced changes in the rhizosphere : importance for mineral nutrition of plants. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* **149**, 441-456.

Martin T., Frommer W.B., Salanoubat M., Willmitzer L. (1993). Expression of an Arabidopsis sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and sink organs. *Plant J.* **4**, 367-377.

Martinez De Ilarduya O., Vincente-Carbajosa J., De La Hoz B.S., Carbonero P. (1993). Sucrose synthase genes in barley : cDNA cloning of the SS2 type and tissue-specific expression of SS1 and SS2. *FEBS Letters* **320**, 177-181.

Masuda H., Takahashi T., Sugarawa S. (1988). Acid and alkaline invertases in suspension cultures of sugar beet cells. *Plant Physiol.* **86**, 312-317.

Melzer J.M., Kleinhofs A., Warner R.L. (1989). Nitrate reductase regulation : Effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 341-346.

Mercier R.W., Gogarten J.P. (1995). A second cell wall acid invertase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**, 659-660.

Merlo L., Ferretti M., Passera C., Ghisi R. (1995). Light-modulation of nitrate reductase activity in leaves and roots of maize. *Physiol. Plant.* **94**, 305-311.

Meyerhoff P.A., Fox T.C., Travis R.L., Huffaker R.C. (1994). Characterization of the association of nitrate reductase with barley (*Hordeum vulgare* L.) root membranes. *Plant Physiol.* **104**, 925-936.

Migge A., Meya G., Carryol E., Hirel B., Becker T.W. (1997). Coaction of light and the nitrogen substrate in controlling the expression of the tomato genes encoding nitrite reductase and nitrate reductase. *J. Plant Physiol.* **151**, 151-158.

Mohr H., Neiningner A., Seith B. (1992). Control of nitrate reductase and nitrite reductase gene expression by light, nitrate and a plastidic factor. *Bot. Acta* **105**, 81-89.

Moorhead G., Douglas P., Morrice N., Scarabel M., Aitken A., MacKintosh C. (1996). Phosphorylated nitrate reductase is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Current Biol.* **6**, 1104-1113.

Morot-Gaudry J.F. (1997). Sources et cycle de l'azote. Dans Assimilation de l'azote chez les plantes. J.F. Morot-Gaudry ed. 21-25.

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

Muller B., Tillard P., Touraine B. (1995). Nitrate fluxes in soybean seedling roots and their response to amino acids : an approach using ¹⁵N. *Plant Cell, Environ.* **18**, 1267-1279.

Naik M.S., Nicholas D.J.D. (1984). Origin of NADH for nitrate reduction in wheat roots. *Plant Sci. Lett.* **35**, 91-96.

Nussaume L., Vincentz M., Meyer C., Boutin J.P., Caboche M. (1995). Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by an N-terminal deletion. *The Plant Cell* **7**, 611-621.

Oaks A. (1994). Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* **72**, 739-750.

Oaks A., Hirel B. (1985). Nitrogen metabolism in roots. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**, 345-365.

Olhén E., Ingemarsson B., Campbell W.H., Larsson C.M. (1995). Relationships between external nitrate availability, nitrate uptake and expression of nitrate reductase in roots of barley grown in N-limited split-root cultures. *Planta* **196**, 485-491.

Palms B., Goupil P., Engler I., Van Der Staeten D., Van Montagu M., Rambour S. (1996). Evidence for nitrate-dependant spatial regulation of the nitrate reductase gene *nia* in chicory roots. *Planta* **200**, 20-27.

Pate J.S. (1972). Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.* **5**, 109-119.

Paul M.J., Driscoll S.P. (1997). Sugar repression of photosynthesis : the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. *Plant, Cell Environ.* **20**, 110-116.

Pilgrim M.L., Caspar T., Quail P.H., Mac Clung C.R. (1993). Circadian and light regulated expression of nitrate reductase in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **23**, 349-364.

Pilon-Smits E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.J., Jeuken M.J.W., Weisbeek P.J., Smeekens S.C.M. (1995). Improve performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* **107**, 125-130.

Pollock C.J., Chatterton N.J. (1988). Fructans. Dans the biochemistry of plants. vol 14 : Carbohydrates. J. Preiss ed.. Academic press, San Diego. ISBN 0-12-675414-4. 109-140.

Quesada A., Galvan A., Fernandez E. (1994). Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **5**, 407-419.

- Ramloch-Lorenz K., Knudsen S., Sturm A.** (1993). Molecular characterization of the gene for carrot cell wall β -fructosidase. *Plant J.* **4**, 545-554.
- 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.
- Redinbaugh M.G., Campbell W.M.** (1991). Higher plant responses to environmental nitrate. *Physiol. Plant.* **82**, 640-650.
- Ricardo C.P.P.** (1974). Alkaline β -fructofuranosidases of tuberous roots : possible physiological function. *Planta* **118**, 333-343.
- Riepe M.W., Schmalzigaug K., Fink F., Oexle K., Ludolph A.C.** (1996). NADH in the pyramidal cell layer of hippocampal regions CA1 and CA3 upon selective inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation. *Brain Research.* **710**, 21-27.
- Riesmeier J.W., Hirner B., Frommer W.B.** (1993). Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *The Plant Cell* **5**, 1591-1598.
- Robinson J.M.** (1988). Spinach leaf chloroplast CO_2 and NO_2^- photoassimilations do not compete for photogenerated reductant. Manipulation of reductant levels by quantum flux density titrations. *Plant Physiol.* **88**, 1373-1380.
- Robinson J.M., Burkey K.O.** (1997). Foliar CO_2 photoassimilation and chloroplast linear electron transport rates in nitrogen-sufficient and nitrogen-limited soybean plants. *Photosynth. Res.* **54**, 209-217.
- Rouzé P., Caboche M.** (1992). Nitrate reduction in higher plants : molecular approaches to function and regulation. Dans Society of Experimental Biology Seminar Series 49 : Inducible plant proteins. J.L. Wray ed.45-77.

Rufty Jr. T.W., Huber S.C., Volk R.J. (1988). Alteration in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. *Plant Physiol.* **88**, 725-730.

Sa W., Huber S.C., Crawford N.M. (1996). Identification of a post-translational regulatory site in the hinge 1 region of *Arabidopsis* nitrate reductase. *The Plant Cell* **8**, 519-527.

Sauer N., Stolz J. (1994). SUC1 and SUC2 : two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.* **6**, 67-77.

Sebkova V., Unger C., Hardegger M., Sturm A. (1995). Biochemical, physiological, and molecular characterization of sucrose synthase from *Daucus carota*. *Plant Physiol.* **108**, 75-83.

Sechley K.A., Oaks A., 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.

Sheen J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* **2**, 1027-1038.

Sheen J. (1994). Feedback control of gene expression. *Photosynth. Res.* **39**, 428-438.

Shiomi N. (1982). Purification and characterization of 1F fructosyltransferase from the root of *Asparagus* (*Asparagus officinalis* L.). *Carbohydr. Res.* **99**, 157-159.

Shiraishi N., Stao T., Ogura N., Nakagawa H. (1992). Control by glutamine of the synthesis of nitrate reductase in cultured spinach cells. *Plant Cell Physiol.* **33**, 727-731.

Siddiqi M., Glass A.D.M., Ruth T.J. (1991). Studies of the uptake of nitrate in barley. III. Compartmentation of NO_3^- . *J. Exp. Bot.* **42**, 1455-1463.

Siddiqi M., Glass A.D.M., Ruth T.J., Rufty T.W.Jr (1990). Studies of the nitrate uptake in barley. *Plant Physiol.* **93**, 1426-1432.

Simmen U., Obenland D., Boller T., Wiemken A. (1993). Fructan synthesis in excised barley leaves. Identification of two sucrose:sucrose fructosyltransferases induced by light and their separation from constitutive invertases. *Plant Physiol.* **101**, 459-468.

Sivasankar S., Oaks A. (1995). Regulation of nitrate reductase during early seeding growth. A role for asparagine and glutamine. *Plant Physiol.* **107**, 1225-1231.

Sivasankar S., Oaks A. (1996). Nitrate assimilation in higher plants : the effect of metabolites and light. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 609-620.

Solomonson L.P., Barber M.J. (1990). Assimilatory nitrate reductase : functional properties and regulation. *Ann. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 225-253.

Sonnewald U., Lerchl J., Zrenner R., Frommer W. (1994). Manipulations of sink-source relations in transgenic plants. *Plant, Cell Environ.* **17**, 649-658.

Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.

Spollen W.G., Nelson C.J. (1994). Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiol.* **106**, 329-336.

Sprenger N., Bortlik K., Brandt A., Boller T., Wiemken A. (1995). Purification, cloning and functional expression of sucrose:sucrose 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 11652-11656.

Stadler R., Sauer N. (1996). The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot. Acta* **109**, 299-308.

- Steinlein T., Heilmeier H., Schulze E.D.** (1993). Nitrogen and carbohydrate storage in biennials originating from habitats of different resource availability. *Oecologia* **93**, 374-382.
- Stitt M.** (1990). The flux of carbon between the chloroplast and cytoplasm. Dans DT Dennis, DH Turpin, eds, *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Scientific, New York, pp 308-326.
- Sturm A.** (1991). Heterogeneity of the complex oligosaccharides at specific sites of two secreted carrot glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **199**, 169-179.
- Sturm A., Chrispeels M.J.** (1990). cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *The Plant Cell* **2**, 1107-1119.
- Sturm A., Sebkova V., Lorenz K., Hardegger M., Lienhard S., Unger C.** (1995). Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid β -fructofuranosidase in carrot. *Planta* **195**, 601-610.
- Sung S.S., Sheil W.J., Geiger D.R., Black C.C.** (1994). Growth, sucrose synthase, and invertase activities of developing *Phaseolus vulgaris* L. fruit. *Plant, Cell Environ.* **17**, 419-426.
- Suty L., Moureaux T., Leydecker M.T., Teyssendier De La Serve B.** (1993). Cytokinin affects nitrate reductase expression through the modulation of polyadenylation of the nitrate reductase mRNA transcript. *Plant Science* **90**, 11-19.
- Suzuki A., Oaks A., Jacquot J.P., Vidal J., Gadal P.** (1985). An electron transport system in maize roots for reactions of glutamate synthase and nitrite reductase. *Plant Physiol.* **78**, 374-378.
- Takeda S., Mano S., Ohto M.A., Nakamura K.** (1994). Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiol.* **106**, 567-574.

Thomas P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5201-5205.

Touraine B., Grignon C. (1982). Potassium effect on nitrate secretion into the xylem of corn roots. *Physiol. Vég.* **20**, 23-31.

Trueman L.J., Theodoulou R.L., Miller A.J., Forde B.G. (1994). Cloning and analysis of a putative high affinity nitrate transporter from barley. Abstracts of the fourth international congress of plant molecular biology. (Amsterdam : The international society for plant molecular biology). Abstr. 1007.

Truernit E., Sauer N. (1995). The promoter of *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of glucuronidase to the phloem : Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**, 564-570.

Tsay Y.F., Schroeder J.I., Feldmann K.A., Crawford N.M. (1993). The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705-713.

Turgeon R. (1989). The sink-source transition in leaves. *Anu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 119-138.

Unger C., Hardegger M., Lienhard S., Sturm A. (1994). cDNA cloning of carrot (*Daucus carota*) soluble acid β -fructofuranosidases and comparison with the cell wall isozyme. *Plant Physiol.* **104**, 1351-1357.

Unger C., Hofsteenge J., Sturm A. (1992). Purification and characterization of a soluble β -fructofuranosidase from *Daucus carota*. *Eur. J. Biochem.* **204**, 915-921.

Van Bel A.J.E. (1996). Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons. *J. Exp. Bot.* **47**, 1129-1140.

Van Den Ende W., Van Laere A. (1993). Purification and properties of an invertase with sucrose:sucrose fructosyl transferase (SST) activity from the root of *Cichorium intybus* plants. *New Phytol.* **123**, 31-37.

Van Den Ende W., Van Laere A. (1995). Purification and properties of a neutral invertase from the root of *Cichorium intybus* plants. *Physiol. Plant* **93**, 241-248.

Van Den Ende W. (1996a). Fructan metabolism in chicory roots (*Cichorium intybus* L.). Thèse Université Catholique Louvain (Belgique).

Van Den Ende W., Mintiens A., Speleers H., Onuoha A.A., Van Laere A. (1996d). The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytol.* **132**, 555-563.

Van Den Ende W., Van Wouterghem D., Verhaert P., Dewil E., Van Laere A. (1996b). Purification and characterization of 1-SST, the key enzyme initiating fructan biosynthesis in young chicory roots. *Physiol. Plant.* **98**, 455-466.

Van Den Ende W., Van Wouterghem D., Verhaert P., Dewil E., Van Laere A. (1996c). Purification and characterization of fructan:fructan fructosyltransferase from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Planta* **199**, 493-502.

Vaucheret H., Kronenberger J., Lepingle A., Vilaine F., Boutin J.P., Caboche M. (1992). Inhibition of tobacco nitrite reductase activity by expression of antisense RNA. *Plant J.* **2**, 559-569.

Vijn I., Van Dijken A., Sprenger N., Van Dun K., Weisbeek P., Wiemken A., Smeekens S. (1997). Fructan of the inulin neoseries is synthesized in transgenic chicory plant (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase. *Plant J.* **11**, 387-398.

Vincentz M., Caboche M. (1991). Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *The EMBO J.* **10**, 1027-1035.

Vincentz M., Moureaux T., Leydecker M.T., Vaucheret H., Caboche M. (1993). Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant J.* **3**, 315-324.

Von Schaewen A., Stitt M., Schmidt R., Sonnewald U., Willmitzer L. (1990). Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J.* **9**, 3033-3044.

Vuylsteker C. (1996). Régulation de la nitrate réductase dans la racine isolée de chicorée : effet des auxines et des cytokinines. Thèse Université Technologique de Compiègne.

Vuylsteker C., Huss B., Rambour S. (1997a). Nitrate reductase activity in chicory roots following excision. *J. Exp. Bot.* **48**, 59-65.

Vuylsteker C., Leleu O., Rambour S. (1997b). Influence on BAP and NAA on the expression of nitrate reductase in excised chicory roots. *J. Exp. Bot.* **48**, 1079-1085.

Vuylsteker C., Prinsen E., Boutin J.P., Van Onckelen H.A., Rambour S. (1998). Evidence of nitrate reductase expression during initiation of lateral roots by NAA in chicory. *J. Exp. Bot.* **49**, 937-944.

Wakita M., Nishimura G., Tamura M. (1995). Some characteristics of the fluorescence lifetime of reduced pyridine nucleotides in isolated mitochondria, isolated hepatocytes and perfused rat liver *in situ*. *J. Biochem Tokyo* **118**, 1151-1160.

Wang A.Y., Yu W.P., Juang R.H., Huang J.W., Sung H.Y., Su J.C. (1992). Presence of three rice sucrose synthase genes as revealed by cloning and sequencing of cDNA. *Plant Mol. Biol.* **18**, 1191-1194.

Wang F., Smith A.G., Brenner M.L. (1993). Isolation and sequencing of tomato fruit sucrose synthase cDNA. *Plant Physiol.* **103**, 1463-540.

Ward J.M., Kühn C., Tegeder M., Frommer W.B. (1998). Sucrose transport in higher plants. *Intl. Rev. Cytol.* **178**, 41-71.

Weger H.G., Turpin D.H. (1989). Mitochondrial respiration can support NO_3^- and NO_2^- reduction during photosynthesis. *Plant Physiol.* **89**, 409-415.

Winzer T., Lohaus G., Heldt H.W. (1996). Influence of phloem transport, N-fertilization and ion accumulation on sucrose storage in the taproots of fodder beet and sugar beet. *J. Exp. Bot.* **47**, 863-870.

Wray J.L. (1993). Molecular biology, genetics and regulation of nitrite in higher plants. *Physiol Plant.* **89**, 607-612.

Wu L.L., Mitchell J.P., Cohn N.S., Kaufman P.B. (1993). Gibberellin (GA_3) enhances cell wall invertase activity and mRNA levels in elongating dwarf pea (*Pisum sativum*) shoots. *Int. J. Plant Sci.* **154**, 280-289.

Zabeau M, Vos P (1993). Selective Restriction Fragment Amplification : A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application EP 0534858.

Zrenner R., Salanoubat M., Willmitzer L., Sonnewald U. (1995). Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **7**, 97-107.

RESUME

Chez la jeune plantule de chicorée (*Cichorium intybus* L.), entre 21 à 42 jours de culture, la réduction du nitrate est principalement localisée dans les racines. L'étude de l'invertase acide, l'invertase neutre, la saccharose synthase, la SST, et la FFT montre que seule l'invertase acide est prédominante à ce stade de développement. Lors de la mise en place de la tubérisation (42 à 63 jours de culture), l'activité nitrate réductase devient plus importante dans le bouquet foliaire et l'activité invertase acide diminue progressivement dans la plante. Les activités de synthèse de fructosanes apparaissent alors dans les racines. Une corrélation étroite entre les teneurs en nitrate, en acides aminés libres et la réduction du nitrate dans la chicorée ainsi qu'entre les teneurs en glucides intra-racinaires et les activités enzymatiques du métabolisme carboné est observée. L'analyse du transport du saccharose radiomarqué *in situ* montre qu'une force d'appel du puits racinaire se développe lors de la tubérisation. Les modifications de l'activité nitrate réductase ne sont pas liées à modification de l'activité transcriptionnelle, mais peuvent en partie s'expliquer par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation. L'invertase acide et la SST sont, quant à elles, l'objet d'une régulation d'ordre transcriptionnel.

L'apport de saccharose à 20 g.l⁻¹ dans le milieu de culture provoque une accélération de la croissance radiale des racines de chicorée, diminue l'utilisation des capacités photosynthétiques de la plante mais, entretient une activité nitrate réductase racinaire prédominante quel que soit le stade de développement. Une modification d'ordre post-transcriptionnel est probablement à l'origine de cette persistance. Au vingt-huitième jour de culture, l'apparition de l'activité SST permettant la formation des fructosanes, la diminution de l'activité invertase acide ainsi que la mise en évidence d'une assise cambiale développée montrent la précocité de la croissance radiale. Les modifications de l'activité transcriptionnelle de l'invertase acide et de la SST sont responsables des changements d'activités enzymatiques. Ces données suggèrent que le saccharose activerait l'expression d'enzymes menant à la synthèse des fructosanes et atténuerait la compétition naturelle entre les voies d'assimilation du nitrate et du saccharose au cours de la tubérisation.

Mots-clés : *Cichorium intybus* L., fructosanes, fructosane:fructosane fructosyltransférase, invertase acide, nitrate, nitrate réductase, saccharose, saccharose:saccharose fructosyltransférase, tubérisation.

In young plantlets of chicory (*Cichorium intybus* L.), nitrate reduction mainly occurred in the roots between 21 to 42 days after sowing. Analysis of acid invertase, neutral invertase, sucrose synthase, SST and FFT shows that acid invertase activity predominates at this developmental stage. At the onset of the tuber formation (42 to 63 days after sowing), nitrate reductase and acid invertase activities decreased in roots whereas nitrate reduction developed in leaves. Then, the expression of the enzymes of the fructan metabolism was detected in the roots. A tight correlation between the nitrate content, the amino-acid level and nitrate reductase activity as well as between the carbohydrate level in the roots and the expression of the enzymes involved in the sucrose metabolism was shown. Analysis concerning the *in situ* sucrose distribution shows that a sink strength develops in the roots. Nitrate reductase activity is not modified by modulations of transcriptional activity, but at least in part by a reversible phosphorylation/dephosphorylation mechanism. Transcriptional regulation of acid invertase and SST was detected.

Supplying sucrose (20 g.l⁻¹) lead to an increase of the chicory growth, decreased the photosynthetic capability and, surprisingly, maintained nitrate reductase activity in the roots during radial development. A post-transcriptional modification was probably responsible for this persistence. At 28 days after sowing, the appearance of SST activity involving the synthesis of fructans, the decrease of acid invertase activity and the presence of a developed cambium occurred as the tuber formation was set on. Modifications of acid invertase activity and SST activity were controlled at a transcriptional level. These data suggest that sucrose might activate the expression of enzymes leading to the synthesis of fructans and reduced the competition between the nitrate and the sucrose assimilatory pathways during the formation of the tuber.

Key-words : acid invertase, *Cichorium intybus* L., fructans, fructan:fructan fructosyltransferase, nitrate, nitrate réductase, sucrose:sucrose fructosyltransferase, tuber formation, sucrose.

