

Mesures *in vivo* et *in vitro* de l'activité nitrate réductase dans les feuilles de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* var. *Maghribel*)

Fatima NAMAN¹, Driss ZAOUÏ¹✧, Abdelaziz OUAÏKA² & Abdelali CHRAÏBI¹

(Reçu le 06/04/1995 ; Accepté le 02/09/1996)

تحليل أنزيم نشاط "نترات رديكتاز" في أوراق الشمندر السكري

إن نشاط أنزيم نترات رديكتاز، قد تم الحصول عليه في أوراق الشمندر السكري بطريقة تحليله في الجسم الحي و في مختبر مصطنع (*in vivo* و *in vitro*) هاتان الطريقتان ساعدتا على قياس نشاط النترات رديكتاز عند الشمندر السكري و بالتالي إيجاد طريقة للحصول على نشاط هذا الأنزيم عند نفس النبتة. و لهذا فإن نشاط النترات رديكتاز عند أوراق الشمندر السكري قد كبح نظرا لإفراط النترات المستخرج من الأوراق.

الكلمات المفتاحية : الشمندر السكري - نترات رديكتاز - *in vitro* - *in vivo*

Mesures *in vivo* et *in vitro* de l'activité nitrate réductase dans les feuilles de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* var. *Maghribel*)

Une activité nitrate réductase (ANR) foliaire a été détectée chez la betterave à sucre à l'aide de méthodes de mesure *in vivo* et *in vitro*. Ces méthodes ont permis d'établir une méthodologie de mesure de l'ANR et de montrer que l'enzyme foliaire chez la betterave à sucre est inhibée par un excès de substrat.

Mots clés : Betterave à sucre - *Beta vulgaris* - Nitrate réductase - *In vivo* - *In vitro*

In vivo and *in vitro* detection of leaf nitrate reductase activity in in sugar beet (*Beta vulgaris* var. *Maghribel*)

A leaf nitrate reductase activity (NRA) in sugar beet is detected using *in vivo* and *in vitro* assays. These techniques allowed detecting NRA in sugar beet and establishing consequently a measure procedure of the enzyme activity in the same plant. These measure procedures revealed that leaf nitrate reductase in sugar beet is inhibited by a substratum excess.

Key words: Sugar beet - *Beta vulgaris*- Nitrate réductase - *In vivo* - *In vitro*

¹ Université Abou Chouaïb Doukkali, Faculté des Sciences, Département de Biologie, B.P. 20, El Jadida, Maroc

² Office Régional de Mise en Valeur Agricole des Doukkala (ORMVAD), Service de Production Végétale, B.P. 58, El Jadida, Maroc

✧ Auteur correspondant

INTRODUCTION

L'azote absorbé par la plante est transformé en azote réduit protéique grâce à l'énergie fournie par l'assimilation photosynthétique. Les processus impliqués dans le métabolisme azoté, sont sous contrôle enzymatique. La nitrate réductase est l'une des plus importantes enzymes, vu son rôle capital dans la réduction des nitrates (Chu *et al.*, 1990 ; Chu, 1991 ; Habib, 1984 ; Jonas *et al.*, 1992). Elle peut utiliser le NADH ou le NADPH comme donneur d'électrons (Campbell, 1988 ; Guerrero *et al.*, 1981 ; Hewitt, 1975 ; Mann *et al.*, 1978 ; Redinbaugh & Campbell, 1991).

La régulation de l'ANR dans différents tissus a fait l'objet de nombreux travaux (Cathala *et al.*, 1992 ; Dorchies & Rambour, 1983). En effet à notre connaissance la régulation de l'ANR n'est pas bien étudiée chez la betterave à sucre, ce qui nous a poussé à mettre au point une méthodologie de mesure de l'activité nitrate réductase (ANR) chez la betterave à sucre. Ainsi, nous avons étudié l'effet des concentrations en substrat et en NADH sur l'ANR *in vitro* d'une part, et nous avons déterminé les constantes cinétiques de la nitrate réductase d'autre part.

MATÉRIEL & MÉTHODES

L'expérimentation *in vivo* et *in vitro* de l'activité nitrate réductase (ANR) est réalisée sur des limbes de jeunes feuilles de betterave à sucre (variété Maghribel) durant la période de croissance active (première année de végétation) ou l'ANR est très importante.

Ces betteraves à sucre sont cultivées sur un sol de type argilo-sableux. Ces plantes ont reçues une fertilisation azotée (sulfate d'ammonium 21% et l'urée 46%) de 250 unités par hectare (Kg/Ha) apportées en 3 fractions ; 300 et 150 unités par hectare respectivement de sulfate de potassium 48% et de supertriplephosphate 45%).

L'irrigation a été assurée à partir de l'eau du barrage d'El Massira. Le besoin en eau global de la betterave à sucre est en moyenne de 680 m³.

• Mesure *in vivo* de l'ANR

Le principe de la mesure de l'ANR *in vivo* consiste à doser les nitrites formés après la réduction du nitrate par des fragments de tissu de feuilles de betterave à sucre. Ces fragments sont incubés dans

des conditions d'anaérobiose, selon le procédé modifié de Ferrari & Varner (1981) et de Jaworski (1971). Environ 0,2 g de tissu frais sont incubés dans 5 ml d'un milieu réactionnel constitué de tampon phospho-potassique 0,1 M (pH 7,5) et de KNO₃ comme substrat à 20 mM.

Après avoir dégazé le tube pendant 3 minutes, le tube fermé hermétiquement est placé à l'obscurité, dans un bain-marie thermostaté à 28°C. Après 1 heure d'incubation, les nitrites formés sont révélés par addition de 1 ml de sulfanilamide à (0,2%) et de 1 ml de chlorhydrate de N-(1-naphtyl-éthylène) diamine (0,15%).

En présence de nitrite, il apparaît une coloration rose dont l'absorbance à 540 nm est déterminée par spectrophotométrie. La quantité de nitrite est ensuite calculée à partir d'une gamme d'étalonnage, concentrations de NaNO₂ allant de 0.01 à 0.10 µmole. L'activité enzymatique est exprimée en µmole de NO₂⁻ formé par heure et par gramme de matière fraîche (µmole NO₂⁻.h⁻¹. g⁻¹ de MF).

• Mesure *in vitro* de l'ANR

La mesure de l'ANR *in vitro* est réalisée à l'aide de préparations à 4°C d'un extrait de fragments de tissus frais (limbes de jeunes feuilles). Ces derniers sont broyés dans un mortier en présence de l'azote liquide puis repris dans un tampon phosphate:

- Tampon phosphate KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M, pH = 7,5;
- EDTA : 30 mM;
- Polyclar AT: 5 g/100ml.

Le broyat est ensuite centrifugé à froid pendant 30 minutes à 13.000 g.

Après homogénéisation, on procède à une filtration sur gaze, et le filtrat constitue l'extrait enzymatique brut. Cet extrait est fractionné grossièrement par précipitation au sulfate d'ammonium.

À 50% de saturation en sulfate d'ammonium, la nitrate réductase est précipitée et le surplus de nitrate est éliminé dans le surnagent après centrifugation à froid à 13 000 x g pendant 30 minutes.

L'activité nitrate réductase est mesurée en utilisant le NADH comme donneur d'électrons, 100 µl d'extrait enzymatique sont ajoutés au milieu d'incubation suivant:

- 1 ml du tampon d'extraction 0,1 M; pH = 7,5;
- KNO₃ 0,1M;
- NADH 1mM.

L'incubation est réalisée à l'obscurité dans un bain-marie thermostaté à 28°C pendant 15 minutes, la réaction enzymatique est arrêtée par les réactifs de diazotation des nitrites.

La lecture de l'absorbance se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm. Les activités enzymatiques sont exprimées en μmole de nitrites formés par heure et par gramme de matière fraîche.

• Dosage des nitrates

La méthode utilisée consiste en une solubilisation des nitrates à partir de poudre végétale obtenue en séchant l'échantillon à l'étuve à 70 °C pendant 48 heures.

Cent milligrammes de poudre sont mis dans une fiole avec 20 ml d'eau distillée, fermée et portée au bain-marie thermostaté à 45°C pendant 1 heure. Après centrifugation pendant 15 minutes à 13.000 g le surnageant est retenu pour le dosage des nitrates par la méthode de Rodier (1971). A 50 μl de solution de NO_3^- ou de surnageant, sont ajoutés 200 μl de SSA (acide sulfosalicylique à 5% d'acide sulfurique concentré).

Après 20 minutes à température ambiante, on ajoute 4,75 ml de NaOH (2N). Après retour à température ambiante, on procède à la lecture au spectrophotomètre à 410 nm (coloration jaune stable pendant 48 heures). Les concentrations en nitrates sont calculées à partir d'une gamme d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution mère de KNO_3 à 0.01 M.

Les résultats présentés sont exprimés par la moyenne et l'intervalle de confiance, et calculés au risque de 5% ($n = 6$).

RÉSULTATS & DISCUSSION

1. Méthode de mesure *in vivo* de l'ANR

• Effet de la variation de la concentration du substrat sur l'ANR foliaire

La figure 1 illustre la vitesse de formation des nitrites en fonction de la concentration en substrat naturel (KNO_3) de la nitrate réductase. On constate qu'entre 2 à 20 mM, la vitesse est proportionnelle à la concentration du substrat; et qu'au delà de 20 mM, l'inhibition par excès du substrat est bien marquée.

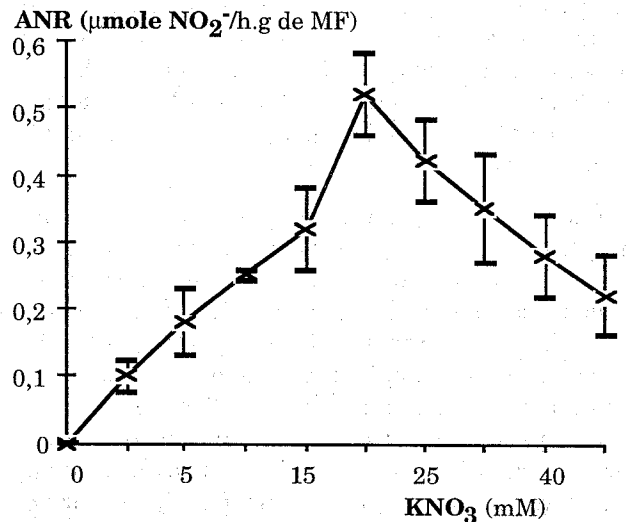


Figure 1. Effet de la concentration du substrat sur l'activité nitrate réductase foliaire mesurée *in vivo*

Ceci signifie vraisemblablement que la fraction métabolisable située dans le cytoplasme correspond à des concentrations qui deviennent inhibitrices de l'activité de l'enzyme (Robin *et al.*, 1983).

La concentration en nitrate du milieu d'incubation (20 mM) donne une activité maximale de la nitrate réductase de l'ordre de $0,52 \mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de MF. Cette même concentration a été utilisée par Johnsen *et al.*, (1991) pour la mesure de l'ANR *in vivo* chez *Robinia pseudoacacia*.

• Influence du pH du milieu d'incubation sur l'ANR foliaire

L'ANR est nulle pour des pH allant de 3,6 à 5 (Figure 2).

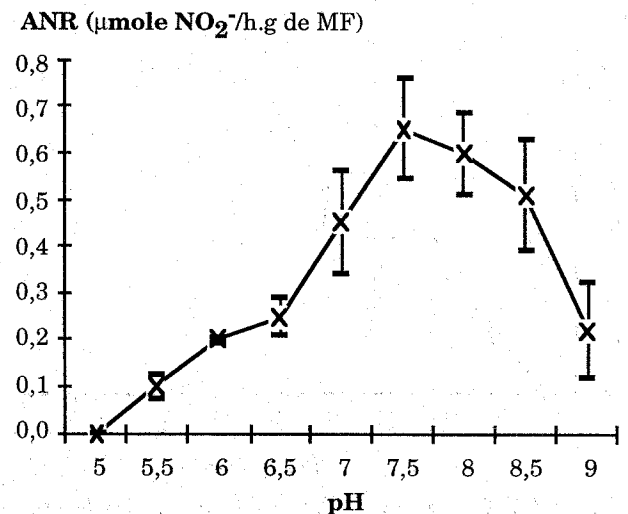


Figure 2. Effet du pH sur l'activité nitrate réductase foliaire mesurée *in vivo*

À partir du pH 5,5 l'ANR augmente progressivement pour atteindre une valeur maximale aux environs de $0,65 \mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ MF dans un tampon phosphate à pH 7,5, au-delà de cette valeur, l'activité nitrate réductase diminue rapidement.

L'activité de l'enzyme dépend donc des variations du pH du milieu, ce dernier a une influence soit :

* Au niveau de l'enzyme : le pH entraînerait des modifications de l'état d'ionisation d'un certain nombre de groupements qui participent à la formation du complexe ES. Le pH contribue au maintien de la conformation de l'enzyme.

* Au niveau du substrat : les variations du pH du milieu modifient le degré d'ionisation du substrat et, par conséquent, il n'y aura pas de formation du complexe ES.

Nos résultats concordent avec ceux décrits par Johnsen *et al.*, (1991); Aslam et Oaks (1975); Rambour *et al.*, (1983); Yoneyama (1981) et Dorchie et Rambour (1983).

Effet de la durée d'incubation sur l'ANR foliaire: l'évolution de l'ANR en fonction de la durée d'incubation montre que la formation des nitrites est linéaire entre 0 à 60 minutes d'incubation.

La quantité de nitrite formée au bout d'une heure est de $0,60 \mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de MF (Figure 3). Au-delà de cette durée, la quantité de nitrite est constante. Ce résultat, nous montre que l'enzyme est stable dans nos conditions expérimentales. Ce résultat est comparable à celui obtenu par Bussi *et al.*, (1989); Johnsen *et al.*, (1991); Chu *et al.*, (1990) et Yoneyama (1981).

ANR ($\mu\text{mole NO}_2^- / \text{h.g de MF}$)

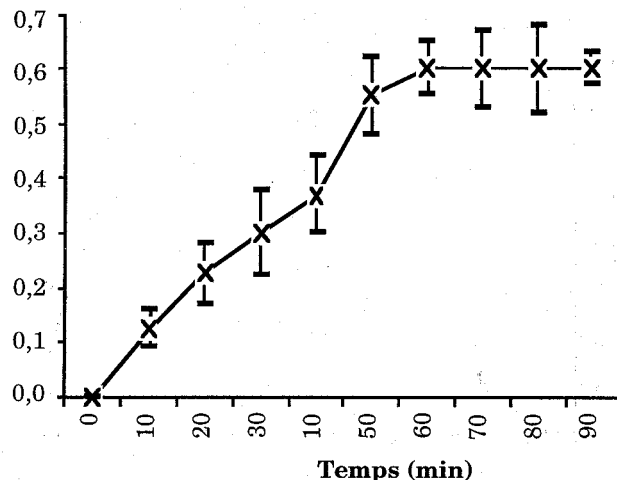


Figure 3. Effet du temps d'incubation sur l'activité nitrate réductase foliaire mesurée *in vivo*

• Influence de la température sur l'ANR foliaire

La figure 4 fait apparaître une température optimale qui est de l'ordre de 28°C . Au delà de cette température, l'ANR diminue et ceci est engendrée par la dénaturation thermique de l'enzyme.

2. Méthode de mesure *in vitro* de l'ANR

• Influence de la concentration de nitrate sur l'ANR foliaire

La détermination des constantes cinétiques vis-à-vis du substrat (KNO_3) n'ont été faites qu'après élimination d'une quantité importante de KNO_3 de la préparation enzymatique par double précipitations au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 50% (Tableau 1).

La cinétique de transformation des nitrates en nitrites par la nitrate réductase augmente pour des concentrations comprises entre 0 et $3,66 \text{ mM}$ (Figure 5). Au-delà, on observe une diminution de l'ANR ceci s'explique par une inhibition de l'ANR.

ANR ($\mu\text{mole NO}_2^- / \text{h.g de MF}$)

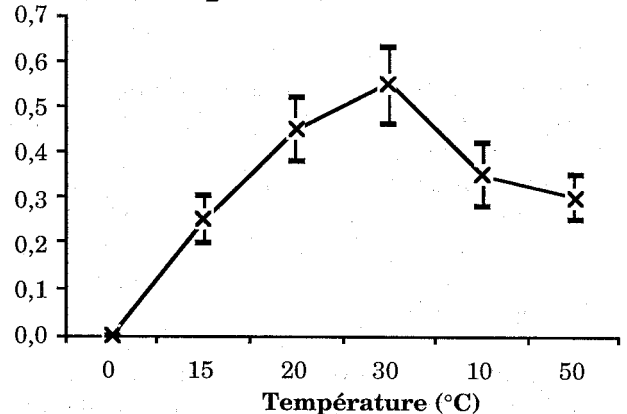


Figure 4. Effet de la température sur l'activité nitrate réductase foliaire mesurée *in vivo*

Tableau 1. Précipitation protéique au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 50%

	Extrait brut	Précipitation 1		Précipitation 2	
		Culot	Surnageant	Culot	Surnageant
ANR	3,36 $\pm 0,134$	2,055 $\pm 0,456$	0,55 $\pm 0,136$	0,45 $\pm 0,136$	0
NO_3^-	23,48.102 $\pm 2,43.102$	2,58.102 $\pm 0,49.102$	16,58.102 $\pm 1,94.102$	0,80.102 $\pm 0,23.102$	3,1.102 $\pm 0,83.102$

ANR = Activité Nitrate Réductase exprimée en $\mu\text{mole de NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de matière fraîche (MF)

NO_3^- = Nitrate exprimé en mg/g de matière fraîche (MF)

Les résultats sont exprimés par la moyenne et l'intervalle de confiance, et calculés au risque de 5 % ($n=6$).

ANR ($\mu\text{mole NO}_2^-/\text{h.g de MF}$)

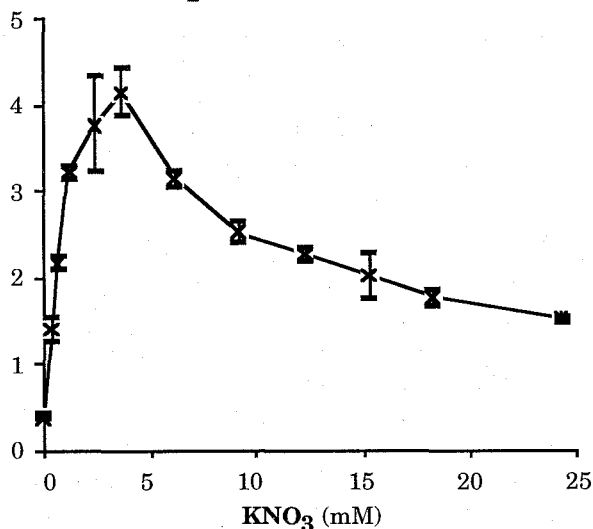
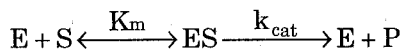


Figure 5. Effet de la concentration de KNO₃ sur l'activité nitrate réductase foliaire mesurée *in vitro*

En outre, cette activité est optimale pour la concentration du substrat de 3,66 mM qui donne une ANR de l'ordre de 4.14 $\mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de MF. Ce résultat reste environ 2 fois supérieur aux ANR maximales obtenues par Klepper & Hageman (1969) sur pommier (1,3 $\mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de MF) et par Leece *et al.*, (1972) sur abricotier (2,2 $\mu\text{mole NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de MF).

Pour expliquer ce phénomène, on admet qu'aux fortes concentrations de substrat, une deuxième molécule de substrat peut se fixer sur le site actif de l'enzyme et empêcher l'hydrolyse de la molécule de substrat productivement liée (Dixon, 1953).



La deuxième molécule de substrat se comporte comme un inhibiteur non compétitif avec une constante d'inhibition égale à K_i . On peut montrer que l'expression de la vitesse de réaction est de la forme suivante (Dixon, 1953):

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{S}{V_{max}} \cdot K_i$$

Aux faibles concentrations en substrat ($S \ll K_m$), le terme $\frac{S}{V_{max}} \cdot K_i$ devient négligeable et l'équation en double inverse s'écrit:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S}$$

Cette équation donne lieu à la représentation graphique (Figure 6) qui permet de calculer K_m (NO_3^-). La valeur de $K_m(\text{NO}_3^-)$ obtenue est égale à 0,74 mM et elle reste dans les normes trouvées par Hageman & Reed (1980) chez le blé, et 3,75 fois supérieure à celle trouvée par Robin *et al.*, (1983) chez le pois.

1/v ANR ($\mu\text{mole}^{-1} \text{NO}_2^- \cdot \text{h.g de MF}$)

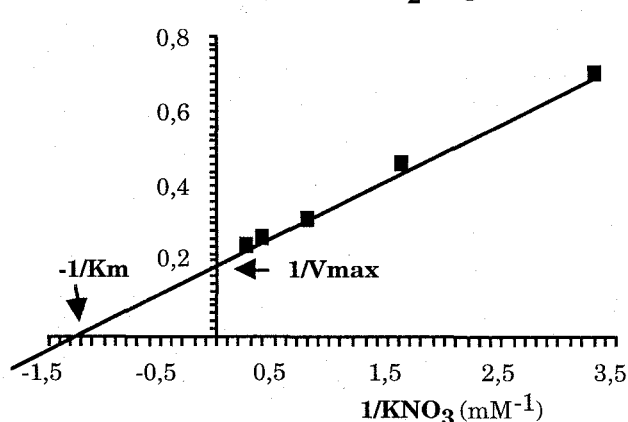


Figure 6. Représentation graphique de Lineweaver & Burk

Aux fortes concentrations en substrat ($S \gg K_m$), le terme $\frac{K_m}{V_{max} \cdot S}$ devient négligeable et l'équation en double inverse s'écrit:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot K_i$$

Cette équation donne lieu à la représentation graphique (Figure 7) qui permet de calculer la constante d'inhibition K_i . La valeur de $K_i(\text{NO}_3^-)$ est égale à 10.75 mM.

1/v ANR ($\mu\text{mole}^{-1} \text{NO}_2^- \cdot \text{h.g de MF}$)

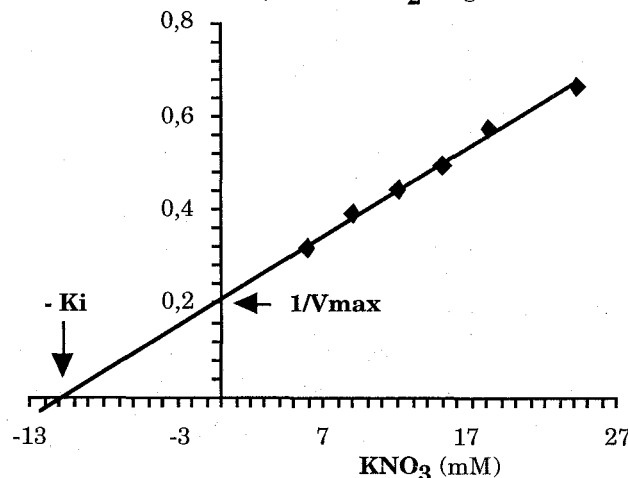


Figure 7. Représentation graphique de Dixon-Weeb

• Influence de la concentration de NADH sur l'ANR foliaire

Les vitesses de réaction en fonction des concentrations de NADH correspondent à une cinétique du type Michaélien (Figure 8). La constante d'affinité a été déterminée selon la représentation de Lineweaver & Burk ($1/v=f(1/s)$) (Figure 9).

La valeur de la constante d'affinité K_m (NADH) est égale à 6.10^{-5} M, cette valeur reste comparable à celle trouvée par Jones *et al.* (1985) chez le blé.

ANR ($\mu\text{mole NO}_2^-/\text{h.g de MF}$)

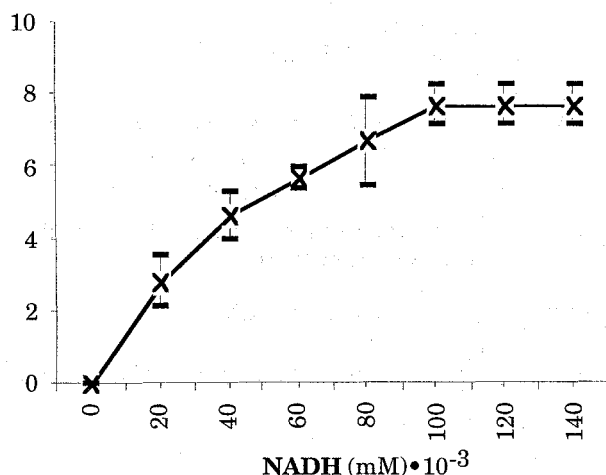


Figure 8. Effet de la concentration de NADH sur l'activité nitrate réductase foliaire mesurée *in vitro*

$1/v$ ANR ($\mu\text{mole}^{-1} \text{NO}_2^- \cdot \text{h.g de MF}$)

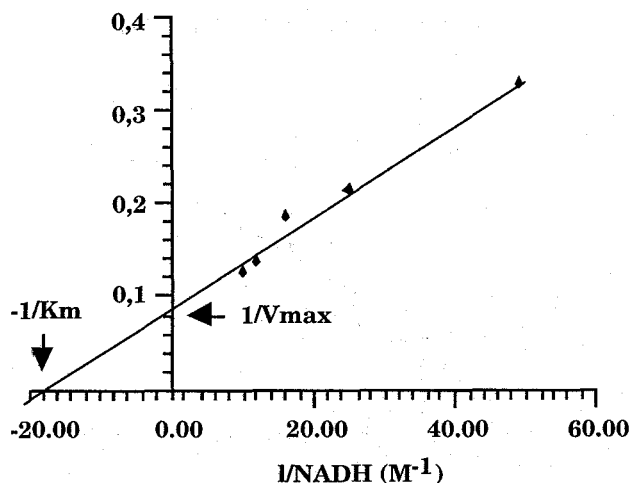


Figure 9. Représentation graphique de Lineweaver & Burk

CONCLUSION

Les principaux résultats sont résumés dans les points suivants:

- La mise au point de deux méthodes de mesure de l'ANR chez la betterave à sucre qui sont les méthodes *in vivo* et *in vitro*.
- L'ANR dans le cas de la méthode *in vivo* est maximale à une concentration de substrat de 20 mM, pH 7,5, une température d'incubation de 28°C et ceci pendant une durée d'incubation d'une heure. Ainsi, ces deux méthodes de mesure ont montré que la nitrate réductase foliaire est inhibée par un excès de substrat. Ce résultat apporte une contribution significative concernant la régulation intracellulaire de la nitrate réductase par son substrat, étant donnée que les ions nitrites sont toxiques et, par conséquent, ils ne peuvent pas être formés continuellement et en forte concentrations dans les cellules.
- Les constantes d'affinité et d'inhibition de l'ANR ont été déterminées par la méthode *in vitro* :
 $K_m(\text{NO}_3^-) = 0,74 \text{ mM}$,
 $K_m(\text{NADH}) = 6.10^{-5} \text{ M}$,
 $K_i(\text{NO}_3^-) = 10,75 \text{ mM}$.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Aslam M. & A. Oaks (1975) Effect of glucose on the induction of nitrate réductase in corn roots. *Plant Physiol.* 56: 634-639
- Bussi C., R. Habib & L. Salsac (1989) Mesures *in vivo* et *in vitro* de l'activité nitrate réductase chez le pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Agronomie* 9: 409-414
- Campbell W.H. (1988) Nitrate réductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiologia Plantarum* 74: 214-219
- Cathala N., G. Conejero, A. Gojon, L. Passam & P. Robin (1992) Determination of the distribution of three nitrate reductase isoforms in soybean seedlings by chromatography and a simple method based on assay conditions. *Physiol. Plant.* 85: 541-548
- Chu C.C., L.E. Graham & L.A. Bariola (1990) A simple method to assay *in vivo* nitrate réductase activity and nitrate-nitrogen content in cotton petioles. *J. Agriculture, Association of China*, New series 152 : 13-19
- Chu C.C. (1991) *In vivo* leaf and petiole nitrate réductase activity, and nitrate content of selected vegetables during vegetative growth. *J. Agriculture* 155 : 40-45

- Dixon M. (1953) *Biochem. J.* 55 : 170-171
- Dorchies .V & S. Rambour(1983) Activité de la nitrate réductase mesurée *in vivo* chez *Cichorium intybus* (*var. witloof*) au cours du forçage. *Physiol. Vég.* 21(4): 705-713
- Ferrari T.E. & J.E. Varner (1971) Intact tissue assay for nitrate réductase in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 47 : 790-794
- Guerrero M.G., J.M. Vega & M. Losada (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its régulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32 : 169-204
- Habib R. (1984) La formation des réserves azotées chez les arbres fruitiers. Revue bibliographique. *Fruits* 39: 623-635
- Hageman R.H. & A.T. Reed (1980) Nitrate réductase from higher plants. *Meth. Enzymol.* 69 : 270-280
- Hewitt E.J. (1975) Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26 : 73-100
- Jaworski E.G. (1971) Nitrate réductase assay in intact plant tissues . *Biochem.Biophys.Res.commun.* 43 : 1274-1279
- Johnsen K.H., B.C. Bongarten & L.R. Boring (1991) Effects of nitrate on *in vivo* nitrate réductase activity of seedlings from three open-pollinated families of *Robinia pseudoacacia*. *Tree Physiol.* 8: 381-389
- Jonas O.A., M.C. Pereyra, C. Cabeza, A.D. Golberg & J.F. Ledent (1992) Recovery of nitrate réductase activity in wheat leaves after a period of severe water stress. *Cereal Research Communications* 20 (2): 13-18
- Jones W.P. & M.N. Mhuimhneachhin (1985) The activity and stability of wheat nitrate réductase *in vitro*. *Phytochemistry* 24 (3): 385-392
- Klepper L. & R.H. Hageman (1969) The occurrence of nitrate réductase in apple leaves. *Plant Physiol.* 44 : 110-114
- Leece D.R., D.R. Dilley & A.L. Kenworthy (1972) The occurrence of nitrate réductase in leaves of *Prunus species*. *Plant Physiol.* 49: 725-728
- Mann A.F., D.P. Hucklesby & E.J. Hewitt (1978) Sources of reducing Power for nitrate reduction in Spinach leaves. *Planta* 140 : 261-263
- Rambour S., M. Poulle, J.L. Daniau & C. Brassart (1983) Régulation de l'activité nitrate réductase dans une suspension cellulaire de *Silene alba*.
- Redinbaugh M.G. et W.H. Campbell (1991) Higher plant responses to environmental nitrate. *Physiologia Plantarum* 82: 640-650
- Rodier J. (1971) Analyse chimique de l'eau. Méthode au salicylate de sodium. Ed. Dunod (4^{ème} édition)
- Robin P., G. Conejero, L. Passam & L. Salsac (1983) Evaluation de la fraction métabolisable du nitrate par la mesure *in situ* de sa réduction. *Physiol. Vég.* 21(1) : 115-122.
- Yoneyama T. (1981) ¹⁵N studies on the *in vivo* assay of nitrate réductase in leaves: Occurrence of underestimation of the activity due to dark assimilation of nitrate and nitrite. *Plant and cell Physiol.* 22(8) :157-1520