HAL
open science

Mise en évidence des "pools" de nitrates par la méthode de mesure in vivo de la nitrate réductase

Stephane Adamowicz

To cite this version:

Stephane Adamowicz. Mise en évidence des "pools" de nitrates par la méthode de mesure in vivo de la nitrate réductase. Physiologie Végétale, 1980, 18 (3), pp.453-461. hal-01739306

HAL Id: hal-01739306

https://hal.science/hal-01739306v1

Submitted on 20 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

80. 13

Physiol. Vég., 1980, **18** (3), 453-461

Mise en évidence des " pools " de nitrates par la méthode de mesure *in vivo* de la nitrate réductase

STÉPHANE ADAMOWICZ

Station d'Agronomie et de Physiologie végétale, Centre de Recherches d'Antibes, I.N.R.A., 06602 *Antibes*

(Manuscrit reçu le 21 février, accepté le 31 mars 1980)

RÉSUMÉ

Mots clés : Nicotiana tabacum, *nitrate réductase, pools de nitrates.*

Une technique a été étudiée qui permet de mettre en évidence, éventuellement de mesurer, les pools cellulaires de nitrates dans les feuilles de Tabac (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samson). La manipulation de la concentration en un détergent, le Triton X100, permet de trouver des conditions où l'on observe deux flux successifs de nitrates diffusant hors de disques de feuilles lors d'incubations dans un milieu d'essai pour le test *in vivo* de la nitrate réductase. Ces deux flux s'accompagnent de deux flux de nitrites, indiquant que les nitrates observés sont passés sur le site de l'enzyme nitrate réductase. Des expériences complémentaires corroborent l'hypothèse selon laquelle les deux flux observés proviennent de deux compartiments nitriques intracellulaires.

SUMMARY

Key words: *Nicotiana tabacum*, nitrate réductase, nitrate pools.

A technique has been studied in order to evidence, possibly to measure, intracellular pools of nitrates in the leaves of tobacco (Nicotiana tabacum *L. cv. Samson*). *By varying the concentration of a detergent, Triton X*100, *in an* in vivo *assay for nitrate reductase, conditions are found where nitrates diffuse out of leaf discs in two successive flows. Concomittantly two flows of nitrites are observed, showing that nitrates were partly reduced by the enzyme nitrate reductase. Other experiments strengthen the assumption that the two flows of nitrates originate from two intracellular pools.*

INTRODUCTION

FERRARI *et al.* (1973) ont clairement démontré l'existence de deux compartiments intracellulaires de nitrates dans des suspensions de cellules de Tabac, et indiqué que ces compartiments pourraient aussi se trouver dans des feuilles de Maïs et des couches à aleurones d'Orge. De petite taille, le compartiment dit métabolique est accessible à l'enzyme nitrate réductase. Beaucoup plus important, le compartiment dit de stockage serait inaccessible à cette enzyme.

Depuis, l'interprétation de certaines expériences sur le système assimilateur des nitrates ne peut plus être envisagée sans faire intervenir la compartimentation des nitrates.

HEIMER et FILNER (1971), JACKSON *et al.* (1973), JONES et SHEARD (1975), SHANER et BOYER (1976) supposent l'existence de deux compartiments nitriques dont le plus petit serait seul impliqué dans l'induction de la nitrate réductase. Étudiant le rôle du glucose dans l'induction de la nitrate réductase racinaire par les nitrates, ASLAM et OAKS (1975) proposent que le glucose agisse indirectement en modifiant la répartition des nitrates entre les deux compartiments. De même

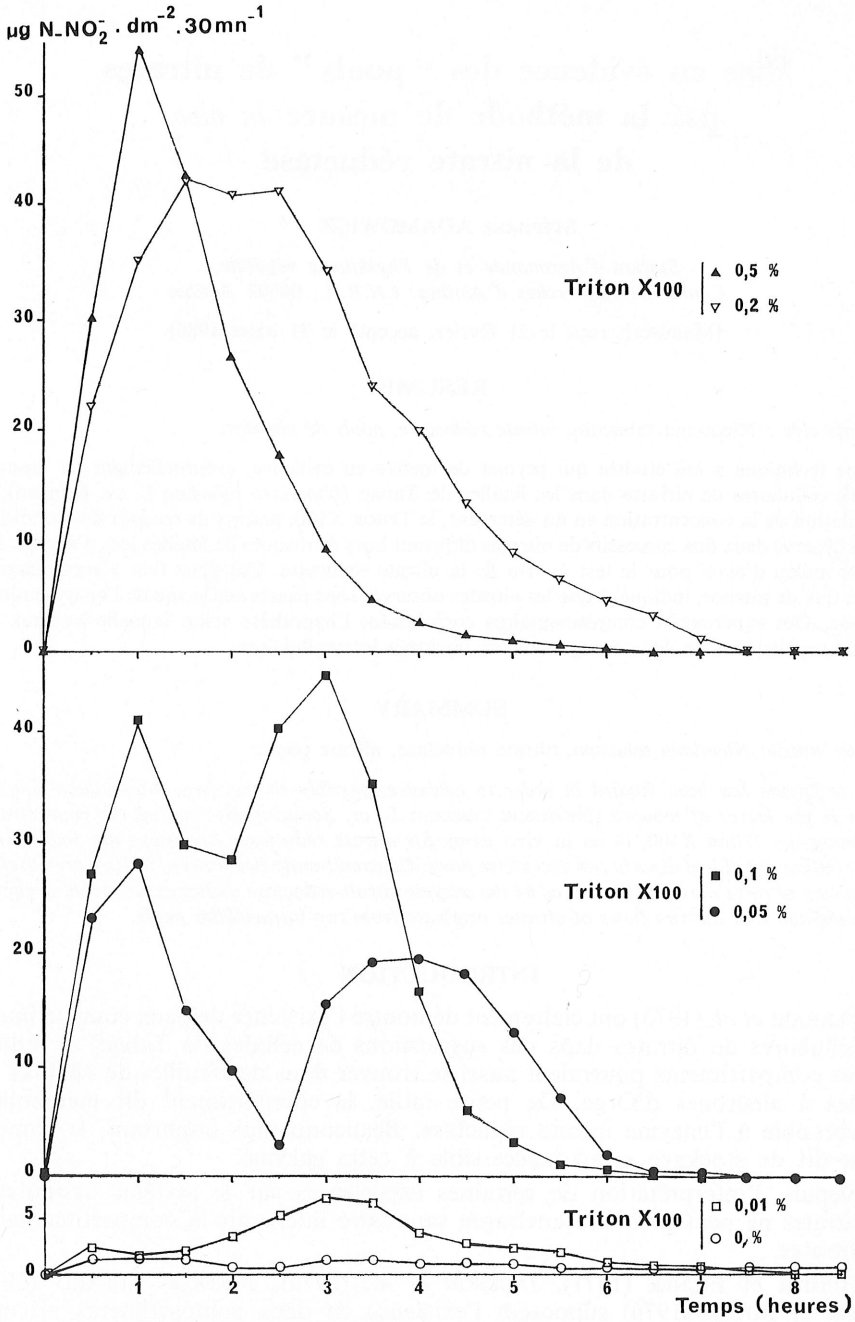

FIG. 1. — Cinétiques de diffusion des nitrites dans le milieu d'essai pour le test instantané en présence de diverses concentrations en Triton X100

— *Diffusion kinetics of nitrites in the* in vivo *assay for nitrate reductase without exogenous nitrates as influenced by various concentrations of Triton X*100

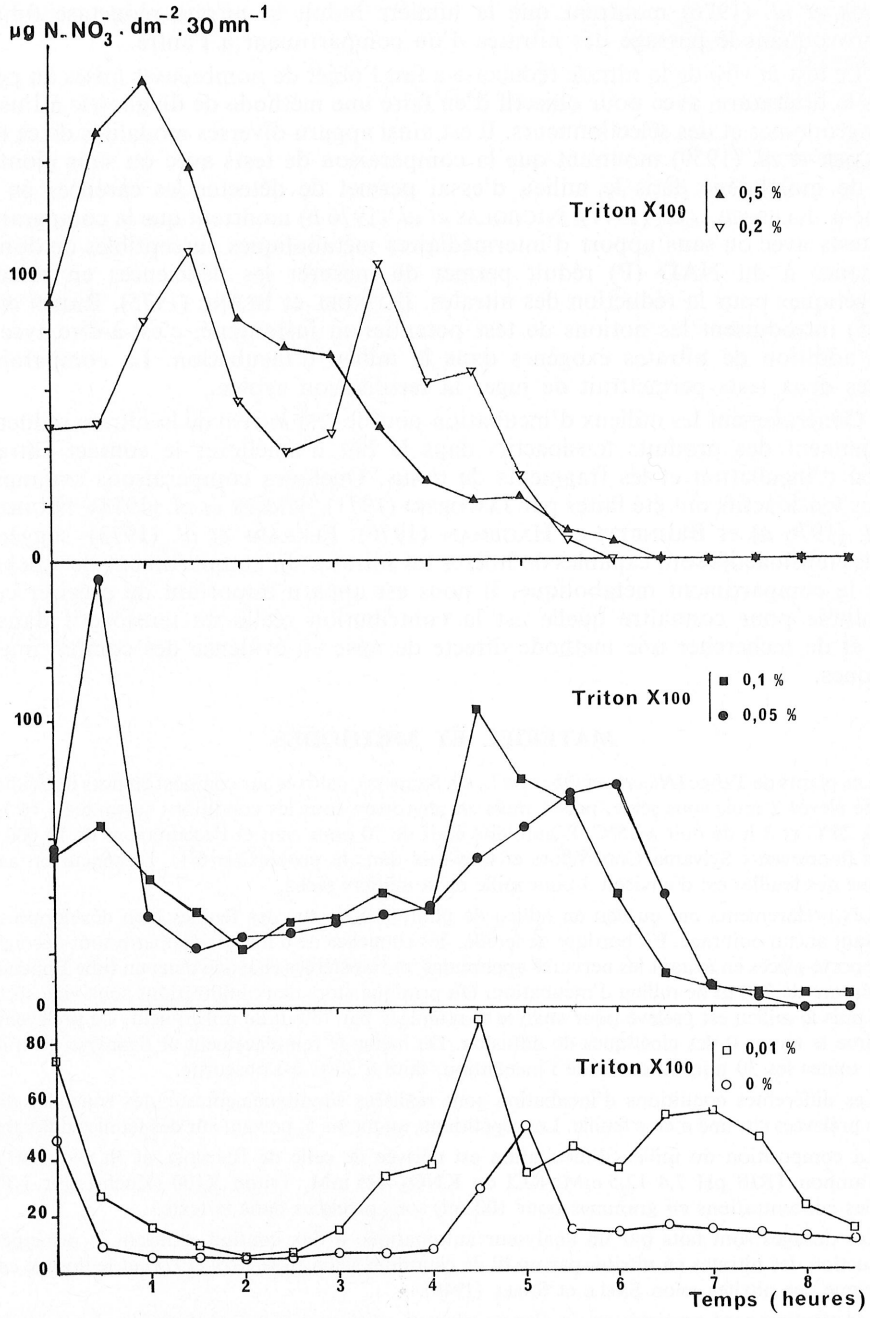

FIG. 2. — Cinétiques de diffusion des nitrates dans le milieu d'essai pour le test instantané en présence de diverses concentrations en Triton X100

— *Diffusion kinetics of nitrates in the* in vivo *assay for nitrate reductase without exogenous nitrates as influenced by various concentrations of Triton X*100

ASLAM *et al.* (1976) montrent que la lumière induit la nitrate réductase foliaire en provoquant le passage des nitrates d'un compartiment à l'autre.

Le test *in vivo* de la nitrate réductase a fait l'objet de nombreuses mises au point dans la littérature, avec pour objectif d'en faire une méthode de diagnostic à l'usage des agronomes et des sélectionneurs. Il est ainsi apparu diverses modalités de ce test, MULDER *et al.* (1959) montrent que la comparaison de tests avec ou sans ajout de sels de molybdène dans le milieu d'essai permet de détecter les carences en cet élément. KLEPPER *et al.* (1971), NICHOLAS *et al.* (1976 *b*) montrent que la comparaison des tests avec ou sans apport d'intermédiaires métaboliques susceptibles de donner naissance à du NAD (P) réduit permet de mesurer les déficiences en réserves énergétiques pour la réduction des nitrates. BLONDEL et BLANC (1975), RADIN *et al.* (1975) introduisent les notions de test potentiel ou instantané, c'est-à-dire avec ou sans addition de nitrates exogènes dans le milieu d'incubation. La comparaison de ces deux tests permettrait de juger la fertilisation azotée.

Généralement les milieux d'incubation pour le test *in vivo* de la nitrate réductase contiennent des produits tensioactifs dans le but d'améliorer le contact entre le milieu d'incubation et les fragments de tissus. Quelques comparaisons sommaires de ces tensioactifs ont été faites par JAWORSKI (1971), TINGEY *et al.* (1974), NICHOLAS *et al.* (1976 *a*) et BRUNETTI et HAGEMAN (1976). FERRARI *et al.* (1973) suggèrent que les tensioactifs sont capables de libérer les nitrates du compartiment de stockage dans le compartiment métabolique. Il nous est apparu important de préciser cette hypothèse pour connaître quelle est la contribution réelle du tensioactif dans le test, et de rechercher une méthode directe de mise en évidence des compartiments nitriques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les plants de Tabac (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samson), cultivés sur compost en pots individuels, ont été élevés 2 mois sous serre, puis 1 mois en phytotron sous les conditions suivantes : 16 h de jour à 25°C et 8 h de nuit à 15°C. L'humidité était de 70 pour cent et l'éclairement de 15 000 lux (tubes fluorescents Sylvania Cool-White et Gro-Lux dans la proportion 6/1). La teneur en azote nitrique des feuilles est d'environ 3 pour mille de la matière sèche.

Les prélèvements ont eu lieu en milieu de photopériode sur des feuilles bien développées ne subissant aucun ombrage. En bordure de feuille, des rondelles de 6 mm de diamètre sont découpées à l'emporte-pièces en évitant les nervures apparentes, et transférées chacune dans un tube Eppendorf en présence de 750 µl de milieu d'incubation. On pratique alors deux infiltrations sous vide successives, puis le milieu est prélevé pour analyse et remplacé par 750 µl de milieu neuf. Ce prélèvement constitue le temps 0 des cinétiques de diffusion. De même le remplacement et l'analyse du milieu a lieu toutes les 30 min au cours de l'incubation, faite à 30°C à l'obscurité.

Les différentes conditions d'incubation sont réalisées simultanément sur des rondelles différentes prélevées sur une même feuille. Les répétitions, au moins 5, portent sur des feuilles différentes.

La composition du milieu d'incubation est dérivée de celle de BLONDEL et BLANC (1975) :

Tampon TRIS pH 7,4 12,5 mM, KCl ou KNO_3 125 mM, Triton X100 (Koch-Light LTD), dont les concentrations en grammes pour 100 ml, sont précisées dans le texte.

Les dosages sont faits par un analyseur automatique à flux continu, utilisant le principe de la réduction des nitrates en nitrites par un fil de cadmium selon STAINTON (1974) et le dosage colorimétrique des nitrites selon SNELL et SNELL (1949).

Les résultats sont exprimés en µg d'azote nitrique ou nitreux par dm^2 de feuille. Le poids frais d'une rondelle de 6 mm de diamètre étant d'environ 7 mg, on peut admettre une masse de 2,5 g de matière fraîche par dm^2 de feuille.

Les tensions superficielles ont été mesurées par un tensiomètre utilisant le principe de la mesure de la tension d'arrachement d'une lame à la surface de la solution.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La figure 1 présente l'évolution de la vitesse de diffusion des nitrites dans un milieu d'essai sans nitrates, ou test instantané, en présence de diverses concentrations en Triton X100. Cette série de courbes a été réalisée sur des rondelles prélevées sur une même feuille, et cinq répétitions de cette expérience ont été faites. Dans tous les cas l'allure générale des cinétiques a été reproductible à concentration en Triton X100 comparable, bien que les vitesses de diffusion aient beaucoup varié en valeur absolue entre répétitions. Il est clair sur cette figure que l'addition de Triton X100 permet d'accroître considérablement les activités de diffusion initiales, mais on peut aussi constater que les concentrations intermédiaires, en particulier 0,05 pour cent, font apparaître deux activités successives de diffusion des nitrites.

On peut déduire de cette observation qu'il existe soit deux fractions cellulaires d'un substrat ou d'un cofacteur indispensables à l'activité nitrate réductase, soit deux massifs cellulaires (parenchymes lacunaires et palissadiques par exemple) qui seraient mis successivement ou simultanément en contact avec le milieu d'incubation selon la concentration en surfactif.

La figure 3 présente l'évolution de la vitesse de diffusion des nitrites dans un milieu d'essai contenant des nitrates, ou test potentiel, en présence des mêmes concentrations en Triton X100 que la figure 1. On constate qu'en présence de nitrates exogènes les cinétiques sont devenues uniformes, ne faisant plus apparaître nettement

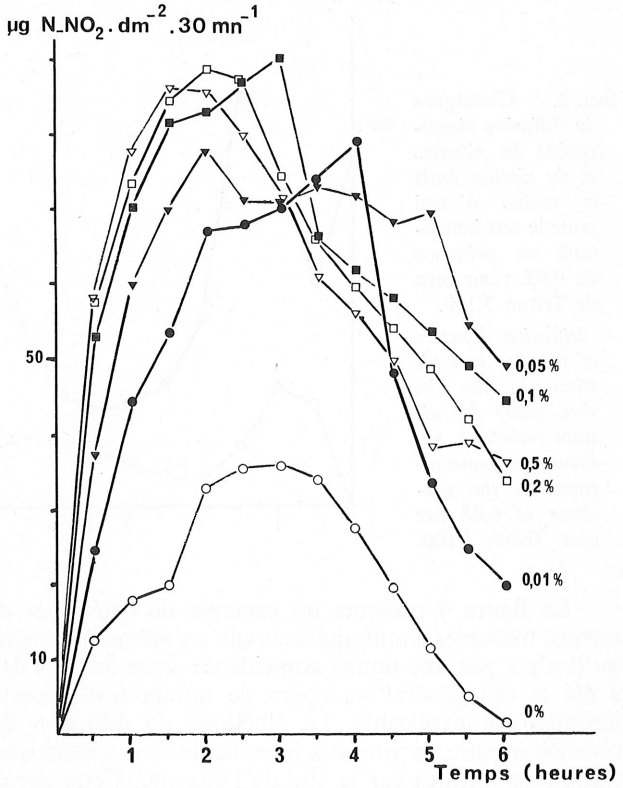

FIG. 3. — Cinétiques de diffusion des nitrites dans le milieu d'essai pour le test potentiel en présence de diverses concentrations en Triton X100. Ces concentrations sont précisées auprès de chaque courbe.

— *Diffusion kinetics of nitrites in the* in vivo *assay for nitrate reductase with exogenous nitrates as influenced by various concentrations of Triton X*100. *These are specified near to the curves.*

qu'un seul pic d'activité de diffusion. De plus les activités observées sont nettement supérieures à celles en l'absence de nitrates apportés. Il semble donc que dans le test instantané les nitrates aient été le facteur limitant de la réaction enzymatique, en particulier entre les deux pics observés à la concentration de 0,05 pour cent en Triton X100. Dans ce cas les deux pics de diffusion de nitrites seraient dus à la mise en contact successive de deux pools de nitrates avec l'enzyme nitrate réductase.

Si cette dernière hypothèse est exacte on doit pouvoir observer au cours de tests instantanés des cinétiques de diffusion des nitrates endogènes de même forme que les cinétiques de diffusion des nitrites. On constate en effet sur la figure 2 qu'aux faibles concentrations en Triton X100 il diffuse peu de nitrates initialement et qu'une diffusion importante ne commence qu'au bout de 3 à 4 h d'incubation. En fait, en l'absence de Triton X100, les cinétiques de diffusion sont peu reproductibles, parfois nulles pendant toute la durée d'incubation. Aux concentrations intermédiaires en Triton X100 on observe un pic initial de diffusion important, et une seconde diffusion qui commence au bout de 3 h d'incubation. En particulier pour la concentration 0.05 pour cent en Triton X100, nous avons le plus souvent observé des courbes semblables à celle de la figure 4. Aux concentrations élevées en Triton X100 on observe généralement plus qu'un seul pic de diffusion très intense ou deux pics rapprochés. Pour ces concentrations nous avons pu vérifier qu'il ne restait plus de nitrates dans les rondelles de feuilles en fin d'incubation.

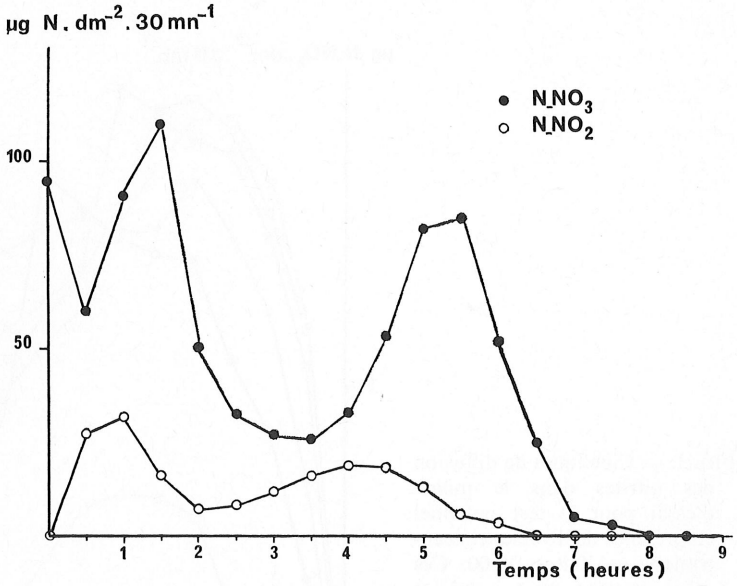

FIG. 4. — Cinétiques de diffusion simultanées de nitrates et de nitrites dans le milieu d'essai pour le test instantané en présence de 0,05 pour cent de Triton X100.

— *Diffusion kinetics of nitrates and nitrites in the* in vivo *assay for nitrate reductase without exogenous nitrates in the presence of* 0,05 *per cent Triton X*100.

La figure 4 présente un exemple de cinétiques de diffusion de nitrates et de nitrites mesurées simultanément sur un même fragment de feuille. On peut constater qu'il n'y a pas une bonne coïncidence entre les pics de nitrates et de nitrites, et cela a été le cas général au cours de nombreuses répétitions. Ce phénomène paraît parfaitement explicable. La cinétique de diffusion des nitrites traduit, dans une certaine mesure, la vitesse à laquelle ils sont synthétisés, ce qui dépend de la concentration en nitrates sur le site de l'enzyme. Cette dernière décroît lorsque l'on voit

apparaître une diffusion de nitrates, et ce d'autant plus vite que l'on approche du sommet du pic de diffusion. On peut donc s'attendre à ce que la vitesse de diffusion des nitrites commence à décroître lorsque la vitesse de diffusion des nitrates augmente rapidement. Le phénomène reste cependant difficile à décrire avec précision, la vitesse de diffusion des nitrites dépendant aussi de paramètres physiques de diffusion qui évoluent au cours du temps sous l'action du Triton X100. Ces considérations rendent difficilement prévisible le décalage entre pics de nitrates et de nitrites.

Le Triton X100 a donc un mode d'action complexe dans les tests *in vivo* de la nitrate réductase. En premier lieu il augmente la vitesse de diffusion des nitrites ou (et) des nitrates entre le site de la réaction enzymatique et le milieu d'incubation comme le montre la figure 5. C'est le rôle que l'on a le plus souvent attribué aux surfactifs dans la littérature sur le test *in vivo*, en supposant généralement qu'ils agissent en augmentant la mouillance du milieu d'incubation. La figure 6 représente l'abaissement de tension superficielle du milieu d'incubation par le Triton X100, et permet de voir que la concentration micellaire critique se situe aux environs de 0,01 pour cent. Au-delà de cette valeur la tension superficielle ne varie pratiquement plus, alors que les activités de diffusion des nitrites augmentent encore considérablement (*fig.* 5). Il est donc probable que les micelles de Triton X100 participent à la solubilisation de certains constituants des membranes cellulaires, en modifiant ainsi la perméabilité.

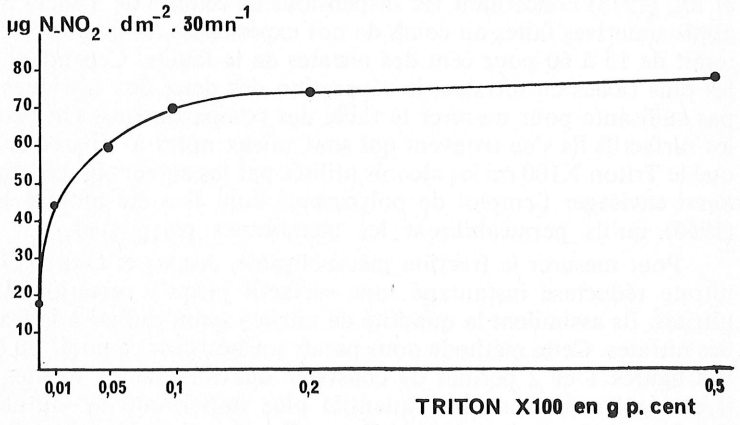

FIG. 5. — Vitesse de diffusion des nitrites dans le milieu d'essai pour le test potentiel au bout d'une heure d'incubation, en fonction de la concentration en Triton X100.

— *Triton X100 concentration effect on diffusion rates of nitrites after one hour incubation in the* in vivo *assay for nitrate reductase with exogenous nitrates.*

En second lieu le Triton X100 modifie la répartition des nitrates intra-cellulaires en changeant les caractéristiques de perméabilité de la membrane qui limite le compartiment de stockage des nitrates. Cet événement se produit d'autant plus tôt que la concentration en Triton X100 est plus élevée, ce qui expliquerait qu'à 0,05 pour cent, on peut observer deux pics distincts de sorties de nitrates et de nitrites (*fig.* 4) et qu'à 0,5 pour cent on n'observe plus qu'un seul pic de diffusion très élevé, dans lequel on ne peut plus distinguer les nitrates du compartiment de stockage de ceux du compartiment métabolique (*fig.* 2).

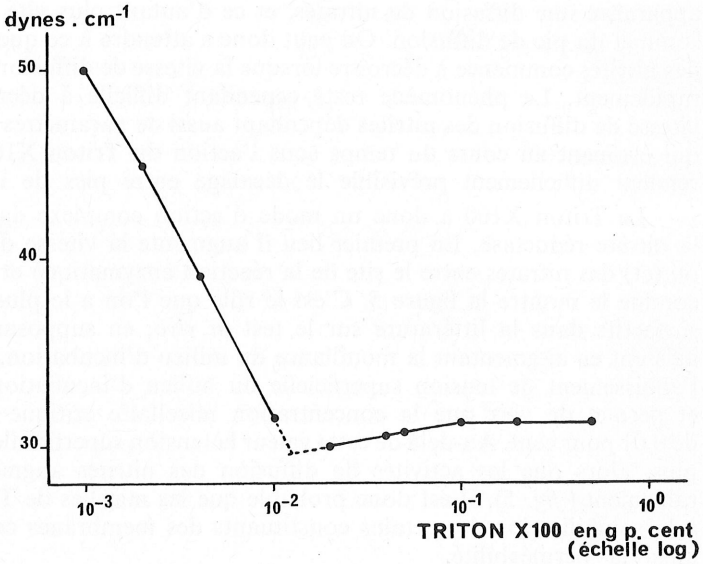

FIG. 6. — Influence du Triton X100 sur la tension superficielle des milieux d'essai pour les tests instantané ou potentiel.

— *Triton X100 effect on the surface tension of* in vivo *assay mediums for nitrate reductase.*

CONCLUSIONS

Ces résultats confirment l'existence de plusieurs compartiments intracellulaires de nitrates dans les feuilles de Tabac, en accord avec les conclusions de FERRARI *et al.*, (1973) concernant les suspensions de cellules de Tabac. Selon les estimations approximatives faites au cours de nos expériences, la fraction métabolique représenterait de 15 à 60 pour cent des nitrates de la feuille. Cependant sur les échantillons les plus riches en nitrates, la séparation des deux flux nitriques n'est généralement pas suffisante pour mesurer la taille des compartiments. On peut penser que parmi les surfactifs ils s'en trouvent qui sont mieux aptes à séparer les fractions nitriques que le Triton X100 ou les alcools utilisés par les auteurs précédemment cités. On peut aussi envisager l'emploi de polycations dont il a été montré par SIEGEL et DALY (1966) qu'ils perméabilisent les membranes plasmiques.

Pour mesurer la fraction métabolisable, ASLAM et OAKS (1975) utilisent un test nitrate réductase instantané sans surfactif jusqu'à cessation de la production de nitrites. Ils assimilent la quantité de nitrites ayant diffusé à la fraction métabolisable des nitrates. Cette méthode nous paraît sous-estimer ce pool. En effet la comparaison des figures 1 et 2 permet de constater que lorsque les nitrites cessent de diffuser il est également sorti une quantité plus importante de nitrates, et souvent ces derniers n'ont pas cessé de diffuser. De plus il serait imprudent de se fier à une corrélation entre les quantités de nitrates et de nitrites qui diffusent, le rapport entre ces deux valeurs dépendant de l'activité nitrate réductase.

BLONDEL et BLANC (1975) ont montré que l'activité nitrate réductase dépend en particulier de la teneur en nitrates du matériel végétal. FRANCO *et al.* (1979) suggèrent que l'activité de réduction des nitrates *in situ* dépend de la taille du compartiment métabolique de nitrates. Une méthode de mesure des compartiments nitriques s'avère donc indispensable à la compréhension de la façon dont les plantes gèrent l'azote minéral et de l'influence de divers paramètres de l'environnement sur cette gestion.

BIBLIOGRAPHIE

ASLAM M. et OAKS A., 1975. — Effect of glucose on the induction of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.*, **56**, 634-639.

ASLAM M., OAKS A. et HUFFAKER R. C., 1976. — Effect of light and glucose on the induction on nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.*, **58**, 588-591.

BLONDEL A. M. et BLANC D., 1975. — Mise au point d'une méthode de mesure *in vivo* de l'activité nitrate réductase. Possibilités d'applications agronomiques en matière de diagnostic. *Ann. Agron.*, **26**, 309-322.

BRUNETTI N. et HAGEMAN R. H., 1976. — Comparisons of *in vivo* and *in vitro* assays of nitrate reductase in wheat seedlings. *Plant Physiol.*, **58**, 583-587.

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

FRANCO A. A., PEREIRA J. C. et NEYRA C. A., 1979. — Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.*, **63**, 421-424.

HEIMER Y. M. et FILNER P., 1971. — Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system. *Biochim. biophys. Acta*, **230**, 362-372.

JACKSON W. A., FLESHER D. et HAGEMAN R. H., 1973. — Nitrate uptake by dark grown corn seedlings. Some characteristics of apparent induction. *Plant Physiol.*, **51**, 120-127.

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

JONES R. W. et SHEARD R. W., 1975. — Phytochrome, nitrate movement, and induction of nitrate reductase in etiolated pea terminal buds. *Plant Physiol.*, **55**, 954-959.

KLEPPER L., FLESHER D. et HAGEMAN R. H., 1971. — Generation of reduced adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.*, **48**, 580-590.

MULDER E. G., BOXMA R. et VAN VEEN W. L., 1959. — The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on nitrate reduction in plant tissues. *Plant and Soil*, **X**, 335-355.

NICHOLAS J. C., HARPER J. E. et HAGEMAN R. H., 1976 *a*. — Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max*. L. Merr.). I. effects of light and temperature. *Plant Physiol.* **58**, 731-735.

NICHOLAS J. C., HARPER J. E. et HAGEMAN R. H., 1976 *b*. — Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max*. L. Merr.). II. Energy limitations. *Plant Physiol.*, **58**, 736-739.

RADIN J. W., SELL C. R. et JORDAN W. R., 1975. — Physiological significance of the *in vivo* assay for nitrate reductase in cotton seedlings. *Crop Sc.*, **15**, 710-713.

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

SIEGEL S. M. et DALY O., 1966. — Regulation of betacyanin efflux from beet root by poly-L-lysine, Ca ion and other substances. *Plant Physiol.*, **41**, 1429-1434.

SNELL F. D. et SNELL C. T., 1949. — *Colorimetric methods of analysis*. D. van Nostrand Company Inc., New York, Vol. II, 804-805.

STAINTON M. P., 1974. — Simple, efficient reduction column for use in the automated determination of nitrate in water. *Anal. Chem.*, **46**, 1616.

TINGEY D. T., FITES R. C. et BAHARSJAH J., 1974. — Factors influencing nitrate reduction in soybean foliage. *New Phytol.*, **73**, 21-29.