AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université Henri Poincaré
Laboratoire de Biologie Forestière

U.F.R Sciences.et Techniques Biologiques
E.D. Biologie Santé

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Henri Poincaré

Spécialité : Biologie Végétale et Forestière

par

Jean-Philippe BEDELL

S.C.D. - U.H.P. BIBLIOTHÈQUE

Purification, caractérisation et régulation de la glutamine synthétase racinaire chez le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Étude de son activité dans les mycorhizes Douglas/*Laccaria bicolor*.

Soutenue publiquement le Octobre 1996 devant la commission d'examen:

Président	:	Professeur BOTTON B.	Université H. Poincaré-Nancy I
Rapporteur	:	Docteur HIREL B. (Dir. recherches	I.N.R.A) Versailles
Rapporteur	:	Professeur CÀNOVAS F.	Université de Málaga (Espagne)
Examinateur	:	Docteur MARTIN F. (Dir. recherches	I.N.R.A) Nancy
Examinateur	:	Professeur DELL B.	Université de Murdoch (Australie)
Examinateur	:	Professeur DIZENGREMEL P.	Université H. Poincaré-Nancy I

Avant-propos

Avant d'entreprendre l'exposé de ce travail, je tiens avant tout à exprimer ici mes sentiments de reconnaissance:

A Monsieur B. BOTTON, Professeur à l'Université H. Poincaré-Nancy I

pour m'avoir pris dans son équipe de recherche en me donnant ainsi la possibilité de découvrir et, je l'espère, d'acquérir un esprit scientifique. Pour son enthousiasme et ses conseils prodigués tout au long de ces travaux et pour la confiance qu'il m'a témoigné durant ces quelques années, qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur B. HIREL, Directeur de Recherches à l'INRA de Versailles

pour l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur. Ses travaux précurseurs en matière d'enzymologie du métabolisme azoté ont toujours été pour moi d'une aide précieuse dans la réalisation des expérimentations.

A Monsieur F. MARTIN, Directeur de Recherches à l'INRA de Nancy

pour l'intérêt qu'il a toujours manifesté à l'égard de mon travail et pour avoir trouvé le temps nécessaire pour étudier ce mémoire. Merci pour sa disponibilité et son écoute attentive à mes questions et requêtes. Qu'il trouve ici le témoignage de ma plus sincère reconnaissance.

A Monsieur B. DELL, Professeur à l'Université de Murdoch

pour l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté de se joindre à ce Jury, malgré ses multiples occupations. Les discussions et échanges de point de vue que nous avons eu ont toujours été pour moi l'occasion de parfaire mes connaissances de la mycorhize et à un niveau moindre mon anglais...

A Monsieur F. CÁNOVAS, Professeur à l'Université de Malaga

pour l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté de se joindre à ce Jury, et de m'accueillir au sein de son équipe de recherche. Ses travaux, entre autre, sur la GS et la GOGAT du Pin ont été pour moi une source certaine de référence lors de mes recherches.

A Monsieur P. DIZENGREMEL Professeur à l'Université H. Poincaré-Nancy I

pour avoir accepté de participer à ce jury. Je voudrais lui exprimer ma plus profonde gratitude en le remerciant de ces nombreuses questions sur l'évolution de mon travail et de mes enseignements. Merci pour ces petits mots de soutien et d'encouragement.

Qu'il est dur de remercier d'une façon si générale tous ceux sans qui ces années de thèse n'auraient pu se faire ni se conclure par ce manuscrit. J'espère qu'au travers de ces quelques lignes, ils sauront y retrouver tous mes remerciements et mon amitié. Je souhaiterai donc témoigner ma gratitude à tous les membres du laboratoire de génètique et de microbiologie; aux membres du laboratoire de microbiologie de l'INRA; et à l'ensemble du groupe Biologie Forestière, et plus particulièrement aux membres du laboratoire du Prof. Botton ("thésards et permanents"; Michel encore merci pour tout); à ceux qui ont bien voulu prendre sur leur temps afin de me guider dans mes enseignements (merci aux "permanents" de biologie et de génétique); à mes amis de toujours et de demain; à Valérie et à ma famille pour leur soutien. D'une façon générale, merci à ceux avec qui mes rapports furent aussi divers qu'enrichissants.

Abréviations

Chapitre 1 : Analyse bibliographique 1
1. Azote importance et disponibilité pour les plantes 1
1.1. Absorption et assimilation de l'azote atmosphérique 2
1.2. Alimentation azotée minérale 3
1.2.1. Utilisation des nitrates 3
1.2.1.2. Absorption des nitrates 3
1.2.1.3. Assimilation du nitrate 4
1.2.1.3.1. La nitrate réductase (NR) 5
1.2.1.3.2. La nitrite réductase (NiR) 10
1.2.2. Utilisation de l'ammonium 10
1.2.2.1. Absorption de l'ammonium 11
1.2.2.2. Assimilation de l'ammonium 12
1.2.2.2.1. La glutamate déshydrogénase (GDH) 13
1.2.2.2.2. Le cycle GS/GOGAT 17
1.2.2.2.2.1. La glutamine synthétase (GS) 17
1.2.2.2.2.2. La glutamate synthase (GOGAT) 26
1.2.2.3. Redistribution de l'azote incorporé 30
2. Mycorhization importance pour les plantes 32
2.1. Généralités 32
2.2. Importance de la mycorhization dans la nutrition azotée de la 33
2.2.1. Effet de l'azote sur la mycorhization 34
2.2.2. Effet de la mycorhization sur le prélèvement de l'azote 34
2.2.2.1. Azote organique 34
2.2.2.2. Azote minéral 35
2.2.3. Effet de la mycorhization sur l'assimilation de l'azote 36
2.2.3.1. Expression des enzymes dans les ectomycorhizes 36
2.2.3.2. Modèles de l'incorporation et du transport de l'azote dans les ... 38
Objectifs 41
Chapitre 2 : Matériel et méthodes 43
2.1 Matériel végétale 43
2.1.1 Conditions de culture 43
2.1.2. Récolte du matériel végétal 43
2.1.2.1. Expériences sur les graines en germination 43
2.1.2.2. Expériences sur les jeunes plantules 44
2.1.3. Synthèse de mycorhizes axéniques 44
2.2. Techniques analytiques générales 45
2.2.1. Extraction et dosages 45
2.2.1.1. Extraction des protéines solubles 45

2.2.1.2. Détermination des activités enzymatiques de la glutamine synthétase (GS, EC 6.3.1.2.)....46
2.2.1.3. Détermination d'autres activités enzymatiques....47
2.2.1.4. Expression des résultats....48
2.2.1.5. Dosage des protéines....50
2.2.2. Purification de la GS....50
2.2.2.1. Chromatographie sur DEAE-Trisacryl....51
2.2.2.1.1. Principe....51
2.2.2.1.2 Protocole....52
2.2.2.2. Chromatographie d'affinité....52
2.2.2.2.1. Principe....52
2.2.2.2.2 Protocole....52
2.2.2.3. Électrophorèse préparative....52
2.2.3. Techniques électrophorétiques....53
2.2.3.1. Electrophorèse non dénaturante sur gel de polyacrylamide....53
2.2.3.1.1. Principe....53
2.2.3.1.2. Protocole....53
2.2.3.1.3. Révélation des activités enzymatiques....54
2.2.3.1.4. Révélation des protéines....55
2.2.3.2. Electrophorèse en conditions dénaturantes....56
2.2.3.2.1. Principe....56
2.2.3.2.2. Protocole....56
2.2.4. Détermination de la masse moléculaire des protéines natives....57
2.2.4.1. Electrophorèse sur gradipore....57
2.2.4.1.1. Principe....57
2.2.4.1.2. Protocole....57
2.2.4.1.3. Expression des résultats....58
2.2.4.2. Filtration moléculaire sur HILOAD Séphacryl S-300 (FPLC)....58
2.2.4.2.1. Principe....58
2.2.4.2.2. Protocole....58
2.2.4.2.3. Expression des résultats....59
2.2.4.3. Représentation de Ferguson....59
2.2.4.3.1. Principe....59
2.2.4.3.2. Protocole....59
2.2.4.3.3. Expression des résultats....59
2.3.Techniques immunologiques....60
2.3.1. Obtention des immunsérums purifiés....60
2.3.1.1. Synthèse des immunsérums....60
2.3.1.2. Purification des immunsérums....60

2.3.1.2. Isolement de la GS par chromatographie d'immunoabsorption . .61
2.3.2. Identification et contrôle de la spécificité 61
2.3.2.1. Empreintes immunoélectrophorétiques.....61
2.3.2.1.1. Principe.....61
2.3.2.1.2. Protocole.....62
2.3.2.2. Immunoprécipitation quantitative 63
Chapitre 3 : Résultats.....64
3.1. Étude de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme azoté de l'association ectomycorhizienne Douglas/Laccaria laccata.....65
3.2. Purification et propriétés de la glutamine synthétase des racines de Douglas.....75
3.3. La glutamine synthetase au cours des jeunes stades de croissance du Douglas.....84
3.4. Effets de la source d'azote sur la croissance et l'activité de quelques enzymes du métabolisme azoté du Douglas..... 100
Chapitre 4 : Discussion générale et conclusions..... 113
4.1. Discussion générale
4.1.1. Caractérisation de la glutamine synthétase racinaire..... 114
4.1.2. Influence de l'azote et distribution de la glutamine synthétase..... 115
4.1.3. Influence de la mycorhization du Douglas par Laccaria bicolor sur le métabolisme azoté. 116
4.2. Conclusions et perspectives
Perspectives..... 119
Bibliographie..... 120
Annexes 121

Abréviations

AAT	:	aspartate aminotransférase
AlAT	:	alanine aminotransférase
Fd	:	ferrédoxine
GDH	:	glutamate déshydrogénase
GOGAT	:	glutamate oxoglutarate aminotransférase
GS	:	glutamine synthétase
Ig G	:	immunoglobuline de type G
MSX	:	méthionine sulfoximine
NBT	:	nitroblue tétrazolium
NiR	:	nitrite réductase
NR	:	nitrate réductase
PMS	:	phénazine méthosulfate
PVP	:	polyvinylpyrrolidone
PVPP	:	polyvinylpolypyrrolidone
V_m	:	vitesse maximale
α-CG	:	α-cétoglutarate

Chapitre 1: Analyse bibliographique

1. AZOTE IMPORTANCE ET DISPONIBILITÉ POUR LES PLANTES

L'azote entre dans la composition de nombreuses substances essentielles pour la structure et le fonctionnement des organismes vivants, qu'il s'agisse de simples Procaryotes ou des Eucaryotes les plus complexes. En effet, des molécules d'importances vitales telles que : l'ATP, le NAD, les flavoprotéines, les acides nucléiques, les protéines en général et les enzymes en particulier, contiennent toutes de l'azote.

Dans le règne végétal, il est connu qu'après l'eau, l'**azote** constitue le **principal facteur limitant** de la productivité des plantes dans la majeure partie du globe. Pourtant, l'atmosphère terrestre contient 78 % d'azote moléculaire N_2 (Fernandes et Rossiello, 1995) que les plantes sont incapables d'utiliser directement comme source d'azote en raison de sa faible réactivité, ou alors elles peuvent l'utiliser par l'intermédiaire de bactéries (cf chap. nitrogénase). En fait, les plantes s'approvisionnent en azote en utilisant principalement des molécules contenant de l'azote lié soit à des atomes d'hydrogène (comme **l'ammonium**, NH_4^+), soit à des atomes d'oxygène (comme le **nitrate**, NO_3^-). On peut également trouver, sous certaines conditions, des ions nitrite (NO_2^-) dans le sol (Fernandes et Rossiello, 1978; Magalhäes *et al.*, 1987; Allen *et al.*, 1988). Mais les formes d'azote inorganique, nitrate et ammonium, appelées aussi azote minéral, sont les plus abondantes dans le sol (Dale, 1994; Fernandes et Rossiello, 1995).

La figure 1.1 illustre les différents éléments et les relations qui existent dans un tel système plante-sol. Dans les écosystémes forestiers, près de 90% de l'azote réside sous forme organique séquestrée dans la biomasse végétale ou animale, la litière ou le sol (Dale,1994; Martin et Plassard, 1996). Cependant, le végétal n'utilise que l'azote inorganique qui ne représente pas plus de 1% de l'azote du sol (Dale, 1994; Martin et Plassard, 1996). En effet, on retrouve ces mêmes proportions d'azote disponible ou non pour la plante au sein d'écosystèmes différents (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Distribution de l'azote dans un écosystème forestier et de plaine (d'après Dale, 1994)

Composant	Forêt	Prairie
Végétation (morte et vivante)	8 %	6 %
Littière	5 %	2 %
Sol		
Échangeable	1%	0,5 %
Total	95 %	91,5 %

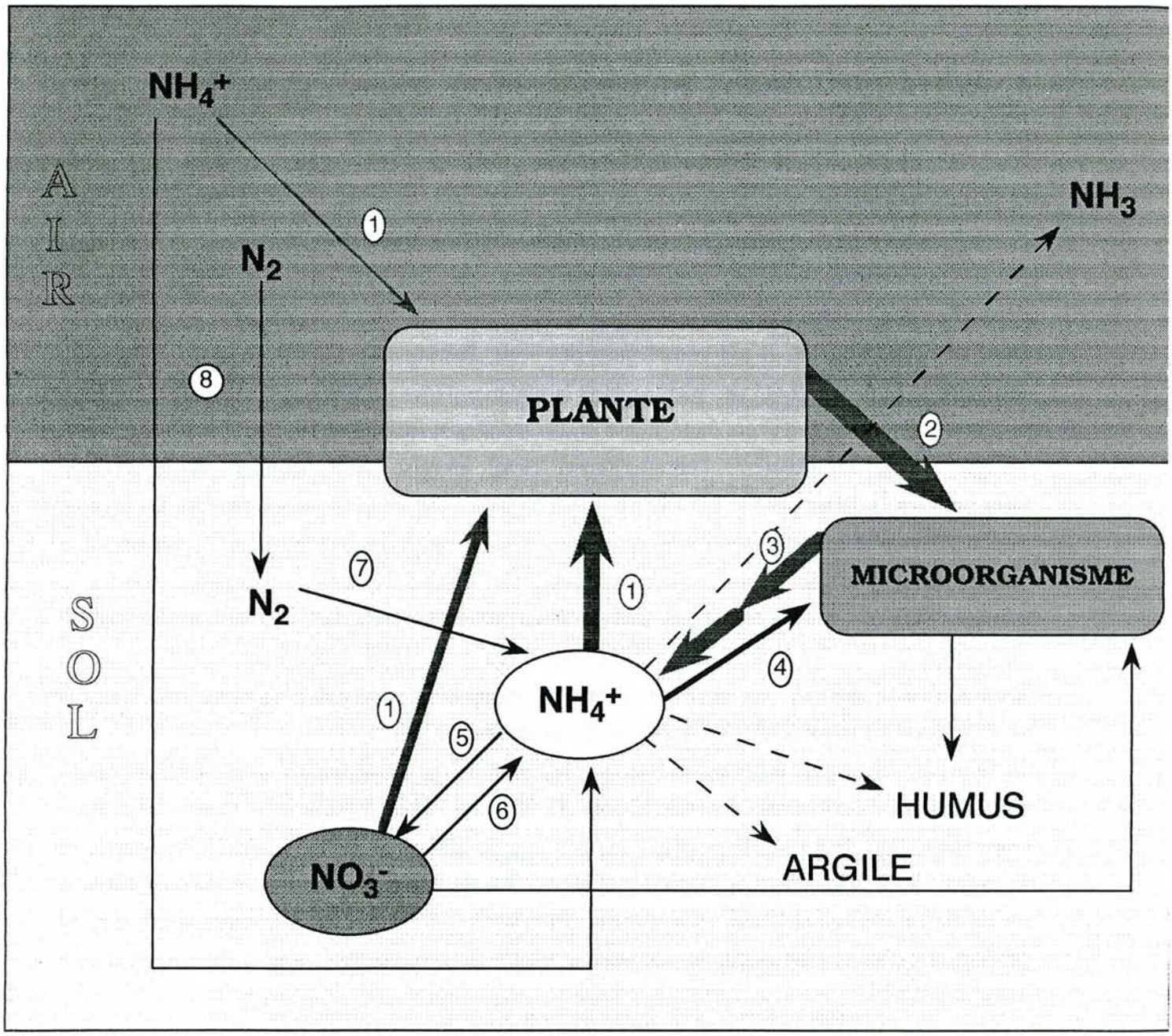


Figure 1.1 : Représentation schématique du cycle de l'azote dans un écosystème forestier.

Les traits pleins représentent des réactions biologiques, dont l'épaisseur schématise l'importance dans le cycle. Les traits en pointillés représentent des réactions non biologiques (volatilisation; adsorption sur les argiles...). Les réactions suivantes sont : (1), absorption par la plante; (2), déposition de matières organiques (chute des feuilles...); (3), libération par les microorganismes de composés organiques puis de composés azotés, (4), absorption par les microorganismes; (5), nitrification; (6) conversion enzymatique; (7), réaction nitrogénase; (8), dépositions.

Dans ces écosystèmes, l'azote échangeable ou en solution dans le sol, qui est en fait constitué d'ammonium et de nitrate directement utilisable par les végétaux et les microorganismes, ne représente qu'une faible partie de l'azote total du sol. C'est pourquoi des déficiences en azote dans des écosystèmes naturels ne sont pas rares puisque seulement 1% ,ou moins de 1%, de l'azote total du sol est disponible à tout moment pour les végétaux.

Les relations et interactions qui relient les différents éléments d'un tel système sont nombreuses et complexes, notamment en ce qui concerne la formation et le devenir de ces ions dans le sol (pour plus de détail voir Dale 1994). Cependant **l'élément stratégique** le plus important de ce cycle est **la plante**. Dans un écosystème naturel, c'est elle qui va absorber les éléments minéraux du sol, qui va distribuer une partie de cet azote aux microorganismes et qui va surtout recycler dans le sol tout l'azote prélevé.

Parmi ces formes d'azote combiné, le nitrate est considéré comme l'aliment azoté de choix pour la plante, et il représente la principale source azotée du sol pour la plupart des végétaux supérieurs (Warner et Kleinhofs, 1992; Fernandes et Rossiello, 1995). Mais certaines plantes s'alimentent préférentiellement en ion ammonium car elles sont adaptées à des sols acides pauvres en nitrate, c'est le cas des Résineux dans les écosystèmes forestiers (Hart et Firestone, 1989; Davidson *et al.*, 1992). Certaines plantes peuvent disposer également, en plus de l'azote combiné du sol, de l'**azote moléculaire** N_2 de l'atmosphère grâce aux microorganismes fixateurs d'azote qui leur sont associés: les bactéries du genre *Rhizobium* pour les Légumineuses, et les Actinomycètes du genre *Frankia* pour les plantes à actinorhizes.

1.1. Absorption et assimilation de l'azote atmosphérique

L'azote atmosphérique fixé représente entre 79 et 103 kg d'azote N_2 fixé annuellement par hectare (App *et al.*, 1984). Seuls certains organismes procaryotes sont capables d'utiliser cet azote moléculaire N_2, en le réduisant en NH_3 par un système enzymatique complexe, **la nitrogénase**, qui catalyse la réaction suivante :

$$N_2 + 8\,H^+ + 8\,e^- \longrightarrow 2\,NH_3 + H_2$$

Ce système enzymatique est réservé aux procaryotes fixateurs d'azote ou diazotrophes représentés par des bactéries, des cyanobactéries et des actinomycètes parmi lesquels on trouve des symbiotes de plantes supérieures : Rhizobium dans les nodosités de légumineuses (*Pisum*, *Phaseolus*, *Lotus*...), Frankia dans les actinomycorhizes portées par un certain nombre de plantes nonlégumineuses (*Alnus*, *Casuarina*...). C'est une des voies possibles de production d'ammonium chez ces espèces végétales.

Constitution

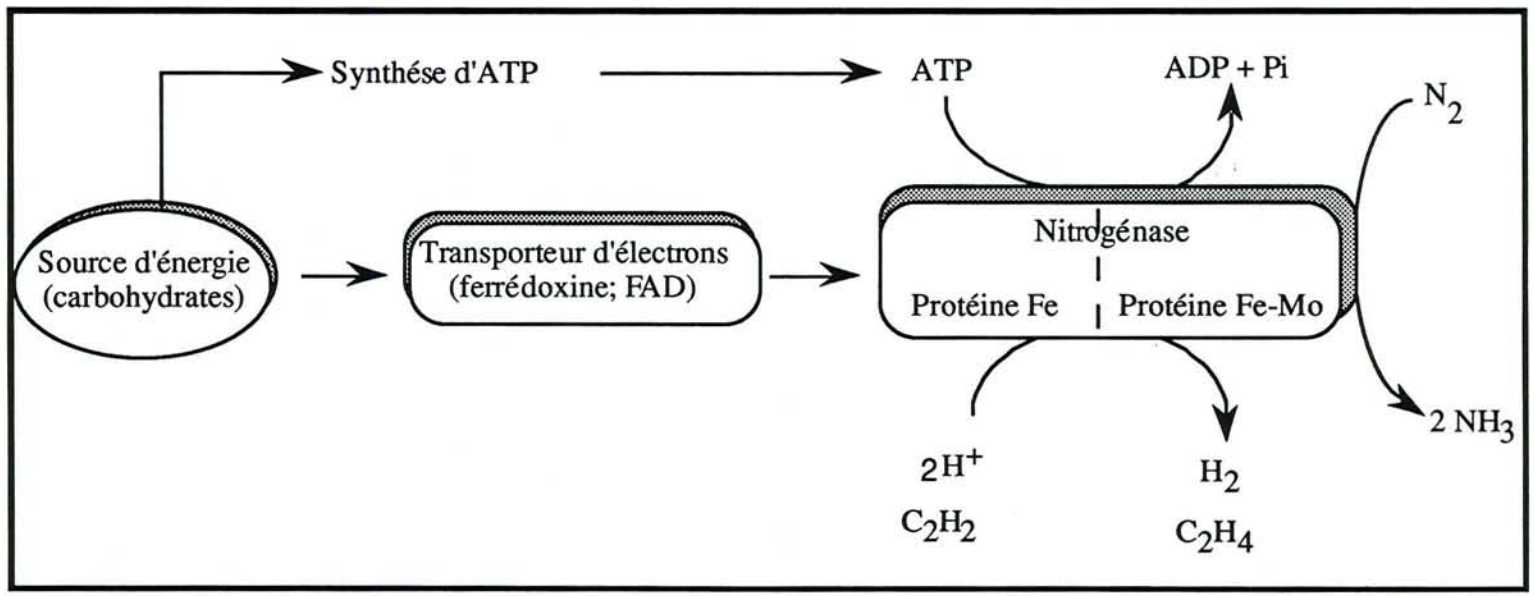


Figure 1.2 : Représentation schématique de la réaction enzymatique de la nitrogénase.

La nitrogénase est caractéristique des organismes diazotrophes, elle est constituée de deux protéines, une protéine à molybdène et fer d'un poids moléculaire d'environ 220 kDa appelée dinitrogénase et une protéine à fer d'un poids moléculaire d'environ 68 kDa appelée dinitrogénase réductase (Bothe *et al.*, 1983). Aucune des deux protéines ne présente d'activité enzymatique en absence de l'autre.

Mécanismes

La réduction de l'azote moléculaire catalysée par la nitrogénase est schématisée par la figure 1.2.
Cette réduction nécessite environ 15 molécules d'ATP/N_2 fixé, comme pouvoir énergétique; du NADH, NADPH ou pyruvate comme pouvoir réducteur, et un transporteur d'électrons (ferrédoxine ou flavodoxine).
La nitrogénase peut, en plus de la réduction de ce N_2, présenter une activité hydrogénase (représentée aussi sur le schéma) en catalysant la réduction des protons en hydrogène moléculaire. Cette activité consomme également de l'énergie et peut ainsi représenter une perte d'ATP au détriment de la fixation de l'azote. De plus, cette enzyme est aussi capable de réduire plusieurs molécules comprenant une triple liaison. Ainsi, la réduction de l'acétylène (C_2H_2) en éthylène (C_2H_4) est à la base de la méthode de mesure de l'activité nitrogénase.

1.2. Alimentation azotée minérale

Les deux principales formes d'azote minéral présentes dans le sol sont les ions nitrates (NO_3^-) et les ions ammonium (NH_4^+).

1.2.1. Utilisation des nitrates

Le nitrate est la forme d'azote la plus abondante et disponible pour la plante. Sa réduction et son assimilation ont surtout lieu dans les racines (Lee, 1980; Oaks et Hirel, 1985; Campbell et Smarrelli, 1986; Crawford *et al.*, 1992; Oaks, 1994). Cependant, les facteurs de développement (stade de croissance; apparition des feuilles...) et d'environnement (lumière, source d'azote...) peuvent altérer rapidement l'allocation primaire du nitrate ou de ses produits d'assimilation (Staswick, 1989). Les facteurs contrôlant le prélèvement, la translocation et la répartition du nitrate et de ses produits d'assimilation ont été étudiés (Clarkson, 1985; Sivasankar et Oaks, 1995), mais le principe fondamental de régulation est encore mal compris.

1.2.1.2. Absorption des nitrates

La plupart des plantes sont capables d'absorber le nitrate du milieu extérieur. Le prélèvement de cet azote minéral est un **processus actif** qui nécessite le passage à travers plusieurs membranes, mais peu de données sont connues quant aux mécanismes ou aux protéines impliquées. Récemment trois systèmes de transport ont été mis en évidence (Siddiqi *et al.*, 1990;

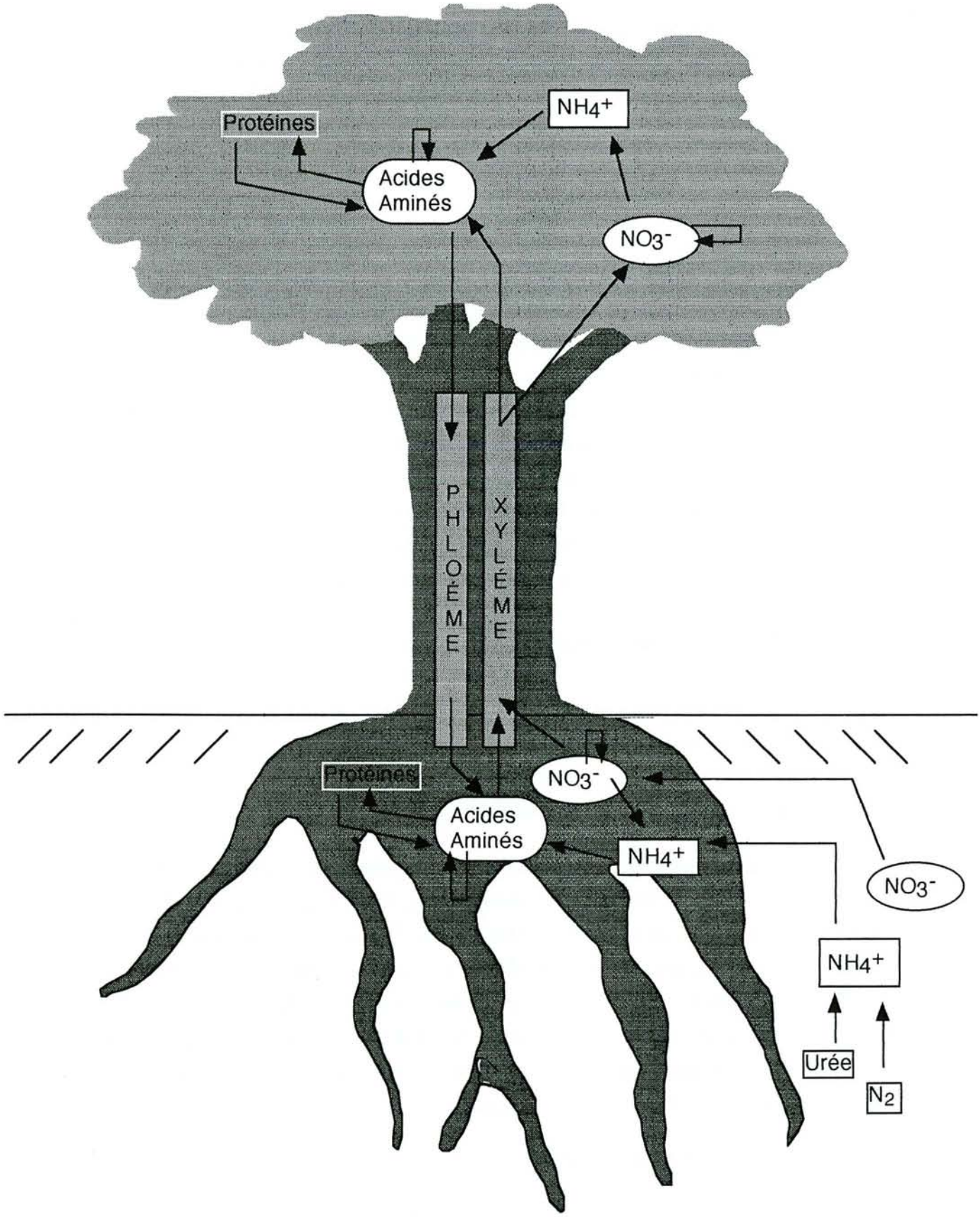


Figure 1.3 : Translocation du nitrate et de l'ammonium entre les parties racinaires et les parties aériennes d'un arbre.

Aslam *et al.*, 1992; Sechley *et al.*, 1992; King *et al.*, 1993). Ces transporteurs sont différents selon la concentration, élevée ou non, en nitrate dans le sol. Il existe donc des systèmes de transport inductibles par l'ion nitrate (Larsson et Ingermarsson, 1989; Clarkson et Lüttge, 1991; Tsay *et al.*, 1993), mais d'autres auteurs ont mis en évidence des systèmes d'absorption indépendants du nitrate et donc constitutifs (Klobus *et al.*, 1988; Siddiqi *et al.*, 1990; Glass *et al.*, 1992). Par exemple chez des racines d'Orge, lorsqu'il n'y a pas de nitrate présent, le prélèvement de cet ion est insignifiant, mais lorsque l'on ajoute du nitrate dans le milieu extérieur, l'absorption est rapidement induite; la racine a donc conservé la capacité à répondre à la présence de nitrate (Öhlen *et al.*, 1995).

Ainsi, des mesures réalisées sur cet Orge ont permis d'estimer la vitesse maximale d'absorption du nitrate à 6 µmol/h/g MF (King *et al.*, 1993). Toujours chez l'Orge, Öhlén *et al.* (1995) ont également mesuré une vitesse de 5,3 µmol/h/g MF avec une concentration externe en NO_3^- de 0,82 µM montrant également l'existence d'au moins deux systèmes de transport du nitrate chez l'Orge. Ce nitrate absorbé se **concentre** souvent dans **les tissus racinaires** (Margolis et Vézina, 1988; Raab et Terry, 1995) ou dans **la sève du xylème** (Pate *et al.*, 1980; Martin *et al.*, 1981). Chez des plantules de Ricin, le nitrate est absorbé à une vitesse de 2 µmol/h/g MF, 37% de ce nitrate se retrouvant dans la sève du xylème et 63% étant stocké dans le système racinaire (Schobert et Komor, 1990). Chez l'Épicéa, Kronzucker *et al.* (1995) ont mesuré des vitesses de flux compris de 0,09 et 1,2 µmol/h/g pour des concentrations externes comprises respectivement entre 10µM et 1,5 mM de nitrate. Enfin, chez le Douglas, une vitesse maximale de 5 µmol/h/g a été déterminée par Kamminga-Van Wijk et Prins (1993).

La figure 1.3 schématise la translocation du nitrate et des produits de son assimilation entre parties racinaires et parties aériennes d'une plante ligneuse grâce aux sèves du xylème et du phloème. Ainsi le nitrate absorbé dans les racines sera soit réduit sur place en ammonium qui donnera des acides aminés, soit directement transporté jusqu'aux parties aériennes par l'intermédiaire de la séve xylémique. Le nitrate ainsi amené pourra alors être réduit en ammonium qui donnera à son tour des acides aminés dans les parties foliaires de l'arbre. Dans des racines de Maïs, Lazof *et al.* (1992) ainsi que Oaks et Long (1992) ont localisé l'absorption du nitrate principalement dans les racines latérales et peu dans l'apex de la racine principale, l'absorption de NO_3^- se faisant très lentement à ce niveau. Ce résultat est en accord avec les mesures réalisées grâce à des microélectrodes sur des racines d'Orge (Henriksen *et al.*, 1992). Le nitrate absorbé sera soit stocké dans les vacuoles des racines et/ou des feuilles (Martinoia *et al.*, 1981; Gransted et Huffaker, 1982), soit assimilé dans les deux ou l'un de ces deux organes. La redistribution de cet azote absorbé se fait de façon très rapide (Lazof *et al.*, 1992).

1.2.1.3. Assimilation du nitrate

La réduction du nitrate en ammonium a été très étudiée chez les plantes supérieures et est réalisée par deux enzymes, **la nitrate réductase et la nitrite réductase.**

1.2.1.3.1. La nitrate réductase (NR)

La NR catalyse la réduction du nitrate en nitrite. Cette réaction nécessite deux électrons qui peuvent être apportés soit par le NADPH ou le NADH chez les Eucaryotes.
La nitrate réductase à NADH (EC 1.6.6.1) est présente chez la plupart des plantes supérieures (Kuo *et al.*, 1982; Campbell et Remmler, 1986; Moureaux *et al.*, 1989) et chez quelques algues (Howard et Solomonson, 1982, 1981). Des études récentes ont été réalisées sur des Conifères, la NR a été ainsi mesurée chez l'Épicéa et chez le Pin sylvestre (Sarjala et al, 1987; Schmidt *et al.*, 1991). Une nitrate réductase bispécifique à NAD(P)H (EC 1.6.6.2) a été identifiée chez un nombre limité de plantes. Enfin il existe une NR à NADPH (EC 1.6.6.3) trouvée chez des espèces fongiques (Horner, 1983; Cooley et Tomsett, 1985) mais pas chez les végétaux supérieurs (Guerrero *et al.*, 1981). Chez le Soja, Streit *et al.* (1987) ont montré l'existence de **trois nitrates réductases** : une NR à NADH inductible, et deux NR constitutives, une à NAD(P)H et l'autre à NADH. Étant toxiques pour la cellule végétale, les ions nitrite ne s'y accumulent pas, ils vont être rapidement réduit en ammonium.

Constitution

La NR à NADH a été étudiée de façon intensive chez *Chlorella vulgaris* (Solomonson *et al.*, 1975; Giris et Ramadoss, 1979; Gewitz *et al.*, 1981; Solomonson et McCreery, 1986), chez l'Épinard (Fido et Notton, 1984; Nakagawa *et al.*, 1985), mais aussi chez le Soja (Streit *et al.*, 1985; 1987), l'Orge (Kuo *et al.*, 1982) et chez le Maïs (Redinbaugh et Campbell, 1981; Campbell et Remmler, 1986). De ces différents travaux il en ressort que la NR à NADH est un homodimère (l'Orge) ou un homotétramère (*Chlorella vulgaris*) avec des sous-unités de masse moléculaire d'environ 100 kDa (Kleinhofs et Warner, 1990). La NR à NADPH a été purifiée et caractérisée chez des champignons comme *Neurospora crassa* (Horner, 1983; Pan et Nason, 1978) et *Aspergillus nidulans* (Miganawa et Yoshimoto, 1982; Steiner et Downey, 1982; Cooley et Tomsett, 1985). Cependant une NR bispécifique à NAD(P)H a été mise en évidence chez de nombreuses espèces végétales dont le Riz (Shen *et al.*, 1976), le Maïs (Redinbaugh et Campbell, 1981), l'Orge (Dailey *et al.*, 1982; Harker *et al.*, 1986) et le Soja (Streit *et al.*, 1987). Les propriétés physico-chimiques de la nitrate réductase à NAD(P)H sont moins bien connues car cette isoforme s'avère très instable et donc sa purification présente plus de difficultés. Cependant chez l'Orge la NR à NAD(P)H possède des sous-unités de masse moléculaire d'environ 100 kDa, légèrement plus faibles que celles trouvées pour la NR à NADH (Harker *et al.*, 1986). Chez les végétaux supérieurs, comme chez tous les Eucaryotes, les NRs étudiées possèdent toutes un groupement prosthétique constitué de flavine adenine dinucléotide (FAD), du cytochrome b557 et de molybdène (Giri et Ramadoss, 1979; Gewitz *et al.*, 1981; Solomonson et McCreery, 1986).

Mécanismes

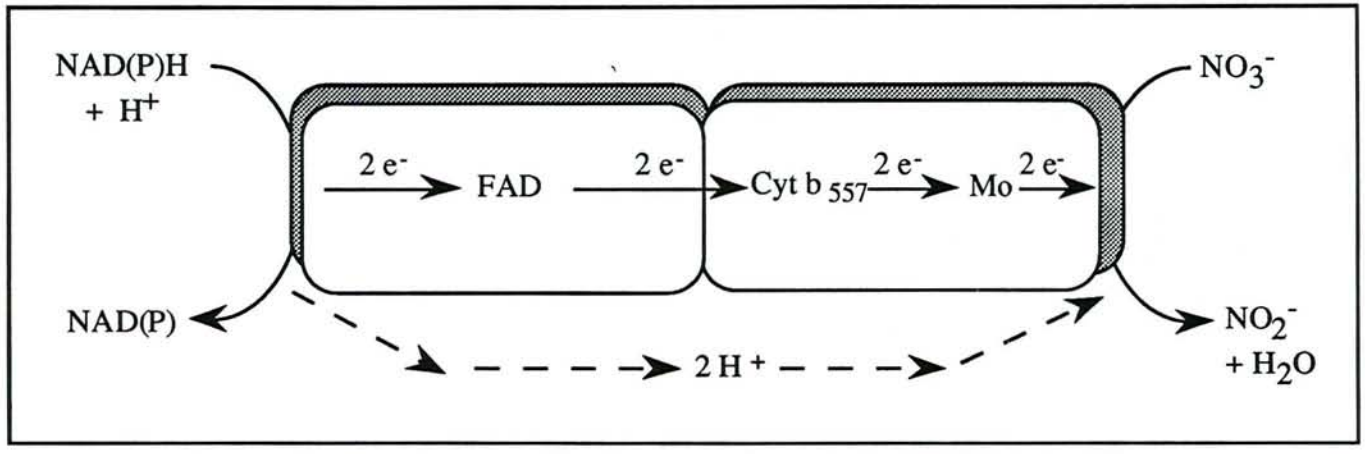


Figure 1.4 : Représentation schématique du mécanisme de la réduction des nitrates par la nitrate réductase.

La NR des plantes utilise le pouvoir réducteur sous forme de NADH + H^+ ou de NADPH + H^+. Le transfert d'électrons au cours de la réduction du nitrate par la nitrate réductase est réalisé par le groupement prosthétique et est schématisé dans la figure 1.4.

Chez la plupart des plantes supérieures, la nitrate réductase est considérée comme une enzyme soluble **localisée dans le cytoplasme** (Beevers et Hageman, 1980). Ainsi, des études de séparation ont permis de localiser l'enzyme dans le cytoplasme de feuilles (Dalling *et al.*, 1972a; Wallsgrove *et al.*, 1979), de racines (Dalling *et al.*, 1972b; Suzuki *et al.*, 1981). Cependant, des méthodes d'immunolocalisation ont mis en évidence la NR dans les chloroplastes d'Épinard (Kamachi *et al.*, 1987). Alors que chez le Maïs, Vaughn et Campbell (1988) ont immunolocalisé une NR cytoplasmique mais n'ont rien détecté dans les chloroplastes. Une nitrate réductase particulière, associée à la membrane plasmique, a été révélée dans les racines d'Orge (Ward *et al.*, 1989). Aucune relation entre la NR associée à la membrane plasmique et les NRs solubles n'a été établie. Cependant, beaucoup d'espèces végétales ont plus d'une isoforme de la nitrate réductase et lors de ces études immunologiques, peu de contrôles appropriés en condition de culture minimale en nitrate ont été réalisés. De telles conditions, réalisées chez le Maïs (Long et Oaks, 1990), ont permis de confirmer par immunolocalisation que la NR se trouvait dans le cytosol des cellules du mésophylle des feuilles (Fedorova *et al.*, 1994; Oaks, 1994).

Répartition feuilles-racines

En fait, on peut répartir les végétaux en trois groupes suivant le lieu de réduction des nitrates :

- réduction du nitrate préférentiellement dans les racines, l'azote est alors transporté vers les feuilles notamment sous forme d'acides aminés.
- réduction du nitrate à la fois dans les racines et dans les feuilles. La quantité de nitrate qui arrive aux feuilles par la sève du xylème dépend de la capacité de réduction des racines et de la concentration en nitrate du milieu environnant.
- réduction du nitrate préférentiellement dans les feuilles (activité nitrate réductase racinaire très faible voir non détectable).

Une telle répartition des activités NR a été illustrée dans le tableau 1.2.

Dans les **feuilles**, la NR trouvée est l'isoforme à **NADH-dépendante**, alors que dans les **racines**, la principale isoforme trouvée est **NADPH-dépendante** (Redinbaugh et Campbell, 1981; Warner *et al.*, 1987; Long et Oaks, 1990). Sanderson et Cocking (1964) avaient déjà montré chez la Tomate des différences de Km pour le NADH et le NO_3^- selon qu'il s'agisse de l'isoforme foliaire ou racinaire.

Tableau 1.2 : Répartition de l'activité NR chez quelques espèces végétales.

Localisation	Espèces végétales	Références
Préférentiellement dans les racines	*Lupinus angustifolius*	Harper et Gibson (1984)
	Pinus nigra	Martin *et al.* (1981)
	Erica tetralix	Troelstra *et al.* (1995)
À la fois dans les racines et dans les feuilles	*Alnus glutinosa*	Pizelle *et al.* (1989)
	Robinia pseudoacacia	Vogel et Dawson (1991)
	Hordeum vulgare	Johnsen *et al.* (1991)
	Zea mays	Warner *et al.* (1987)
	Deschampsia flexuosa	Sivasankar et Oaks (1995)
	Picea abies	Troelstra *et al.* (1995)
		Schmidt *et al.* (1991)
Préférentiellement dans les feuilles	Coton	Radin (1978)
	Xanthium	Pate (1973)

Inductible ou constitutive

La NR est généralement considérée comme **inductible par son substrat** (Beevers et Hageman, 1969; Oaks *et al.*, 1980; Somers *et al.*, 1983; Hoff *et al.*, 1992; Sechley *et al.*, 1992; Oaks, 1994). Ceci implique une augmentation de l'activité NR, de la protéine et de ses ARNm en présence de nitrate. L'effet du nitrate semble se situer au niveau transcriptionnel. La cinétique de l'induction par le nitrate de l'activité et de la protéine comprend une phase de latence suivie d'une phase exponentielle d'augmentation et l'établissement d'un niveau maximal. L'augmentation de la NR est due à une synthèse *de novo* de la protéine (Somers *et al.*, 1983; Remmler et Campbell, 1986; Galangau *et al.*, 1988). Ainsi l'apparition de la protéine précède de peu l'apparition de l'activité nitrate réductase (Somers *et al.*, 1983; Remmler et Campbell, 1986; Deng *et al.*, 1990). Ce temps de latence représente le temps nécessaire à la synthèse d'un polypeptide complet et à l'assemblage de l'enzyme native issue des polypeptides et des cofacteurs.

L'induction par le nitrate de l'accumulation d'ARNm de la NR a été démontrée chez de nombreux végétaux (Cheng *et al.*, 1986; Crawford *et al.*, 1986; Galangau *et al.*, 1988; Bowsher *et al.*, 1991; Callaci et Smarelli, 1991; Hoff *et al.*, 1992). Toutes ces études montrent qu'il n'y a pas ou très peu d'ARNm de la NR détectable dans les racines ou les feuilles avant l'ajout de nitrate. Après cet ajout, un temps de latence est observé, variable en durée suivant les espèces végétales ou les tissus étudiés, suivi d'un accroissement rapide du taux d'ARNm jusqu'à un maximum et puis une chute jusqu'à un taux fixe. L'induction des ARNm de la nitrate réductase étant plus rapide que celle de la protéine et de son activité, la chute des ARNm intervient alors que l'activité NR augmente. Les analyses d'ARN (Melzer *et al.*, 1989) et des études de transcription (Callaci et Smarrelli, 1991) réalisées sur des noyaux isolés chez l'Orge et le Soja respectivement, indique que l'induction des ARNm de la NR par le nitrate est due à une synthèse *de novo* des transcripts et non pas à une

activation de pré-ARNm ou une réduction des ARNm dégradés. La baisse du taux des ARNm de la NR après le pic d'accumulation suite à l'induction par du nitrate doit résulter d'une diminution de la production des ARNm et/ou une augmentation du "turnover" des ARNm de la NR.

Chez les Conifères, l'induction de la NR a été le plus souvent rapportée pour des jeunes plants ou des greffons (Bigg et Daniel, 1978; Wingsle *et al.*, 1987; Tischner *et al.*, 1988; Scheromm *et al.*, 1990). Cependant la fertilisation d'Épicéa par l'ajout de 10 mM NO_3^- double la concentration en cet ion dans la sève du xylème de l'arbre sans augmenter son activité NR (Schmidt *et al.*, 1991). D'autres auteurs ont émis le postulat de l'**existence d'une NR constitutive** dans de nombreux tissus d'assimilation (Timpo et Neyra, 1983; Remmler et Campbell, 1986; Streit et Harper, 1986; Rajasekhar et Oelmüller, 1987; Pizelle et Thiery, 1994). En fait, la question reste posée mais il semblerait que la réduction du nitrate chez les Conifères a lieu surtout dans les racines courtes (y compris les mycorhizes) et que la contribution des feuilles est négligeable (Bollard, 1957; Barnes, 1962; Pate, 1980; Smirnofff et Stewart, 1985; Schmidt *et al.*, 1991).

Autres régulations

Les acides aminés

Le potentiel d'induction de la NR est faible dans les tissus méristématiques (Oaks et Long, 1992), dans des embryons imbibés (Oaks, 1983; Watt et Cresswell, 1987; Gupta *et al.*, 1988) et chez des jeunes feuilles (Srivastava *et al.*, 1976; Kenis *et al.*, 1992). Des mesures d'assimilation d'azote marqué ^{15}N-NO_3^- (Samukawa et Yamaguchi, 1979; Lazof *et al.*, 1992) permettent d'expliquer cette faible induction par l'**effet répresseur d'acides aminés** sur le développement de la protéine NR (Filner, 1966; Heimer et Filner, 1970; Oaks, 1992; Oaks, 1994). Ainsi, des travaux ont montré que la **glutamine**, qui peut servir de source d'azote, a un effet inhibiteur sur l'activité NR (Curtis et Smarrelli, 1987; Shiraishi *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Sivasankar et Oaks, 1995). La transcription du gène de la NR est aussi réprimée par la glutamine (Callaci et Smarrelli, 1991; Deng *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993; Vincentz *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995).

La lumière

L'**effet de la lumière** est très important sur l'**apparition de la protéine NR**, de son activité et de l'accumulation d'ARNm. Cependant, cet effet sur l'expression de la nitrate réductase nécessite la présence de nitrate (Rajasekhar *et al.*, 1988). Ainsi, en présence de faible quantité de nitrate, l'activité de la NR et l'accumulation d'ARNm a été induite à la fois chez des plantes vertes et étiolées (Somers et al;, 1983; Rajasekhar *et al.*, 1988; Gowri et Campbell, 1989). Des variations diurnes de l'expression de la NR ont aussi été mises en évidence chez les racines et les feuilles de Tabac, de Tomate, d'*Arabidopsis* et de Maïs développés en présence de nitrate et en régime lumière/obscurité (Galangau *et al.*, 1988; Deng *et al.*, 1990; Bowsher *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1991).

La phosphorylation

La déphosphorylation qui se traduit par une activation de la NR des feuilles d'Épinard est inhibée *in vivo* par des ions Mg^{2+} et d'autres cations divalents, mais elle est **stimulée** par la présence d'**AMP** (Kaiser *et al.*, 1993; Kaiser et Huber, 1994a). La NR est donc régulée au niveau post-transcriptionnel par **phosphorylation** (inactivation) et **déphosphorylation** (activation) (Kaiser et Huber, 1994b). Cette régulation permet donc un ajustement rapide du taux de réduction du nitate en réponse aux fluctuations des carbohydrates disponibles (Kaiser *et al.*, 1993; Kaiser et Hurel, 1994a, 1994b).

Aspect génomique

Le gène codant pour la nitrate réductase a été cloné chez le Maïs (Gowri et Campbell, 1989), le Bouleau (Friemann *et al.*, 1991) ainsi que chez de nombreuses autres espèces végétales (Tableau 1.3). La comparaison des séquences en acides aminés entre les différentes espèces a montré une **grande homologie** entre les différentes NRs (Kleinhofs et Warner, 1990; Hoff *et al.*, 1992).

Tableau 1.3 : Espèces végétales dont des clones de la nitrate réductase ont été caractérisés (d'après Hoff *et al.* 1992)

Espèces	Clone	Acides aminés	Références
Tabac	ADNc	554	Calza *et al.* (1987)
	Génome	904	Vaucheret *et al.* (1989)
Orge	ADNc	912	Schnorr *et al.* (1991)
	Génome	915	Schnorr *et al.* (1991)
Courge	ADNc	918	Crawford *et al.* (1986)
Épinard	ADNc	926	Prosser et Lazarus (1990)
Riz	Génome	916	Choi *et al.* (1989)

Ainsi l'homologie de séquence entre l'Orge et le Riz est de 83%. Mais il est plus surprenant de voir une bonne conservation de la séquence en acides aminés (de 37 à 39% d'homologie) entre la NR à NADH de plantes supérieures et la NR à NADPH d'*Aspergillus nidulans* (Johnstone *et al.*, 1990).

Chez les plantes supérieures, le premier **mutant déficient en nitrate réductase** a été obtenu chez *Arabidopsis thaliana* (Oostindier-Braaksma et Feenstra, 1973). Depuis, de nombreux mutants ont été obtenus chez les végétaux permettant ainsi une analyse génétique poussée de l'assimilation du nitrate. Par exemple, chez l'Orge, il existe toute une gamme de mutants permettant la dissection moléculaire de la régulation de la NR et de l'assimilation de NO_3^- (Dailey *et al.*, 1982; Warner *et al.*, 1987; Melzer *et al.*, 1989). Une autre espèce végétale où les mutants ont permis une analyse tout aussi poussée est le Tabac (Saux *et al.*, 1987; Vincentz *et al.*, 1993). Certains mutants peuvent exprimer une protéine NR inactive (Pouteau *et al.*, 1989) ou n'exprimer

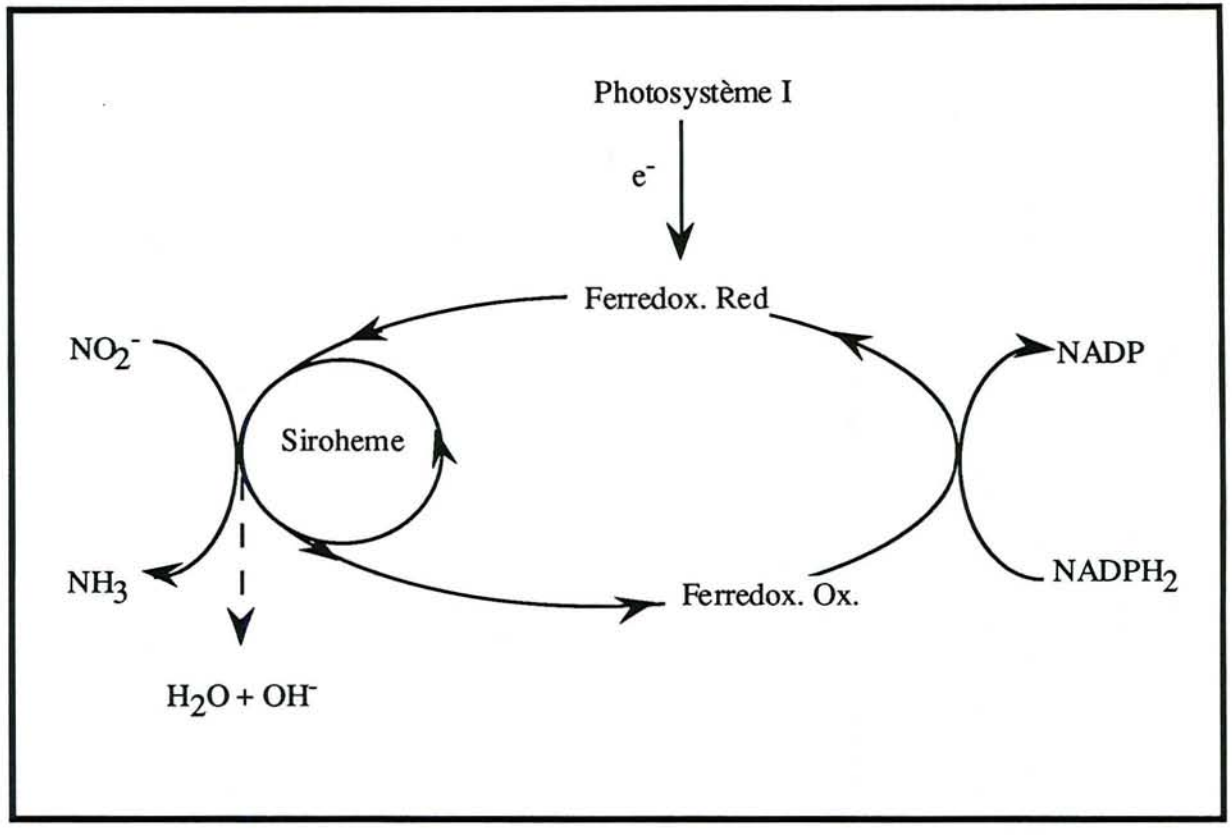


Figure 1.5 : Représentation schématique du mécanisme de la réduction des nitrites par la nitrite réductase.

qu'une partie d'un gène (Vaucheret *et al.*, 1990; Vincentz et Caboche, 1991). Des mutants d'*Arabidopsis* présentent également la possibilité d'introduire des gènes étrangers, ce qui ouvre de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes du métabolisme azoté (Cheng *et al.*, 1992; Crawford *et al.*, 1992).

1.2.1.3.2. La nitrite réductase (NiR)

La NiR intervient après la NR. Elle va réduire les ions nitrite, issus de l'activité NR, en ammonium en présence de **ferrédoxine réduit** (voir la réaction schématisée figure 1.5).
La nitrite réductase a été étudiée et purifiée chez de nombreuses plantes (Lancaster *et al.*, 1979; Beevers et Hageman, 1980; Small et Gray, 1984; Ip *et al.*, 1987). On trouve la NiR dans des plastes à la fois chez les feuilles et les racines (Dalling *et al.*, 1972a; 1972b; Beevers et Hageman, 1983). Cette enzyme présente un poids moléculaire faible de 60 à 64 kDa contenant un groupe prosthétique sirohème et un centre fer-soufre (4Fe-4S) en son site actif (Kleinhofs et Warner, 1990).

Mécanismes

Dans les feuilles et les racines, le donneur d'électron réduit la ferrédoxine, source de pouvoir réducteur (Oaks et Hirel, 1985; Bowsher *et al.*, 1992). La figure 1.5 représente la réduction de l'ion nitrite en ammonium. Dans les parties chlorophylliennes, à la lumière, ce sont des électrons issus du photosystème I qui vont réduire la ferrédoxine et à l'obscurité cela se fera par l'intermédiaire de la respiration (voie des pentoses phosphates).
La NiR est induite par la lumière et le nitrate de façon similaire à la nitrate réductase (Back *et al.*, 1988, 1991; Rastogi *et al.*, 1993) .

Aspect génomique

Des clones d'ADNc de la NiR ont été isolés et analysés chez l'Épinard (Back *et al.*, 1988) et le Maïs (Lahners *et al.*, 1988). La séquence nucléotidique des ADNc de ces deux espèces végétales présente **66% d'homologie entre elles** et la séquence déduite en acides aminés montre 75% ou 86% de similitude. Des analyses en southern blot réalisées sur le génome du Maïs ont montré l'existence de deux gènes par génome haploïde (Lahners *et al.*, 1988). Ceci est en accord avec les deux isoformes trouvées chez cette espèce végétale par Dalling *et al.* (1972a). L'obtention de plantes mutantes déficientes en nitrite réductase n'a pas encore été rendue possible. Etant donnée la toxicité des ions nitrite pour les cellules, il est plus que probable que de tels mutants seront non viables.

1.2.2. Utilisation de l'ammonium

L'ammonium peut être :

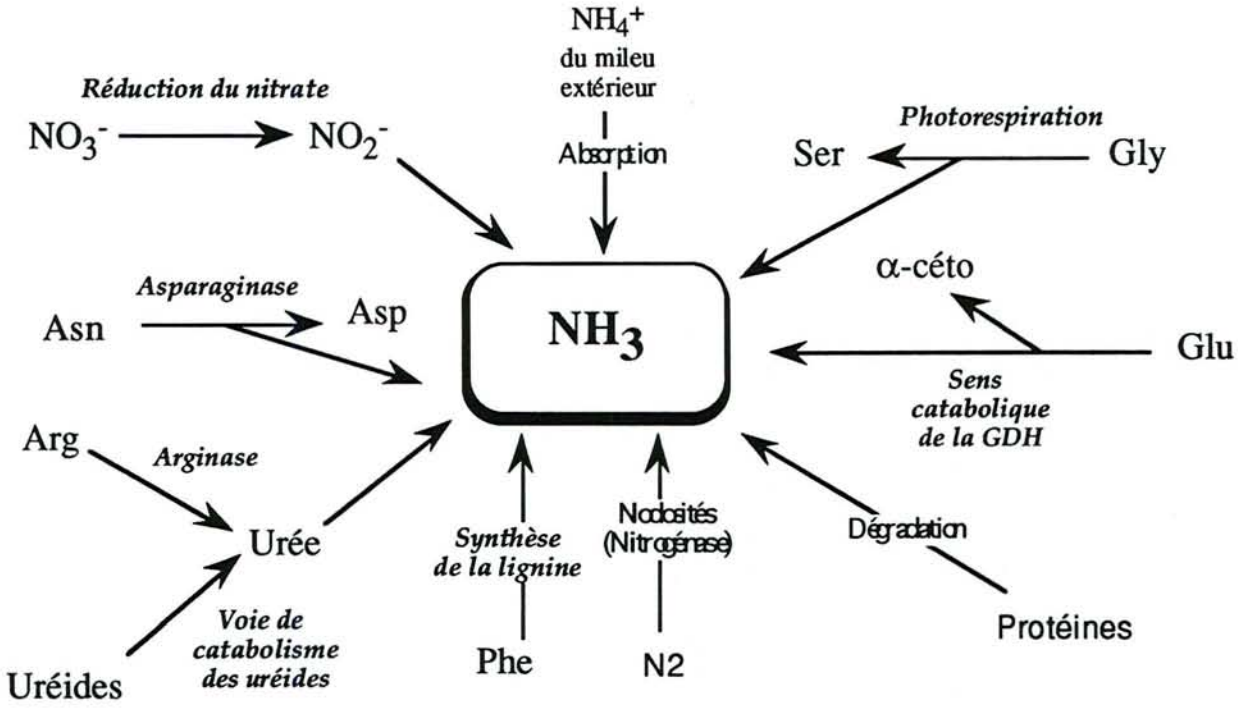


Figure 1.6 : Représentation schématique de la provenance possible de l'ion ammonium chez un végétal.

- soit directement absorbé par les racines
- soit issu de **nombreuses réactions métaboliques** (Figure 1.6).

En effet, l'ammonium présent dans la plante peut provenir i) de l'absorption du NH_4^+ exogène, ii) de la photorespiration, iii) du fonctionnement catabolique possible de la GDH, iv) de l'assimilation de N_2, et v) de la dégradation des protéines. Une autre des principales voies formant de l'ammonium est la réduction du nitrate dont nous avons exposer les mécanismes d'absorption et de réduction.

1.2.2.1. Absorption de l'ammonium

Les plantes peuvent utiliser aussi bien le nitrate que l'ammonium pour croître. Cependant, on peut distinguer des plantes dites, calcifuges, adaptées aux sols acides, qui utilisent de préférence l'ammonium (Ismunadji et Dijkshoorn, 1971; Berg, 1986), et les plantes calcicoles, adaptées aux sols calcaires, qui utilisent préférentiellement le nitrate (Kirkby, 1967). Mais quelque soit l'espèce végétale, le prélèvement de l'ammonium par la plante est plus important que celui du nitrate à faible température (Clarkson et Warner, 1979). Cependant des paramètres d'environnement interviennent dans cette préférence azotée. Ainsi, si Krajina *et al.* (1973) montrent que *Pseudotsuga menziessi* et *Thuya plicata* ont une préférence marquée pour le nitrate, et dans les conditions naturelles, ces deux espèces se développent mieux sur des sols où la nitrification est active (Krajina *et al.*, 1973).

L'absorption de l'ammonium est la résultante de deux phénomènes :

- un **phénomène passif** dû à la diffusion de la forme neutre (NH_3) à travers la membrane plasmique
- un **mécanisme de transfert** de la forme chargée (NH_4^+) dû à une **différence de potentiel électrique transmembranaire** (Raven et Smith, 1976; Kleiner, 1981).

La figure 1.7 représente les mécanismes possibles de l'assimilation de l'ammonium dans les racines. Le système de transport mis en jeu pour l'absorption des ions NH_4^+ peut être, outre la diffusion de NH_3, soit par un **cotransport** $K+/NH_4^+$, soit par un **transporteur spécifique** NH_4^+ (Ninnemann *et al.*, 1994). Ces mécanismes impliquent une entrée d'ions H^+ et donc un relarguage simultané de protons pour compenser la différence de charge (Marschner, 1986). Chez *Neurospora crassa* et certaines algues, un système de transporteur plasmalemmique, qui permettrait l'entrée de l'ion NH_4^+ par un gradient de potentiel électrochimique de type uniport ou à travers un canal spécifique a été mis en évidence (Pateman et Kinghorn, 1975; Kleiner, 1981).
La forme prédominante d'azote disponible dans le sol pour les plantes supérieures est le nitrate (NO_3^-) excepté dans les conditions de sols défavorables à la nitrification (sols acides et/ou aération

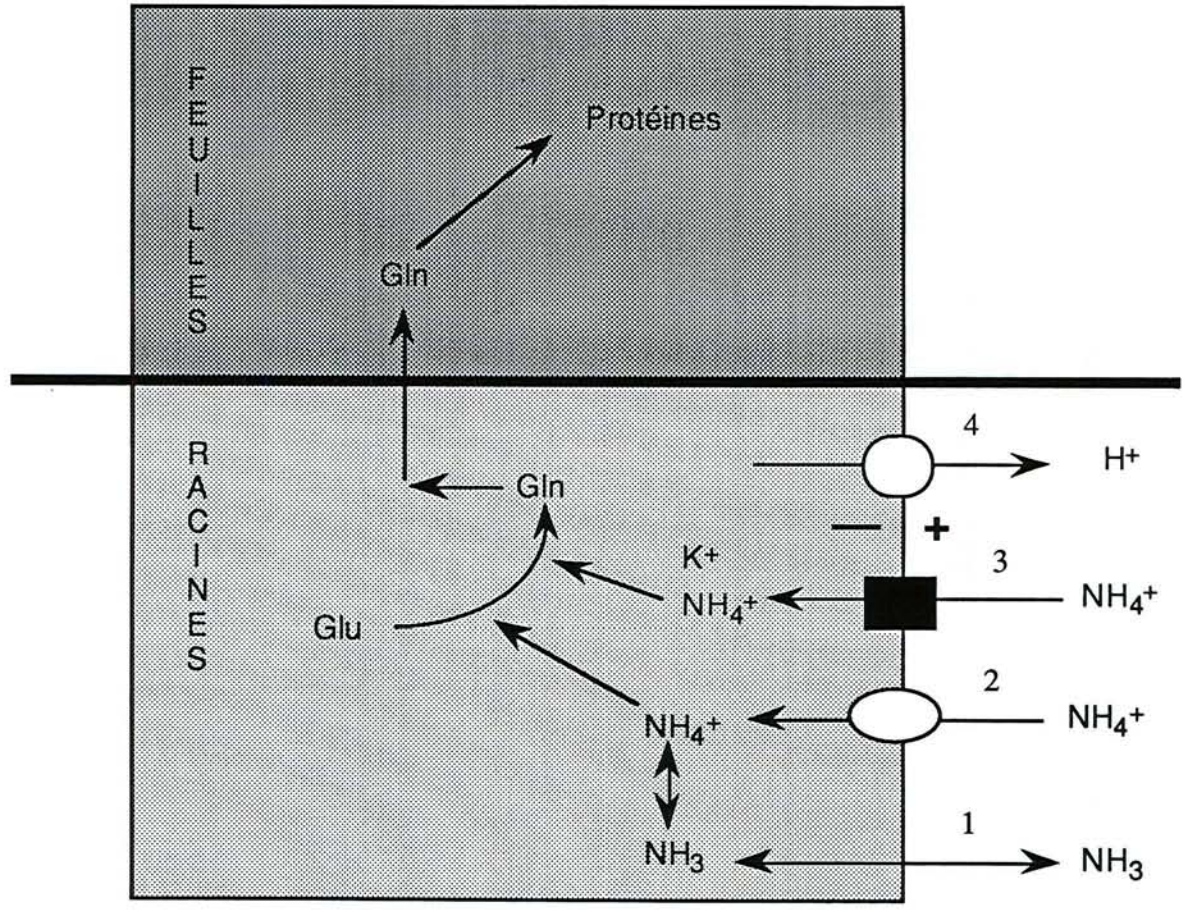


Figure 1.7 : Mécanismes possible de l'assimilation de l'ammonium dans les racines (d'après Ninneman *et al.*, 1994).
1, représente une diffusion simple; 2, un transporteur spécifique; 3, un canal à K^+ qui peut permettre l'absorption d'ammonium; 4, H^+-ATPase relié au métabolisme afin de générer un potentiel membranaire qui permet le passage des ions ammonium dans les cellules.

déficiente) où l'ammonium (NH_4^+) prédomine (Haynes, 1986; Read *et al.*, 1989). C'est le cas de l'écosystème forestier où l'ammonium est la forme d'azote minéral prédominante, le rapport ammonium sur nitrate étant voisin de dix (Dickson, 1989). Il en résulte que les **plantes ligneuses** ont une **croissance meilleure** en alimentation ammoniacale plutôt qu'en alimentation nitrique (Kramer et Kozlowski, 1979), ce qui est souvent considéré comme une adaptation à des sols acides.

Les vitesses d'absorption de l'ion NH_4^+ varient considérablement d'un organisme à l'autre. Ainsi, des mesures de vitesse maximale d'absorption ont donné des vitesses de l'ordre de 69 µmol/h/g MS pour le Blé (Morgan et Jackson, 1989), 2,5 µmol/h/g MS pour le Pin noir (Martin, 1982), et 4,8 µmol/h/g MS pour le Hêtre (Ben Driss, 1988). Chez l'Épicéa les mesures de vitesses ont donné des valeurs comprises entre 0,21 et 6,45 µmol/h/g pour des concentrations externes comprises respectivement entre 10 µM et 1,5 mM en ammonium (Kronzucker *et al.*, 1995). La vitesse maximale déterminée pour le Douglas est de 7 µmol/h/g (Wijk et Prins, 1993).

Chez le Blé, Causin et Barneix (1994; 1993) ont mis en évidence une inhibition du prélèvement de NH_4^+ en présence de glutamine ou d'asparagine ajoutée dans le milieu extérieur. Les hypothèses pouvant expliquer cette inhibition par des acides aminés sont nombreuses : une dépolarisation transitoire du plasmalemme (Etherton et Rubinstein, 1977; Kropf *et al.*, 1984; Clarkson *et al.*, 1989) une diminution de l'accumulation transitoire de l'ammonium dans les tissus (Morgan et Jackson, 1989, 1988; Jackson et Volk, 1992). Chez le Blé, il semblerait que l'effet inhibiteur de ces amides est dû soit à l'augmentation du pool endogène d'asparagine, soit à leur action sur le milieu extérieur des racines (Causin et Barneix, 1994). En présence d'ammonium, le flux de nitrate dans la plante va être aussi affecté (Ingestad, 1979; Boxman et Roelofs, 1988; Marschner *et al.*, 1991). Ainsi, chez le Douglas la vitesse de prélèvement du nitrate va être réduite de moitié en moyenne par l'ajout d'ammonium dans le milieu extérieur (Wijk et Prins, 1993). L'effet de l'ammonium sur le prélèvement du nitrate peut être expliqué par plusieurs phénomènes : une réduction du potentiel membranaire et par là même une chute du cotransport NO_3^-/H^+ (Ullrich, 1987; Ayling, 1994); une inhibition des transporteurs du nitrate ou de la nitrate réductase (Breteler et Siegerist, 1984).

1.2.2.2. Assimilation de l'ammonium

Chez des plantes de type C3, le taux de production d'ammonium par la photorespiration dans les feuilles est approximativement 10 fois le taux normal d'assimilation de nitrate (Lea *et al.*, 1990). De plus, des expériences réalisées avec soit des inhibiteurs, soit des mutants déficients en enzymes clés du métabolisme azoté, ont clairement montré que les plantes dépérissaient rapidement si l'assimilation de l'ammonium était bloquée (Blackwell *et al.*, 1988b). Quelque soit son origine, l'ion ammonium, indispensable à la vie des plantes, est rapidement incorporé dans des composés organiques car son accumulation est toxique pour la cellule. Cette incorporation

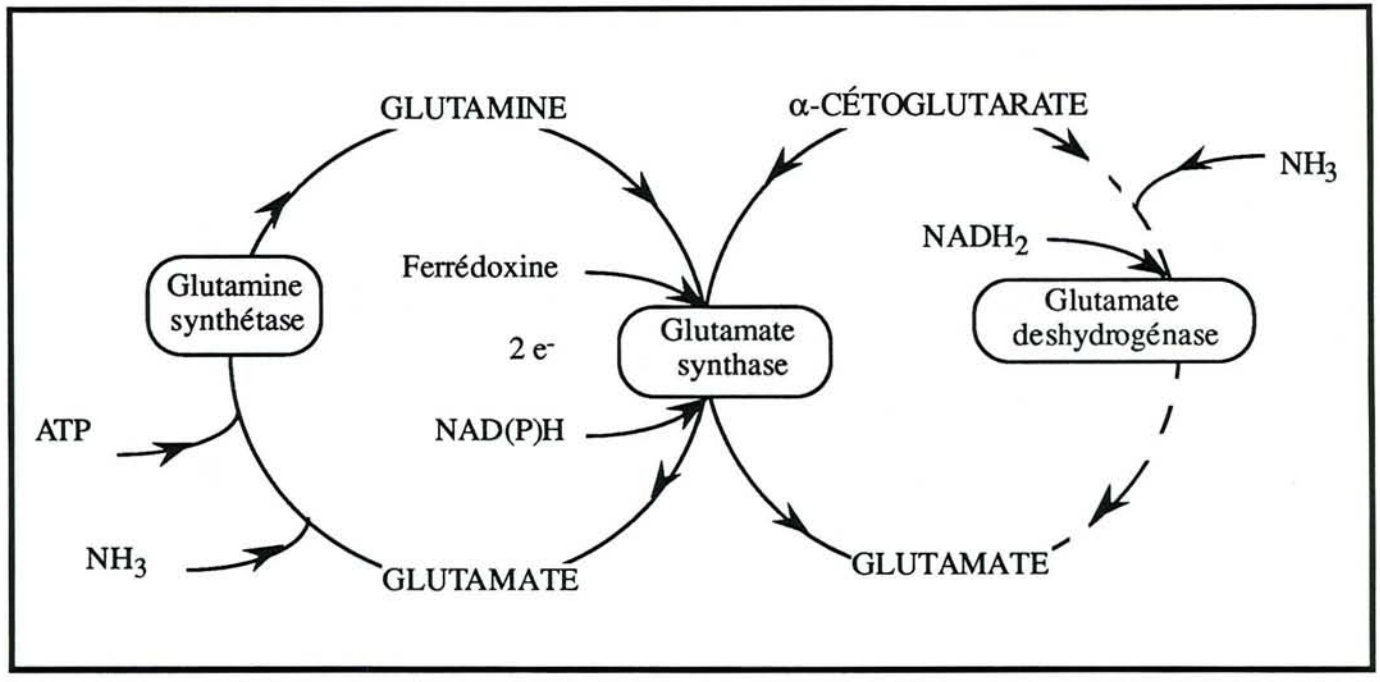


Figure 1.8 : Schéma des deux voies biochimiques (GDH et GS/GOGAT) responsables de l'assimilation primaire de l'ammonium.

constitue l'assimilation primaire. Cette assimilation peut se faire suivant deux voies biochimiques différentes (Stewart *et al.*, 1980; Oaks et Hirel, 1985) :

- la voie **glutamate déshydrogénase** (GDH; EC 1.4.1.4 ou 1.4.1.2) qui catalyse la formation réversible du glutamate à partir de l'ion ammonium et de l'α-cétoglutarate (Figure 1.8).

- la voie du **cycle glutamine synthétase** (GS; EC 6.3.1.2)/**glutamate synthase** (GOGAT; EC 1.4.7.1 ou 1.4.1.14) qui catalyse l'amination du glutamate pour former la glutamine par la GS (Figure 1.8). Le groupement amide de la glutamine peut être ensuite transféré sur l'α-cétoglutarate pour former du glutamate, grâce à l'intervention d'une deuxième enzyme, la GOGAT (Figure 1.8).

Le cycle **GS/GOGAT** est considéré comme la **voie majeure** de l'assimilation de l'ammonium chez les végétaux supérieurs (Ito *et al.*, 1978; Miflin *et al.*, 1980; Miflin et Lea, 1980; Oaks et Hirel, 1985; Lea *et al.*, 1989; Oaks, 1994). Ceci a été confirmé par la mesure de l'incorporation de l'ion NH_4^+ en présence de l'inhibiteur spécifique à la GS, la MSX, et aussi par les mesures des constantes d'affinité pour cet ion. En effet, les K_m de cette enzyme pour l'ammonium varient de 10 à 50 µM (McNally et Hirel, 1983) alors que les valeurs de K_m de la GDH sont de l'ordre de 2 à 50 mM (Stewart *et al.*, 1980). L'azote incorporé dans la glutamine par la glutamine synthétase et dans le glutamate par la glutamate déshydrogénase peut être redistribué dans d'autres acides aminés, essentiellement par l'action des transaminases ou aminotransférases.

1.2.2.2.1. LA GLUTAMATE DÉSHYDROGÉNASE (GDH)

Pendant de nombreuses années, il était établi que la GDH réalisait chez les plantes supérieures un flux net dans le sens de la synthèse de glutamate et ainsi l'enzyme était responsable de l'assimilation d'ammonium (Davies, 1986). Cependant, la découverte de la glutamate synthase a changé ce point de vue. Maintenant, il est généralement accepté que le cycle GS/GOGAT est la voie principale de l'assimilation de l'ammonium chez les végétaux (Miflin et Lea, 1980; Stewart *et al.*, 1980; Lea *et al.*, 1990; Oaks, 1994). Le rôle de la GDH reste donc encore obscur car on trouve néanmoins souvent un taux élevé de cette enzyme dans les tissus végétaux. Par exemple, on trouve la GDH à NAD dans les tissus sénescents ou racinaires (Loyola-vargas et De Jimenez, 1984; Loulakakis *et al.*, 1994). Cette enzyme peut égalemment opérer dans l'assimilation ou la réassimilation de l'ammonium, **complétant** ainsi le cycle GS/GOGAT dans la **synthèse de glutamate**, surtout en condition de stress (Yamaya *et al.*, 1984; Srivastava et Singh, 1987; Hudson et Daniel, 1993); ou fonctionner dans le sens de la désamination du glutamate connectant la GDH avec le cycle du carbone plutôt que celui de l'azote (Robinson, 1992, 1991).

Distribution et isoformes

Chez les plantes supérieures, on a pu mettre en évidence une **glutamate déshydrogénase à NAD** [EC 1.4.1.2., NAD-GDH] localisée surtout dans les **mitochondries**, et une **glutamate déshydrogénase à NADP** [EC 1.4.1.4., NADP-GDH] localisée le plus souvent dans les **chloroplastes** (Pahlich et Joy, 1970; Stewart *et al.*, 1980). L'activité glutamate déshydrogénase à NADP ou à NAD a été trouvée chez de nombreuses espèces végétales (Stewart *et al.*, 1980; Zelmer et Günter, 1987; Lea *et al.*, 1990). Les multiples formes de GDH des végétaux peuvent utiliser à la fois le NAD(H) et le NADP(H). Néanmmoins, dans la plupart des cas, le NAD(H) est préféré (Srivastava et Singh, 1987). De fortes activités GDH ont ainsi été mesurées dans les différentes parties d'un végétal (Emes et Fowler, 1979; Stewart, *et al.*, 1980; Singh et Srivastava, 1982; Oaks et Hirel, 1985; Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1990), voir même dans les fruits (Loulakakis *et al.*, 1994), et aussi dans les racines et les aiguilles de certaines espèces ligneuses (Lea *et al.*, 1990; Vézina *et al.*, 1992; Bedell *et al.*, 1994; Pérez-Soba et De Visser, 1994).

Lors d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, on peut avoir pour la GDH à NAD des profils électrophorétiques constitués de sept bandes correspondantes à sept isoenzymes. Ces septs isoenzymes ont été trouvés chez des extraits bruts d'*Arabidopsis thaliana* (Cammaerts et Jacobs, 1985), de *Vitis vinifera* (Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1996, 1991). Chez *V. vinifera*, on a proposé des rôles différents pour deux de ces septs isoenzymes (GDH1 et GDH7); GDH1 aurait une activité catabolique importante alors que l'isoenzyme GDH7 aurait plutôt une activité anabolique (Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1991). Mais des travaux récents ont démontré que les caractéristiques cinétiques de ces septs isoenzymes étaient similaires et qu'il n'y avait donc pas de fonctions spécifiques pour l'une ou l'autre isoenzyme (Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1996). Ces septs isoenzymes ont été mises en évidence chez les feuilles (Lam *et al.*, 1995; Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1996, 1990) et les graines, chez qui elles disparaissent au cours de la germination (Stewart *et al.*, 1980). Un autre profil électrophorétique avec une seule bande d'activité peut aussi être révélé chez des feuilles et surtout chez les racines (Stewart *et al.*, 1980; Bedell *et al.*, 1994)

Mécanismes et propriétés physico-chimiques

La glutamate déshydrogénase catalyse l'interconversion de l'α-cétoglutarate et du glutamate. En effet, deux réactions biochimiques distinctes sont réalisables par la GDH: l'amination de l'α-cétoglutarate (sens anabolique) et la désamination du glutamate (sens catabolique) (Lea *et al.*, 1990).

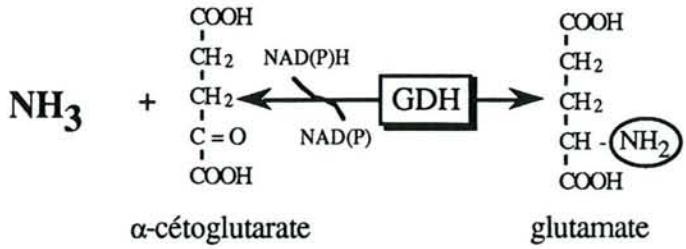


Figure 1.9 : *Réactions catalysées par la glutamate déshydrogénase (GDH)*

Cette enzyme présente un Km élevé pour l'ammonium avec des valeurs de 33 mM pour *Lemma minor* (Stewart et Rhodes, 1977), de 38 mM pour les racines de *Pisum sativum* (Pahlich et Joy, 1971) ou de 45 à 53 mM pour la GHD1 et GDH7 des feuilles de *Vitis vignifera* (Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1996). En général, les valeurs de constantes d'affinité mesurées sont supérieures à 1 mM (Lea *et al.*, 1990). Cette caractéristique tenterait à promouvoir un rôle catabolique à l'enzyme plutôt qu'un rôle dans l'assimilation de l'ammonium. Les affinités pour les cofacteurs sont moins élevées et sont par exemple de l'ordre de 0,2 mM pour le NAD^+, entre 0,017 et 0,12 mM pour le NADH (Stewart *et al.*, 1980). Enfin, les valeurs de Km pour l'α-cétoglutarate sont de l'ordre de 1 à 4 mM (Stewart *et al.*, 1980; Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1996). Les valeurs de pH optimum pour la réaction de désamination ou d'amination varient entre des valeurs de pH 8-10 et 7,5-8,9 pour respectivement la désamination et l'amination (Stewart *et al.*, 1980).

Les GDHs des plantes supérieures ont généralement une masse moléculaire entre 208 et 480 kDa et sont composés de 4 sous-unités dans le cas de la GDH à NAD et de 6 sous-unités dans le cas de la GDH à NADP (Hudson et Daniel, 1993). Les septs bandes obtenues lors d'une électrophorèse correspondent à une structure hexamérique constituée de deux sous-unités polypeptidiques qui différent légèrement en charge et masse moléculaire (Cammaerts et Jacobs, 1985; Lam *et al.*, 1995; Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1996). Ainsi chez *Vitis vignifera*, les deux sous-unités (α et β) sont associées pour former les isoenzymes GDH1 et GDH7 homohexamèriques; les autres isoenzymes sont des hybrides constituées de différentes quantités en ces deux sous-unités (Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1994, 1991). Il a été suggéré que deux gènes non alléliques sont responsables de la synthèse de ces deux sous-unités (Cammaerts et Jacobs, 1985, 1983).

Rôles et régulation

Les activités GDH sont affectées par différentes conditions d'environnement ou de nutrition telles que la **lumière**, la **source d'azote** ou **de carbone** (Srivastava et Singh, 1987; Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1992). Par exemple, chez des cultures cellulaires de *Beta vulgaris* et de *Chenopodium album*, l'activité GDH à NAD est stimulée lors d'une culture sur milieu avec ammonium, et réprimée lorsqu'il s'agit de nitrate comme source d'azote (Zelmer et Günther,

1988). L'activité GDH à NAD augmente de 45% en octobre dans les aiguilles de Douglas d'arbres fertilisés par rapport à des arbres non fertilisés (Pérez-Soba et De Visser, 1994). Les activités GDH mesurées, dans les tissus racinaires ou foliaires du Maïs, sont différentes selon l'ajout de sels azotés ou d'acides aminés (Singh et Srivastava, 1983, 1982). Par exemple, la présence de malate semble aussi avoir un effet sur l'estimation de l'activité GDH à NAD (Frike et Pahlich, 1992; Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1996).

Les GDHs des plantes sont des métalloprotéines et l'influence des **cations divalents métalliques** sur cette enzyme a été bien étudiée (Kindt *et al.*, 1980; Yamaya *et al.*, 1984; Srivastava et Singh, 1987; Das *et al.*, 1989; Itagaki *et al.*, 1990). Par exemple, l'ion Ca^{2+} s'est avéré comme un activateur de la GDH à NAD des graines de *Pisum sativum* (Kindt *et al.*, 1980), et des racines de *Brassica rapa* (Itagaki *et al.*, 1990). Par contre, la GDH à NAD des racines de *Pisum sativum* s'est avérée activée par Zn^{2+} (Joy, 1973). La nécessité de la présence d'ions métalliques pour l'activité GDH uniquement dans le sens de la réduction par le NADH de l'α-cétoglutarate reste un problème mal résolu. Ainsi, l'activité GDH à NADH de *Lemma minor* disparaît lors de l'addition d'EDTA, mais des ions calcium ou magnésium restaurent l'activité GDH à NAD^+, et seuls les ions calciums restaurent l'activité GDH à NADH (Ehmke et Hartmann, 1976).

De nombreux auteurs ont aussi rapporté la variation du rapport d'activité NADH-GDH/NAD^+-GDH selon le **stade de développement** ou les conditions d'environnement (Loyolas-Vargas et De Jimenez, 1984; Cammaerts et Jacobs, 1985; Leon *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1992). Ainsi, chez des extraits cellulaires de carotte, l'activité GDH mesurée était faible chez des cellules en phase exponentielle de croissance et atteignait un maximun en phase stationnaire (Robinson *et al.*, 1991). Ceci suggère que la GDH n'est pas importante dans l'assimilation de l'ammonium puisque la phase exponentielle correspond à une période où l'assimilation de l'azote est rapide, mais que cette enzyme est plutôt impliquée dans le recyclage du carbone quand la source de sucre devient limitée (Robinson *et al.*, 1992, 1991). De plus, des expériences de marquage radioactif à l'azote ^{15}N en présence ou non de MSX, l'inhibiteur de la GS, ont démontré que la GDH n'intervenait pas ou peu dans l'assimilation de l'ammonium (Lea *et al.*, 1990; Vézina *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1995). Des preuves du possible fonctionnement de la GDH dans le sens de la désamination du glutamate ont été démontrées par Fox *et al.* (1995) et Stewart *et al.* (1995).

Aspect génomique

Des **mutants déficient en GDH mitochondriale** et en gène GDH1 ont été obtenus chez le Maïs (Pryor, 1979; Rhodes *et al.*, 1989; Lam *et al.*, 1995). Un mutant a aussi été obtenu chez *Arabidopsis* (Lam *et al.*, 1995). Les études des mutants obtenus ont montré qu'ils avaient une répartition partie aérienne/partie racinaire plus faible que la normale et qu'ils étaient très sensibles aux faibles températures (Rhodes *et al.*, 1989; Magalhaes *et al.*, 1990; Pryor, 1990). Des expériences avec un mutant de Maïs ont permis de montrer la fonction de désamination de la GDH

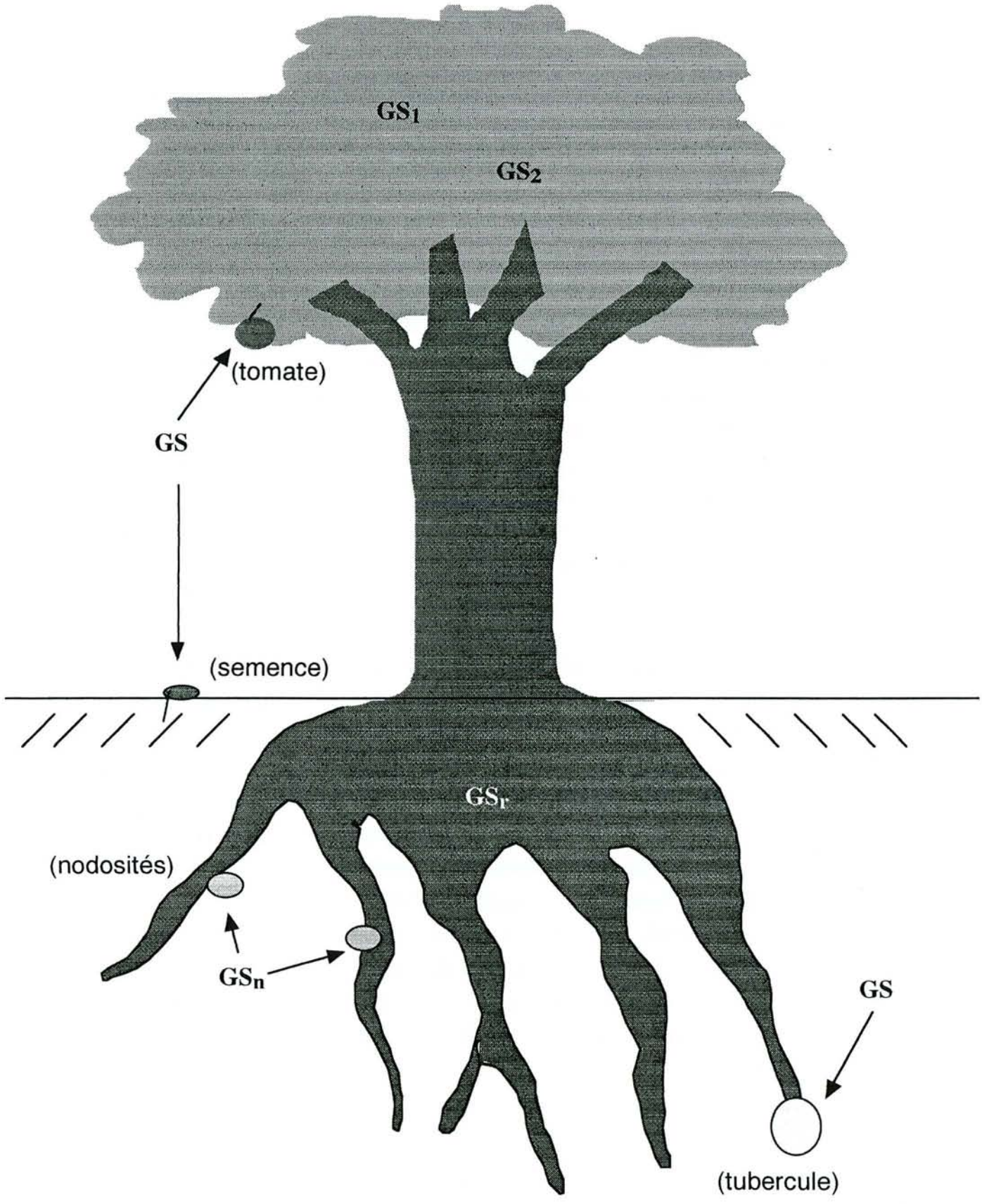


Figure 1.9 : Représentation schématique de la distribution de la GS au sein d'une espèce végétale virtuelle.

(Stewart *et al.*, 1995). Ainsi, Stewart *et al.* (1995) ont démontré que si le Maïs de phénotype sauvage était capable de générer de l'ammonium pour la réassimailation par la voie de désamination du glutamate, le Maïs mutant, lui, en était incapable. La GDH est donc capable de fonctionner dans le sens de la désamination du glutamate. Récemment, un clone d'ADNc de la GDH de la vigne a été isolé (Syntichaki *et al.*, 1996) et va permettre de réaliser des travaux au niveau moléculaire sur les différences entre les isoenzymes et sur le sens de fonctionnement de la GDH .

1.2.2.2.2. LE CYCLE GS/GOGAT

1.2.2.2.2.1. LA GLUTAMINE SYNTHÉTASE (GS)

La glutamine synthétase, du fait de la synthèse de la glutamine, apparaît donc comme une enzyme très importante pour le métabolisme cellulaire. Chez les plantes supérieures, cette enzyme a été mise en évidence à la fois chez les plantes herbacées telles que le Riz (Marechal, 1978; Hirel et Gadal, 1980), l'Orge (Mann *et al.*, 1979), le Haricot (Guiz, 1976) mais aussi chez des plantes ligneuses telles que le Pin (Vézina et Margolis, 1990; Vézina *et al.*, 1988), le Douglas et divers arbres tropicaux (Stewart *et al.*, 1989).

Distribution et isoformes

La glutamine synthétase est distribuée dans les différentes parties d'un végétal (Figure 1.10) :

- dans les semences (Webster, 1964; Duffus et Rosie, 1978; Cánovas *et al.*, 1991),
- les feuilles (Ericson, 1985 ; Yamaya et Oaks, 1988; Höpfner *et al.*, 1990; Miranda-Ham et Loyola-Vargas, 1992; Yamaya *et al.*, 1992; Bielawski, 1994; Cabello *et al.*, 1994; Ochs *et al.*, 1995)
- les fruits (Kang et Titus, 1981; Gallardo *et al.*, 1993; Loulakakis *et al.*, 1994)
- les racines (Webster, 1964; Stewart *et al.*, 1980; Manderscheid, 1986; Vézina *et al.*, 1988; Vézina et Margolis, 1990; Bedell *et al.*, 1995; Ochs *et al.*, 1995),
- dans les nodules racinaires (Dunn et Klucas, 1973; McParland *et al.*, 1976; Cullimore *et al.*, 1983; Robert et Wong, 1986; Bennett et Cullimore, 1989; Cai et Wong, 1989).
- dans des organes souterrains de réserve comme dans la Betterave sucrière (Mäck et Tischner, 1990) ou dans le tubercule de Pomme de terre (Pereira *et al.*, 1996).

Si la GS est présente dans tous les tissus végétaux, la mesure de son activité est beaucoup moins uniforme, et varie d'un tissu à l'autre (Lee *et al.*, 1978; Stewart *et al.*, 1980). En général, l'activité spécifique est plus importante dans les parties aériennes que dans les parties racinaires. Par exemple, chez le Pin 66% de l'activité GS est présent dans les aiguilles contre 28% présent dans les racines (Vézina *et al.*, 1988). Chez *Brassica napus*, la GS est présente à raison de 4,32

nkat/mg de protéines dans les racines contre 6,07 nkat/mg de protéines dans les feuilles (Ochs *et al.*, 1995).
L'étude cellulaire de ces différents tissus a permis de mettre en évidence au moins trois isoformes de la GS.

Dans les feuilles et les tiges, deux isoformes distinctes ont pu être séparées par chromatographie échangeuse d'ion (Mann *et al.*, 1979; Stewart *et al.*, 1980; Miranda-Ham et Loyola-Vargas, 1992; Cabello *et al.*, 1994; Mäck et Tischner, 1994). Ces **deux isoformes foliaires** sont appelées **GS_1** et **GS_2**. Des études par centrifugation en gradient ont permis de localiser la GS1 dans le **cytosol** et la GS_2 dans le **chloroplaste** (Mann *et al.*, 1979; Hirel et Gadal, 1980; Vézina *et al.*, 1988). L'emploi de techniques immunologiques a confirmé cette localisation de la GS1 comme cytosolique, et de la GS_2 comme chloroplastique (Botella *et al.*, 1988; Oaks, 1994). Plus précisement, des études réalisées sur des plantes herbacées ont permis de localiser la GS_1 dans les vaisseaux du phloème, impliquée dans l'assimilation et le transport de la glutamine, et l'isoforme GS_2, dans les cellules du mésophylle et donc associée à la photorespiration (Edward *et al.*, 1990; Kamachi *et al.*, 1992; Yamaya *et al.*, 1992, 1990; Oaks, 1994). La proportion des deux isoformes foliaires varie suivant l'espèce et la partie de la plante étudiée (McNally *et al.*, 1983; Hirel, 1992).

Dans les **racines, une seule isoforme** a été purifiée et caractérisée, tant chez les plantes herbacées que chez des espèces ligneuses, dénommée **GSR** (Hirel et Gadal, 1980; Stewart *et al.*,1980; Vézina et Margolis, 1990; Bedell *et al.*, 1995; Ochs *et al.*, 1995). Cette isoforme racinaire a été localisée dans le cytosol (Emes et Fowler, 1979; Suzuki *et al.*, 1981). Cependant, dans les racines du Pois et d'Alfalfa il a été montré qu'il existait une activité **GS plastidiale** (Vézina et Langlois, 1988; Vézina *et al.*, 1987). Cette isoforme plastidiale apparaîssait comme différente des isoformes cytosoliques et chloroplastiques (Vézina *et al.*, 1987).
Enfin, il convient de noter que des isoformes spécifiques des nodules (GS_n) sont synthétisées au cours du processus de fixation de l'azote atmosphérique (Lara *et al.*, 1983; Cullimore et Bennett, 1988; Gao et Wong, 1994). Il est maintenant démontré que ces isoformes sont en fait constituées de plusieurs polypeptides qui ne sont exprimés que dans les nodules (Bennett et Cullimore, 1989; Gao et Wong, 1994). Chez *Phaseolus Vulgaris*, trois polypetides cytosoliques (α, β, et γ) et un polypeptide plastidial (δ) ont été mis en évidence (Bennett et Cullimore, 1989).

Mécanismes

La glutamine synthétase catalyse l'amination du glutamate donnant ainsi la glutamine (Figure 1.11). Cette réaction nécessite de l'énergie sous forme d'ATP et d' ions divalents.

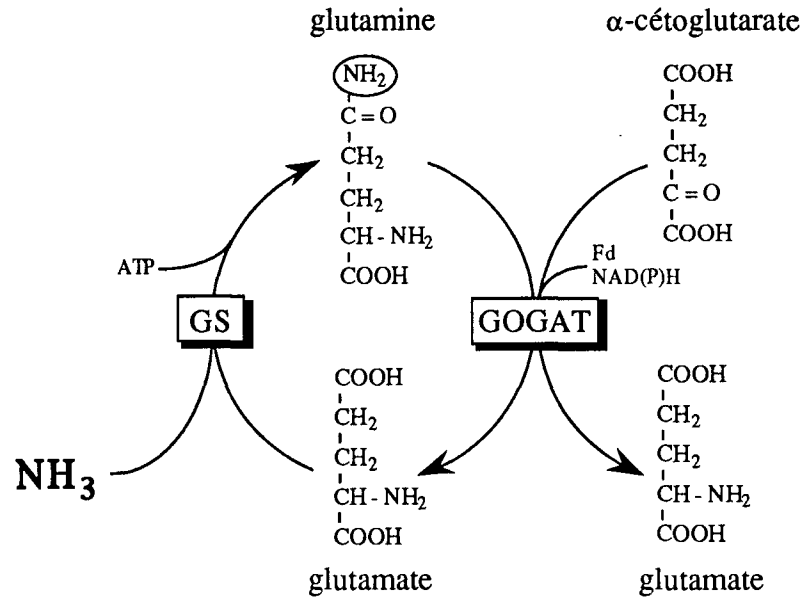


Figure 1.11 : *Réaction catalysée par la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT).*

Le **rôle majeur** de la GS est la **synthèse de glutamine**, forme de transport essentielle chez de nombreuses plantes, qui peut à son tour être convertie en d'autres acides aminés (asparagine et arginine). La glutamine est au centre du métabolisme azoté, elle constitue très souvent le premier produit organique formé. Elle forme avec d'autres acides aminés, notamment l'asparagine, des formes de transport exportées des racines vers les parties aériennes où elle sera utilisée pour la synthèse protéique ou la synthèse d'autres acides aminés (Haynes, 1986). De plus, elle participe aux voies de biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des uréides et des cofacteurs d'oxydo-réduction. En définitif, c'est par elle que la majorité de l'azote minéral entre dans les composés organiques (Stadtman, 1973).

En ce qui concerne les tissus chlorophylliens des plantes de type C_3, il est démontré qu'une large proportion de l'ammonium qui transite par la GS est issue de la photorespiration (Keys *et al.*, 1978; McNally et Hirel, 1983; McNally *et al.*, 1983). En effet, l'ammoniac, libéré au cours du processus de photorespiration dans les mitochondries, diffuse dans le cytosol où il est pris en charge par une glutamine synthétase cytosolique (GS_1), ou lorsque celle-ci est absente par la GS_2 chloroplastique (Fig. 1.12).

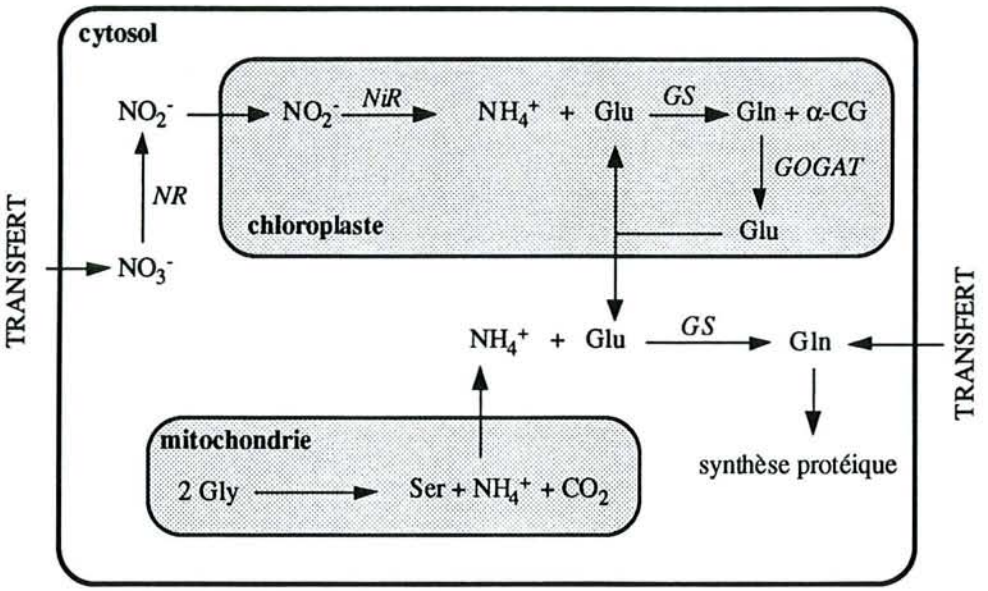


Figure 1.12 : Localisation cellulaire et fonction des enzymes du métabolisme azoté dans les feuilles. *α-CG: α-cétoglutarate; GDH: glutamate déshydrogénase; GOGAT: glutamate synthase; GS: glutamine synthétase; NR: nitrate réductase; NiR: nitrite réductase.*

En effet, quelques auteurs ont mis en évidence la pénétration d'ammonium dans le chloroplaste (Keys *et al.*, 1978; McNally et Hirel, 1983; Lea *et al.*, 1989), et des plantes déficientes en GS cytosolique, peuvent donc assimiler l'ammonium par la GS chloroplastique (McNally *et al.*, 1983).

La glutamine, lorsqu'elle n'est pas synthétisée dans le chloroplaste doit y être transférée afin d'y être métabolisée en glutamate par l'action d'une glutamate synthase ferrédoxine dépendante chloroplastique (voir chapitre GOGAT).

Au niveau des tissus racinaires, l'ammonium qui transite par la GS est issu directement de la solution du sol, ou de la réduction des nitrates. Il est réduit par la GS racinaire cytosolique. Chez les plantes fixatrices d'azote atmosphérique, une source supplémentaire d'ammonium est fournie à la GS racinaire par l'activité nitrogénase.

Au niveau des tissus racinaires, l'ammonium qui transite par la GS est issu principalement de la solution du sol ou des activités combinées de la nitrate réductase et nitrite réductase qui réduisent les nitrates en NH_4^+ (Fig. I.13).

Tableau 1.4 : Principales propriétés physico-chimiques des glutamines synthétases de quelques espèces végétales

Plantes	Type de GS	Propriétés							
		MM (kDa)		pH opt.	Km (mM)				
		Enz. native	sous-unité		NH_4^+	Glu	ATP	NH_2OH	Gln
Orge	GS_r	340	42,5*	7,0	50	5,4	0,6	----	----
	GS_2	363	45,3*	7,5	50	20	0,6	----	----
Riz	GS_r	330	45	7,5	----	2	1	1	----
	GS_2	330	45	7,9	----	----	----	1	----
Tournesol	GS_1	----	----	7,0	----	----	----	5,5	55
	GS_2	----	----	7,5	----	----	----	3,5	47
Épinard	GS_2	360	44	7,3	----	6,7	1,8	----	37,5
Maïs	GS_1	340	38,9-40,5	----	(+) ?	3,4	0,68	----	----
Brassica Napus L.	GS_r	350*	40,5	6,4	----	0,5	0,8	0,6	----
	GS_2	320*	43,8-43,3	6,8	----	33	1,2	3	----
Catharanthus roseus	GS_1	368*	46	----	----	36,32	0,52	0,63	----
	GS_2	384	48	----	----	15,38	0,96	0,55	----

(* = valeur estimée)

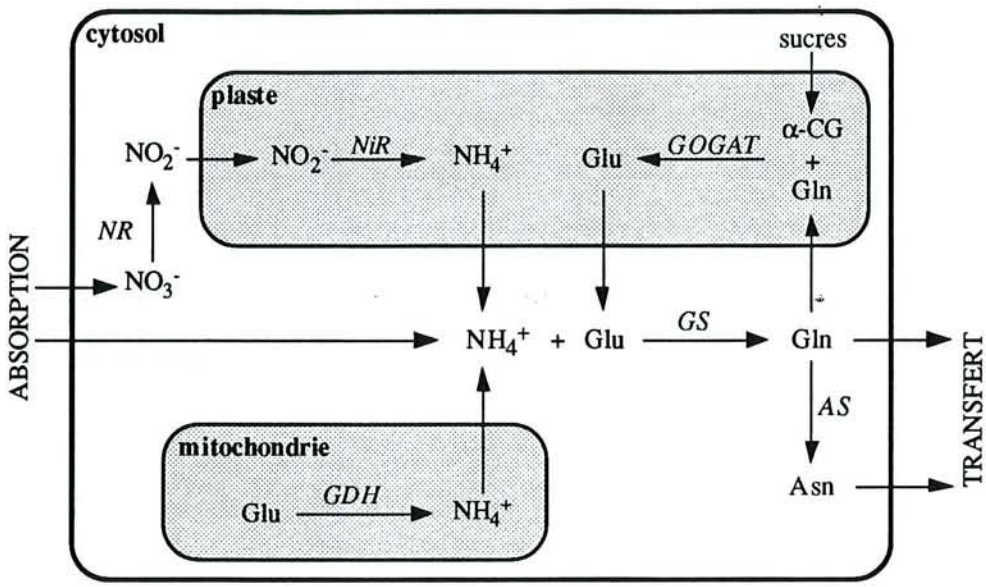


FIgure 1.13 : Localisation cellulaire et fonction des enzymes du métabolisme azoté dans les racines. α-CG: α-cétoglutarate; GDH: glutamate déshydrogénase; GOGAT: glutamate synthase; GS: glutamine synthétase; NR: nitrate réductase; NiR: nitrite réductase.

En ce qui concerne les associations mycorhiziennes, l'assimilation de l'azote semblerait être prise en charge par le système GS/GOGAT chez les mycorhizes de Hêtre (Martin *et al.*, 1986) et par l'action simultanée de la GDH et de la GS chez les ectomycorhizes d'Épicéa (Dell *et al.*, 1989; Chalot *et al.*, 1991).

Propriétés physico-chimiques

En plus de leur comportement en chromatographie échangeuse d'ions, les différentes isoformes de la GS peuvent être aussi dissociées de par leurs caractéristiques physico-chimiques. Ainsi la glutamine synthétase des végétaux supérieurs est constituée de huit sous-unités (de 39 à 50 kDa) et possède une masse moléculaire de l'ordre de 340 à environ 400 kDa (Tableau 1.4) (Stewart *et al.*, 1980; Lea *et al.*, 1990). Ces huit sous-unités sont agencées en deux tétramères plans (McParland *et al.*, 1976). Chez le Riz, la GS foliaire est de 460 kDa et la masse moléculaire de la GS racinaire est plus faible, 330 kDa constituée d'un seul type de sous-unités de 45 kDa (Hirel et Gadal, 1980).

L'isoforme chloroplastique est la plus thermolabile et son pH optimum se situe aux environs de 8,0 alors que celui de l'isoforme cytosolique foliaire ou racinaire est aux alentours de 7,4 (Lea *et al.*, 1990).

Les constantes d'affinité de la GS pour ses substrats varient peu d'un organisme à l'autre. Elles sont généralement caractérisées par **une très forte affinité** de l'enzyme pour **l'ion ammonium** (Stewart *et al.*, 1980; Lea *et al.*, 1990; Oaks, 1994). Ainsi, l'existence de coopérativité entre cette enzyme et son substrat ont été mis en évidence chez le pédicelle de Maïs

(Muhitch, 1989), les nodules du Lupin (Lombatsi *et al.*, 1987) et les racines du Douglas (Bedell *et al.*, 1995). Les Km déterminés pour le glutamate et l'ATP varient suivant l'isoforme et l'organisme végétal étudié (Tableau 1.4). Par exemple, l'affinité pour l'ATP est comprise entre 0,6 et 1 mM pour la GS racinaire, et entre 0,6 et 1,8 mM pour la GS chloroplastique. Une coopérativité négative a été détectée pour le glutamate chez quelques végétaux (Ahmad *et al.*, 1982; Smirnoff et Stewart, 1987; Lea *et al.*, 1990).

Régulation

L'activité de la glutamine synthétase peut être régulée par de nombreux effecteurs, tels que les cations divalents, les acides aminés ou par des facteurs environnementaux tels que la lumière ou l'azote).

Tableau 1.5 : Influence de quelques effecteurs sur l'activité glutamine synthétase.

Espèces		Effecteurs	
		Mg_2^+	Acide Aminé
	GS_r	+	AMP, $GlcNH_26P$
Riz [a]			
	GS_2	++	AMP, $GlcNH_26P$
	GS_1	++	
Tournesol [b]			----
	GS_2	+++	ADP, Gln
Maïs [c]	GS_1	++	ADP
Pin [d]	GS_r	++	----
	GS_2	+	----

Le nombre de signe, +, représente l'influence de l'effecteur sur l'activité GS. $GlcNH_26P$ = glucosamine-6-phosphate. [a] Hirel et Gadal (1980); [b] Cabello *et al.* (1994); [c] Muhitch (1989); [d] Vézina et Margolis (1990).

Pour fonctionner, la GS requiert la présence d'**ions divalents** tels que le Mg^{2+} et dans une moindre mesure le Mn^{2+} ou encore le Co^{2+} (O'Neal et Joy, 1974; Stewart *et al.*, 1980). La nature de l'ion divalent et sa concentration influencent l'activité de la GS et jouent un rôle dans la catalyse de l'enzyme aux pH optimums. Ainsi, les valeurs du pH optimal se situent autour de 7,5 à 8 en présence de Mg^{2+}, et autour de 5 en présence de Mn^{2+}en ce qui concerne le pH optimal de la réaction biosynthétique qui utilise le glutamate en tant que substrat (Winter *et al.*, 1982; Manderscheid et Wild, 1986; Vézina et Margolis, 1990).

Tableau 1.6 : % d'homologie de séquences en acides aminés entre les GS de quelques plantes supérieures (d'après Canton et al. (1993) modifié).

Espèces		*Zea mays*	*Hordeum vulgare*	*Oryza sativa*		*Pisum sativum*		*Phaesolus vulgaris*		*Glycine max*	*Pinus sylvestris*
		GS_2	GS_2	GS_r	GS_2	GS_r	GS_2	$GS_{1\alpha}$	GS_2	GS_1	GS_1
Zea mays	GS_2	----	----	77,2	92,7	76,4	85,9	76,1	87,6	74,4	73,3
Hordeum vulgare	GS_2		----	----	----	76,0	85,0	74	85,0	----	----
Oryza sativa	GS_r			----	77,2	83,9	78,0	84,8	78,6	84,2	78,3
Oryza sativa	GS_2				----	76,1	88,4	76,6	89,6	75,4	72,4
Pisum sativum	GS_r					----	76,6	92,1	78,6	86,7	79,7
Pisum sativum	GS_2						----	76,4	94,3	76,6	74,1
Phaesolus vulgaris	$GS_{1\alpha}$							----	78,0	88,4	81,4
Phaesolus vulgaris	GS_2								----	78,0	75,2
Glycine max	GS_1									----	80,5
Pinus sylvestris	GS_1										----

Le rôle de l'ion magnésium a été démontré aussi bien chez des Angiospermes (Hirel et Gadal, 1980; Ericson, 1985; Muhitch, 1989; Cabello *et al.*, 1994) que chez les Gymnospermes (Vézina et Margolis, 1990; Bedell *et al.*, 1995). Ainsi chez les feuilles de tournesol, l'isoforme cytosolique montre une réponse sigmoïdale à différentes concentrations en magnésium, alors que l'isoforme chloroplastique montre plutôt une réponse du type Michaélienne (Cabello *et al.* 1994). Une telle réponse sigmoïdale a été aussi obtenue chez le Pin (Vézina et Margolis, 1990) et le Douglas (Bedell *et al.*, 1995). Une explication plausible de l'effet du magnésium réside en la possibilité que ce cation favorise la formation de complexes avec l'ATP pour l'accession au site allostérique de la GS. Cette hypothèse a été démontrée chez le Pois, où 8 sites allostériques par enzyme ont été mis en évidence (Knight et Langston-Unkefer, 1988). De plus, avec Mg^{2+} la spécificité de l'enzyme pour l'ATP est plus grande que par exemple avec le Mn^{2+} pour l'UTP (O'Neal et Joy, 1974). Les cations divalents peuvent donc influencer la spécificité de l'enzyme pour tel ou tel nucléotide.

Mais les **nucléotides** peuvent seuls être responsables de la variation d'activité de la glutamine synthétase. La présence d'**AMP**, d'**ADP** a aussi inhibé l'expression de l'activité glutamine synthétase respectivement chez le Riz, le Tournesol, le Maïs (Tableau 1.5). Des **acides aminés**, comme la glycine (Gly) ou l'alanine (Ala), peuvent avoir un rôle sur la GS (Stewart et Rhodes, 1977). La glutamine (Gln) affecte l'activité GS chloroplastique chez le Tournesol (Tableau 1.5). Mais aucun effet inhibiteur de ces composés n'a été mis en évidence par exemple chez l'Épinard (Ericson, 1985) ou le Blé (Fröhlich *et al.*, 1994). Des composés organiques, autres que les acides aminés et comme par exemple la glucosamine-6-phosphate ($GlcNH_26P$), peuvent aussi influencer l'activité GS (Hirel et Gadal, 1980).

La régulation des deux isoformes foliaires (GS_1 et GS_2) est différente. L'isoforme $\mathbf{GS_2}$ est **induite** par la **lumière** et l'**ammonium** (Edwards et Coruzzi, 1989), et est préférentiellement dégradée durant la sénescence des feuilles du Riz (Kamachi *et al.*, 1992). Par contre, l'isoforme $\mathbf{GS_1}$ n'est **pas induite** par la **lumière** et il n'y a pas de réponse claire vis à vis de l'ammonium (Edwards et Coruzzi, 1989) et reste stable lors de la sénescence des feuilles (Kamachi *et al.*, 1992). Une augmentation de la GS plastidiale par l'ajout de nitrate dans le milieu externe a été mis en évidence dans les cellules du mésophylle (Sakakibara *et al.*, 1992b). Dans les racines de Maïs, la faible quantité de GS plastidiale présente répond positivement à une solution de nitrate mais pas l'addition d'ammonium. Toujours dans les racines de Maïs, la GS cytosolique n'est pas influencée par l'une des deux sources d'azote, alors que l'enzyme racinaire (GSr) est influencée à la fois par le nitrate et l'ammonium (Sakakibara *et al.*, 1992b).

Aspect génomique

Ces dernières années, la glutamine synthétase a vu sa caractérisation moléculaire se développer. Les gènes codant pour l'isoforme racinaire (Sakamoto *et al.*, 1989; Schock *et al.*, 1994),

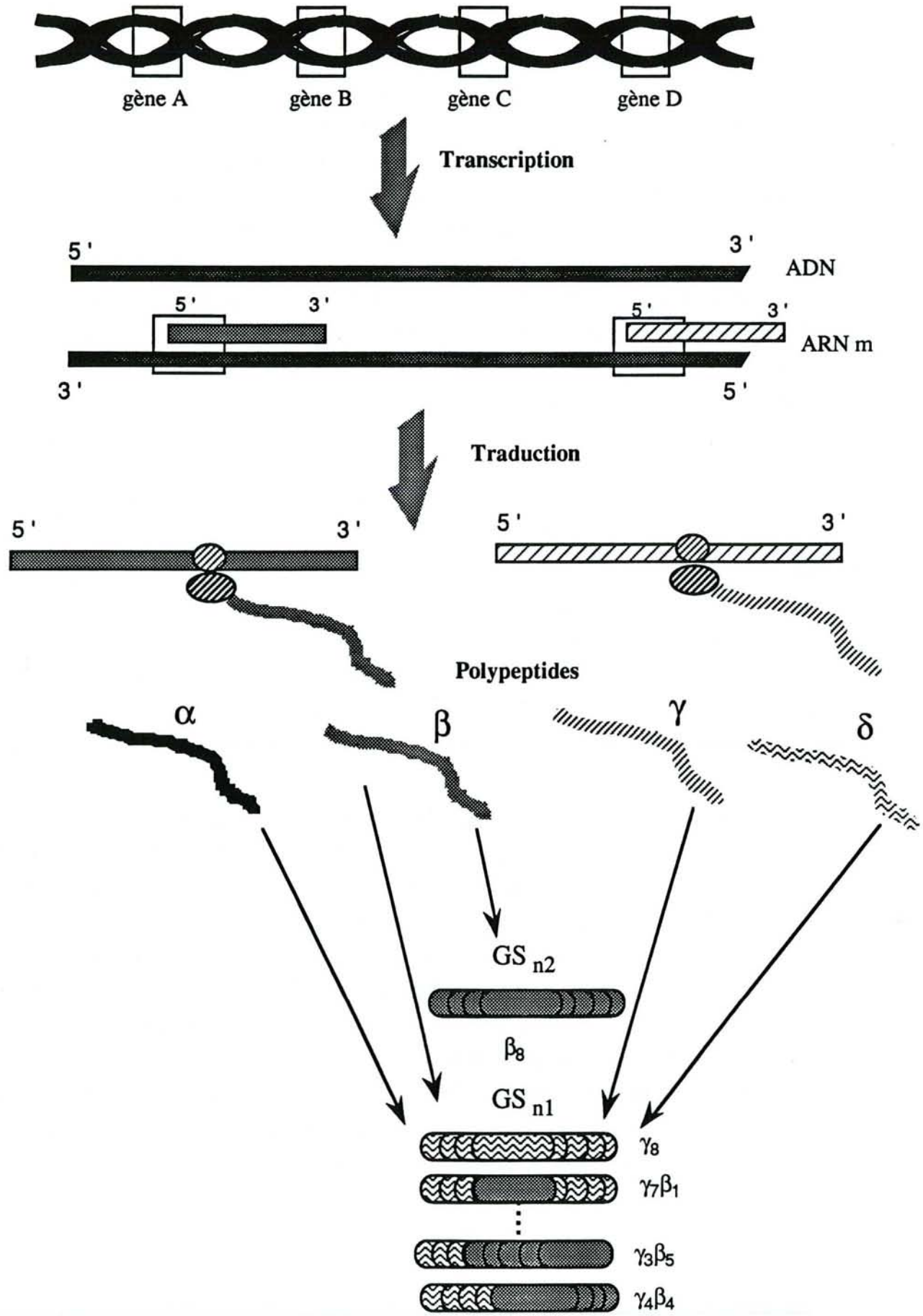


Figure 1.14 : Représentation schématique de l'obtention des isoformes GS des nodules de *Phaseolus vulgaris*.

chloroplastique (Tingey *et al.*, 1988; Ochs *et al.*, 1993), cytosolique (Tingey et Coruzzi, 1987; Canton *et al.*, 1993) et même l'isoforme spécifique des nodules (Bennett *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1995)ont été clonés.

Ces études ont permis de déterminer le rôle respectif de ces différentes isoformes dans le métabolisme de l'azote. La **GS chloroplastique** apparaît comme codée par **un seul gène** chez le Maïs (Li *et al.*, 1993), l'Orge (Baima *et al.*, 1989), chez *Arabidopsis thaliana* (Peterman et Goodman, 1991), et par **une famille multigénique** chez le Pois (Tingey *et al.*, 1988). Ainsi chez le Pois, la transcription de l'isoforme GS_2 est stimulée par la lumière et cette régulation par la lumière est effectuée par le phytochrome (Tingey *et al.*, 1988; Edwards et Coruzzi, 1989). Des données physiologiques et biochimiques laissent penser que la **GS_2** est **impliquée** dans la **réassimilation** de **l'ammonium** issu de la **photorespiration**. Des mutants d'Orge déficients en protéine GS_2 et/ou en ARNm de cette enzyme sont incapables de croître en condition de photorespiration (Wallsgrove *et al.*, 1987; Freeman *et al.*, 1990). Par contre dans ces mêmes conditions, le Pois peut se développer et la transcription de l'isoforme chloroplastique est stimulée (Edward et Coruzzi, 1989). L'expression du gène GS_2 du Pois peut se réaliser dans les cellules photosynthétiques de plants de tabac transgéniques (Edwards *et al.*, 1990), confirmant ainsi le rôle de l'enzyme chloroplastique dans l'utilisation de l'ammonium issu de la photorespiration.
On a pu mettre en évidence que **l'isoforme cytosolique** était codée par **4 ou 5 gènes** chez *Arabidopsis* (Peterman et Goodman, 1991), 5 gènes distincts chez le Maïs (Li *et al.*, 1993) et par une famille multigénique chez l'Alfalfa (Temple *et al.*, 1994), le Pois (Tingey *et al.*, 1988), le Haricot (Gebhardt *et al.*, 1986), le Riz (Sakamoto *et al.*, 1989) ainsi que chez le Pin (Canton *et al.*, 1993). Le clônage de cette isoforme a permis de mieux comprendre son rôle dans l'assimilation azoté de la plante. Par exemple chez le Pois, le gène le plus exprimé pour l'isoforme cytosolique (GS3A) se situe dans les cellules du phloème de Tabac et d'Alfalfa transgéniques (Edwards *et al.*, 1990; Brears *et al.*, 1991). Ceci suggère que la **fonction** de ce gène est de **générer** de la **glutamine** pour le **transport intercellulaire**.
Chez *Phaseolus vulgaris,* la diversité des isoformes GS_{n1} et GS_{n2} (Figure 1.14) est dûe à différentes modalités d'assemblage des 4 polypeptides (α, β, γ, δ) lesquels sont codés par des gènes spécifiques dont l'expression varie selon le stade de dévelopement et le tissu considéré (Bennett et Cullimore, 1989; Gao et Wong, 1994).

La GS des feuilles d'Épinard et de Tabac présente une composition en acides aminés riche surtout en acide glutamique, acide aspartique, alanine et glycine (Ericson, 1985; Nato *et al.*, 1984). On retrouve déja chez ces deux espèces des homologies dans la composition en acides aminés de l'enzyme. En effet, Tingey *et al.* (1988) ont montré que les isoformes de la GS étaient constituées de polypeptides de tailles variables codés par des gènes homologues. En comparant la séquence en acides aminés d'isoformes GS de végétaux supérieurs (Tableau 1.6) on remarque que l'**homologie de séquence** est **bien conservée** quelque soit l'espèce et l'isoforme. Par exemple, l'isoforme racinaire et chloroplastique conserve entre 76 et 78% d'homologie de séquence, et la GS_1 du Pin, un Gymnosperme, entre 78 et 82% d'homologie avec l'isoforme

Tableau 1.7 : Régulation possible de quelques gènes de GS de plantes supérieures. (Plus il y a de signe +, plus les tissus sont spécifiques pour le gène étudié).

Espèces	Enzyme (gène)	Spécificité des tissus		Induction		Références
		Feuilles	Racines	Lumière	Azote	
Arabidopsis thaliana	GS_r cytosolique (GLN1)	+	+++	NON		Peterman et Goodman (1991)
	GS_2 chloroplastique (GLN2)	+++	+/-	OUI		Peterman et Goodman (1991)
Glycine max (nodules)	GS cytosolique (pGS19)	+/-	++		OUI (NH_4^+)	Hirel *et al.* (1987)
Pisum sativum L.	GS_1 cytosolique (pGS134)	+/-	++			Tingey *et al.* (1988)
	GS_2 chloroplastique (pGS197)	+++	+/-	OUI		Tingey *et al.* (1987)
Hordeum vulgare	GS_2 chloroplastique (pGS8)	+++	?			Baima *et al.* (1989)
Pinus sylvestris	GS_1 cytosolique (pGSP114)	+++	+/-	NON		Canton *et al.* (1993)

cytosolique d'Angiospermes. La séquence en acides aminés de la GS chloroplastique de *Nicotiana plumbaginifolia* est homologue à 76% avec la GS_2 de *Pisum sativum* (Tingey et Coruzzi, 1987), et à 88% avec celle de la GS1 (Gebhardt *et al.*, 1986).

L'expression spécifique des isoformes dans les organes sous entend un rôle précis dans le métabolisme azoté. L'expression du gène GS3A prouve qu'il peut y avoir synthèse de glutamine *in situ* dans les cellules du phloème. De plus, l'utilisation du promoteur β-glucuronidase et des études d'immunolocalisation ont confirmé l'absence d'expression des gènes de la GS_1 cytosolique dans les cellules du mésophylle (Forde *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 1992). Le fait de trouver chez des plants transgéniques de Tabac, l'isoforme cytosolique et chloroplastique du Pois exprimées dans des types de cellule bien différents, suggére qu'il n'y a pas de superposition possible du rôle de chaque GS dans l'assimilation azotée (Edwards *et al.*, 1990; McGrath et Coruzzi, 1991). Ceci expliquerait pourquoi l'isoforme GS_1 ne peut compenser la perte de l'isoforme GS_2 chez les mutants de l'Orge en condition de photorespiration active (Wallsgrove te al., 1987). Cependant, dans les feuilles de plantes où l'activité GS cytosolique n'est pas détectée, on trouve généralement des traces d'ARNm de cette isoforme (Hirel *et al.*, 1987; Tingey *et al.*, 1987), mais ces ARNs ne permettent pas *in vivo* d'obtenir une enzyme fonctionnelle (Hirel *et al.*, 1992). Cependant, la surexpression d'une activité GS cytosolique dans les feuilles de Tabac, où cette enzyme n'est normalement pas présente, altère le métabolisme azoté et donne lieu à l'induction d'un(ou des) gène(s) natif(s) pour une GS cytosolique dans ces feuilles (Hirel *et al.*, 1992). Cette expérience montre la possibilité d'un contrôle métabolique de l'expression de gène(s) codant pour la GS. Le contrôle métabolique de l'expresssion d'un gène par de petites molécules organiques ou inorganiques a été démontré dans plusieurs cas (Back *et al.*, 1991; Kozaki *et al.*, 1991; Mia *et al.*, 1990; Sheen, 1990).

L'**expression de la famille de gène** codant pour la GS peut donc être **régulée** par des **contrôles métaboliques** mais aussi par des **facteurs de croissance** (à la fois dans le temps et dans l'espace) (Tingey *et al.*, 1987, 1988; Walker et Coruzzi, 1989; Edwards *et al.*, 1990; Peterman et Goodman, 1991). Ainsi chez le Riz, la GS_1, par rapport à la GS_2, est l'isoforme la plus répandue dans les feuilles les plus agées et diminue graduellement dans les stades foliaires plus jeunes (Yamaya *et al.*, 1992). La spécificité des tissus (ou organes), comme l'a démontré le rôle défini pour les différentes isoformes de la GS, excerce donc un contrôle très important sur l'expression de cette enzyme (Tableau 1.7). En effet, l'expression du gène GLN1 est surtout localisée dans les racines et peu dans les feuilles d'*A. thaliana* (Peterman et Goodman, 1991). De plus, Bernhard et Matile (1994) ont montré que lorsque l'on induit la sénescence chez des feuilles d'*A.thaliana* cela entraine la disparition des ARNm de la GS plastidiale qui est très exprimée dans les jeunes feuilles.

La **lumière** est un autre facteur qui peut influencer l'expression des gènes de la GS (Tableau 1.7). Chez les Angiospermes, un contrôle par le phytochrome sur l'expression de gène codant pour des protéines chloroplastiques, comme la GS_2, a été démontré (Tobin et Silverthorne, 1985; Tingey *et al.*, 1988; Edwards et Coruzzi, 1989). Chez les Gymnospermes, ce type de contrôle

varie d'une espèce à l'autre: il donne lieu soit à des plantes insensibles comme *Pinus pinaster* (Cánovas *et al.*, 1991), soit à des végétaux montrant un photo-contrôle identique à celui des Angiospermes comme c'est le cas chez *Pinus sylvestris* (Elminger et Mohr, 1994, 1992, 1991; Fernbach et Mohr, 1990). En effet, chez *P. sylvestris*, l'expression des gènes de la GS est régulée au niveau transcriptionnel par le phytochrome (Elmlinger *et al.*, 1994). Récemment, il a même été démontré chez une cyanobactérie que la transcrition d'un gène de la GS (*glnA*) était sous l'influence du transport d'électrons (Reyes et Florencio, 1995).

Un autre facteur environnemental qui exerce une influence au niveau de l'expression des gènes de la GS est **la source d'azote** (Tableau 1.7). Dans les nodules du Soja, le gène codant pour l'isoforme cytosolique est induit par la présence d'ammonium en solution nutritive (Hirel *et al.*, 1987). Chez le Maïs, les 5 gènes de la GS1 ne sont pas influencés de la même façon par la source azotée. Un seul gène (GS_{1-4}) est faiblement régulé par la source azotée au niveau racinaire, un autre (GS_{1-3}) y est complétement insensible, et deux (GS_{1-1} et GS_{1-2}) présentent des variations en fonction de la présence d'ammonium ou de nitrate, mais il s'agit plus d'une réponse de type spécificité des organes que d'un réel effet de l'azote (Sukanya *et al.*, 1994). Les ARNm de l'isoforme chloroplatique du Maïs s'accumulent rapidement et de façon transitoire en réponse à une exposition en nitrate des racines, mais pas en réponse à la présence d'ammonium (Redinbaugh et Campbell, 1993).

1.2.2.2.2.2. LA GLUTAMATE SYNTHASE (GOGAT)

Chez les plantes supérieures, il existe **deux isoformes de la GOGAT** (Suzuki et Gadal, 1984), l'une utilise la **ferrédoxine** comme donneur d'électrons (EC 1.4.7.1) et l'autre le **NADH** (EC 1.4.1.14). Chez les bactéries, on a mis en évidence une troisième isoforme (EC 1.4.1.13) qui utilise le NADPH comme donneur d'électrons (Suzuki et Gadal, 1984; Oliver *et al.*, 1987; Lea *et al.*, 1992) mais il y a peu de données quant à un rôle possible de cette isoforme chez les végétaux. Cependant, on a trouvé **une GOGAT à NADPH** dans les plastes et le cytosol de cellules racinaires de *Pisum arvense* (Kubik-Dobosz, 1989), mais pour le moment cette isoforme à NADPH n'a pas été encore purifiée. Par contre, quelques travaux ont montré que l'isoforme de la GOGAT à NADH peut en fait utiliser à la fois le NADH ou le NADPH comme cofacteur (Beevers et Storey, 1976; Chin et Shargool, 1979) et notamment dans les nodules de légumes (Chen et Cullimore, 1988). La distinction entre la GOGAT à NADH et la GOGAT à NADPH n'est pas encore très claire chez les végétaux supérieurs.

Propriétés physico-chimiques

Tableau 1.8 : Principales propriétés physico-chimiques de la GOGAT de quelques espèces végétales.

Espèces	Propriétés physico-chimiques							Références
	MM (kDa)	pH	Km (µM)					
			Gln	2-oxo	Fd	NADH	NADPH	
Fd-GOGAT								
Chlamydomonas reinhardii	146,5	7,5	700	1000	15	-------	-------	Galvan *et al.* (1984)
Chylamydomonas	-------	-------	190	170	0,01	-------	-------	Cullimore et Sims (1981)
Oryza sativa	227	-------	270	330	5,5	-------	-------	Suzuki et Gadal (1982)
Lycopersicon esculentum	141	7,8	-------	-------	------	-------	-------	Avilla *et al.* (1987)
Vicia faba	-------	-------	330	150	2	-------	-------	Wallsgrove (1977)
Zea mays	-------	-------	1100	240	1700	-------	-------	Matoh *et al.* (979)
NADH-GOGAT								
Lycopersicon esculentum	158	7,3	-------	-------	------	1,7	6,0	Avilla *et al.* (1987)
Alfalfa (nodules racinaires)	235	-------	446	33	------	4,2	-------	Anderson *et al.* (1989)

Chez les plantes, la GOGAT ferrédoxine dépendante et celle à NADH sont deux protéines bien distinctes. Ainsi, des anticorps anti-GOGAT à NADH purifiés à partir de culture cellulaire du Riz (Hayakawa *et al.*, 1982) ne reconnaissent pas la GOGAT ferrédoxine dépendante purifiée chez les feuilles du Riz (Hayakawa *et al.*, 1992), mais bien la GOGAT à NADH (Yamaya *et al.*, 1992; Hayakawa *et al.*, 1994). Inversement, les anticorps anti-GOGAT Fd dépendante ne réagissent pas avec la GOGAT à NADH (Suzuki *et al.*, 1982; Hayakawa *et al.*, 1992). On retrouve aussi cette différence au niveau de leurs propriétés physico-chimiques (Tableau 1.8).

La **Fd-GOGAT** a été purifiée à partir de feuilles de Haricot (Wallsgrove *et al.*, 1977), de Maïs (Matoh *et al.*, 1979), de Riz (Suzuki et Gadal, 1984; Hayakawa *et al.*, 1992), d'Orge (Marques *et al.*, 1988), de Tabac (Zehnacker *et al.*, 1992) et plus récemment chez le Pin (Garcia-Gutiérrez *et al.*, 1995a). Chez les Angiospermes, cette isoforme de la glutamate synthase est une **protéine monomérique** d'environ 160-180 kDa (Matoh *et al.*, 1979; Marques *et al.*, 1988). Chez le Pin, la Fd-GOGAT présente aussi une structure monomérique d'environ 165 kDa (Garcia-Gutiérrez *et al.*, 1995b). De plus, des travaux réalisés sur *Chlamydomonas* (Galvan *et al.*, 1984) et l'Orge (Marquez *et al.*, 1988) ont montré qu'il s'agissait d'une **flavoprotéine** et qu'elle peut représenter jusqu'à 7% de la totalité des protéines d'une feuille de Riz (Yamaya *et al.*, 1992).

La **GOGAT à NADH** a été purifiée chez le Pois (Matoh *et al.*, 1980), la Tomate (Avila *et al.*, 1984) et surtout dans des nodules racinaires (Boland et Benny, 1977; Chen et Cullimore, 1988;Anderson *et al.*, 1989). Cette enzyme présente un poids moléculaire situé entre 158 et 240 kDa (Lea *et al.*, 1990 et Tableau 1.8). Chez les nodules d'Alfalfa, l'enzyme native est un **monomère** et possède des sous-unités de poids moléculaire les plus élevées avec 200 kDa (Anderson *et al.*, 1989). L'affinité de cette isoforme pour la glutamine est légèrement plus faible (Km entre 400-900 µM) que celle observée pour la Fd-GOGAT (Marques *et al.*, 1984; Anderson *et al.*, 1989; Chen et Cullimore 1989). Par contre, l'affinité observée pour le NADH est très élevée (Km de 1,7 à 9,0 µM). Chez les feuilles de tomate, Avilla *et al.* (1987) ont montré que le Km de cette isoforme pour le NADPH est environ 3,5 fois plus grand que celui pour le NADH (Tableau 1.8). Une des hypothèses retenue est que l'activité NADPH-GOGAT est en fait due à la conversion du NADPH en NADH par une activité phosphorylase.

Répartition feuilles-racines

Dans les parties "vertes", la **Fd-GOGAT** est la forme dominante de la glutamate synthase (Lea *et al.*, 1992; 1990). Cette isoforme a même été localisée dans le **chloroplaste** (Beckert *et al.*, 1993; Bottela *et al.*, 1988). La glutamate synthase ferrédoxine dépendante a aussi été mise en évidence dans les **tissus racinaires** (Suzuki et Gadal, 1984; Oaks et Hirel, 1985) et même dans les fruits (Gallardo *et al.*, 1993).

La **GOGAT à NADH** est plus abondante dans les tissus immatures **non photosynthétiques** (Matoh et Takahaschi, 1982; Lam *et al.*, 1995). Ainsi, chez des jeunes feuilles de Riz pas encore toutes à fait vertes, la NADH-GOGAT a été trouvée en grande quantité (jusqu'à 50% de la totalité des protéines de la feuille) alors que pour des feuilles étalées vertes, cette isoforme ne représente plus que 4% de la totalité des protéines (Yamaya *et al.*, 1992). Cette isoforme a aussi été mise en évidence dans des tissus non verts tels que des **racines** (Matoh et Takahaschi, 1982; Suzuki *et al.*, 1982; Oaks et Hirel, 1985; Anderson *et al.*, 1989; Kubik-Dobosz, 1989; Yamaya *et al.*, 1992; Hayakawa *et al.*, 1993, 1992), des graines (Sing et Srivastava, 1986; Hayakawa *et al.*, 1994) et des cultures cellulaires (Suzuki *et al.*, 1984; Jain et Shargool, 1987; Hayakawa *et al.*, 1992).

Régulation

L'azote contenu dans le milieu extérieur s'est avéré avoir une influence sur l'expression de la glutamate synthase ferrédoxine dépendante chez certains végétaux supérieurs. Ainsi, l'activité Fd-GOGAT est légèrement stimulée par l'ajout de **nitrate** ou d'**ammonium** dans le milieu externe (Sugiharto et Sugiyama, 1991; Santos et Sulema, 1992). Mais l'ajout de nitrate au niveau des racines de Maïs n' a pas d'effet sur la Fd-GOGAT (Sakakibara *et al.*, 1992). Par contre, sur ces mêmes plants de Maïs, la Fd-GOGAT foliaire est très stimulée par le nitrate ajouté (Sakakibara *et al.*, 1992). Chez le Pin, l'isoforme ferrédoxine dépendante est peu affectée par la nutrition azotée (Garcia-Gutiérrez *et al.*, 1995). Il semblerait que la régulation de l'expression de cette enzyme est, chez ce végétal, plutôt due à une spécificité de l'organe (Garcia-Gutiérrez *et al.*, 1995). De plus, Bowsher *et al.* (1992) ont montré que le pouvoir réducteur nécessaire à la GOGAT peut être fourni par la voie oxydative des pentoses phosphates dans des tissus non photosynthétiques.
L'activité de la Fd-GOGAT augmente après que les plantes soient exposées à la **lumière** (Hecht *et al.*, 1988; Sakakibara *et al.*, 1992). Lors des stades précoces de croissance du Pin, la lumière n'a pas d'effet sur l'expression de l'activité ou des ARNm de la Fd-GOGAT (Garcia-Gutiérrez *et al.*, 1995). De la même façon, la GOGAT à NAD(P)H, localisée dans les tissus non photosynthétiques, n'est pas influencée par la lumière (Oaks et Hirel, 1985; Hayakawa *et al.*, 1992).

Aspect génomique

Somerville et Ogren (1980) ont rapporté chez *Arabidopsis* le premier isolement de mutant déficient en glutamate synthase ferrédoxine dépendante chloroplastique. D'autres **mutants déficients en Fd-GOGAT** ont été isolés chez l'Orge (Kendal *et al.*, 1986; Blackwell *et al.*, 1988b, 1987) , le Pois (Blackwell *et al.*, 1987), et surtout *Arabidopsis* (Somerville 1984, 1982; Artus *et al.*, 1988; Morris *et al.*, 1989, 1988). Dans les feuilles d'*Arabidopsis* sauvages, la

glutamate synthase ferrédoxine dépendante représente environ 95% de l'activité GOGAT totale; les 5% restants sont attribués à la NADH-GOGAT (Somerville et Ogren, 1980). Par contre, chez les mutants d'*Arabidopsis*, l'activité Fd-GOGAT n'est plus détectable alors que le taux faible de NADH-GOGAT reste inchangé (Somerville et Ogren, 1980). En condition de croissance à forte teneur en CO_2, les mutants se développent normalement, mais ils meurent si ils sont replacés en atmosphère normale. Ceci suggère que la **Fd-GOGAT** joue surtout un **rôle** dans la réassimilation de l'**ammonium** issu de la **photorespiration**, et que la faible quantité de NADH-GOGAT est suffisante pour assurer le processus d'assimilation de l'azote en condition forcée de photorespiration (Somerville et Ogren, 1980; Lea *et al.*, 1990; Lam *et al.*, 1995).
L'ADNc de la Fd-GOGAT a été cloné chez de nombreuses espèces végétales (Tableau 1.9).

Tableau 1.9 : Espèces dont le (ou les) gène(s) de la glutamate synthase ont été caractérisé(s).

Plantes	Clones	Références
Fd-GOGAT		
Hordeum vulgare	ADNc	Avila *et al.* 1993
Zea mays	ADNc	Sakakibara *et al.* 1991
Nicotiana	ADNc	Zehnacker *et al.* 1992
Pinus sylvestris	ADNc	Garcia-Gutiérez *et al.* 1995
Spinacia	ADNc	Nalbantoglu *et al.* 1994
Arabidopsis thaliana	ADNc (2 gènes)	Coschigano et Coruzzi (non publiés)
NADH-GOGAT		
Arabidopsis thaliana	ADNc	Lam et Coruzzi (non publiés)
Alfalfa	ADNc	Gregerson *et al.* 1993 Vance *et al.* 1995
NADPH-GOGAT		
E. Coli	ADNc	Oliver *et al.* 1987

Les ADNc obtenus dans le cas de la NADH- et Fd-GOGAT d'*Arabidopsis* thaliana n'ont pas été publiés mais leur existence est citée dans l'article de Lam *et al.* (1995).

Pour le Maïs, l'Orge, le Tabac, l'Épinard et le Pin, un seul ADNc a été isolé dans chaque cas, suggérant que cette enzyme est régulée par un seul gène. Ainsi l'ADNc de la Fd-GOGAT de l'Orge et du Maïs présente une homologie de séquence de 87% (Avila *et al.*, 1993); celle du Pin et du Maïs présente 83% d'homologie (Garcia-Gutiérrez *et al.*, 1995). La séquence de la Fd-GOGAT semble être **très conservée** chez les plantes que ce soit entre des espèces mono ou dicotylédones (Avila *et al.*, 1993) ou même entre des Angiospermes et des Gymnospermes

(Garcia-Gutiérrez *et al.*, 1995). Cependant, chez *Arabidopsis*, des travaux récents ont isolé deux ADNc distincts, indiquant ainsi l'existence de deux gènes (GLU1 et GLU2) fonctionnels pour la Fd-GOGAT (cités dans Lam *et al.*, 1995). L'un de ces gènes (GLU1) est très exprimé dans les feuilles, l'autre gène (GLU2) est surtout exprimé dans les racines (Lam *et al.*, 1995).

Un seul ADNc de l'isoforme possible à NADPH a été isolé mais chez *E. Coli* (Oliver *et al.*, 1987). Par contre chez *Phaseolus vulgaris*, l'existence de deux NADH-GOGAT, différentes par leur pH optimum, a été démontrée (Chen et Cullimore, 1989). Bien que toutes deux localisées dans les plastes de nodules racinaires (Chen et Cullimore, 1989), elles présentent des sites antigéniques distincts suggérant qu'elles pourraient être codées par au moins deux gènes (McGrath et Coruzzi, 1991). Mais un seul ADNc a été cloné jusqu'à présent pour la NADH-GOGAT d'Alfalfa (Gregerson *et al.*, 1993; Vance *et al.*, 1995) et d'*Arabidopsis* (Lam et Coruzzi, cité dans Lam *et al.*, 1995).

1.2.2.3. Redistribution de l'azote incorporé

L'azote incorporé dans la glutamine par la glutamine synthétase et dans le glutamate par la glutamate déshydrogénase et la glutamate synthase peut être redistribué dans d'autres acides aminés, essentiellement par l'action des transaminases ou aminotransférases.

Le glutamate est le substrat de nombreuses aminotransférases (Fig. 1.15) dont l'**aspartate aminotransférase** [EC 2.6.1.1., AAT] et l'**alanine aminotransférase** [EC 2.6.1.2., AlAT].

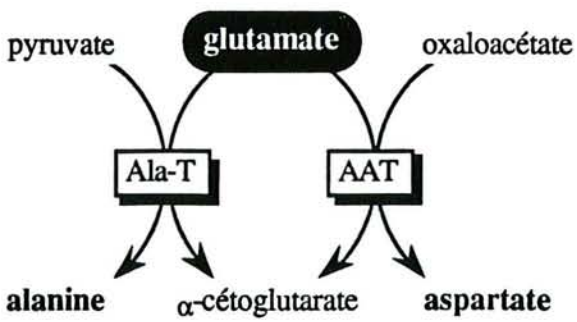


Figure 1.15 : Schéma réactionnel de l'AAT et de l'Ala-T

La localisation intracellulaire et tissulaire, la régulation et les caractéristiques de ces aminotransférases sont bien connues chez les plantes herbacées et chez les microorganismes (Cozzani *et al.*, 1974; Givan, 1980; Oaks et Hirel, 1985). Ces enzymes contribuent à la synthèse d'acides aminés essentiels tels que l'**aspartate** et l'**alanine**. Ainsi, l'alanine est aussi une forme

d'incorporation majeure de l'ammonium exogène dans les racines de Hêtre (Ben Driss, 1988) et de Pin (Krupa *et al.*, 1973; Krupa et Branström, 1974).
L'aspartate et l'alanine peuvent être, à leur tour, à l'origine de la synthèse d'autres acides aminés tels que le γ-aminobutyrate (Gaba). Le métabolisme du Gaba constitue aussi une voie alternative liant le glutamate au cycle de Krebs, plus connue sous le nom de shunt du Gaba (Kishinami et Ojima, 1980). En effet, le succinate semialdéhyde peut être converti en succinate qui intègre le cycle de Krebs.

L'AAT est considérée comme la plus importante des aminotransférases chez les plantes supérieures (Givan, 1980; Ireland et Joy, 1985). L'activité AAT a été trouvée dans les graines, les nodules , les racines et les feuilles (Sukalovic, 1986; Farnham *et al.*, 1990; McGrath et Coruzzi, 1991). Chez le Pois, des études biochimiques et génétiques ont démontré qu'il existait au moins **trois isoformes distinctes de l'AAT**; une se trouvant dans le **chloroplaste**, l'autre dans le **cytosol** et une **mitochondriale** (Weeden et Marx, 1987). Des isoenzymes de l'AAT ont aussi été détectées dans les péroxisomes et/ou dans les glyoxysomes du Maïs et de l'Épinard (Scandalios *et al.*, 1975; Huang *et al.*, 1976; Liu et Huang, 1977). Bien que l'AAT joue un rôle dans les réactions de transaminations dans chacun de ses compartiments, la question du rôle physiologique exacte de chacune de ces isoenzymes reste posée.
Les gènes de l'AAT ont été clonés chez plusieurs espèces végétales telles que l'Alfalfa, le Panicum, le Soja, la Carotte et le Lupin (Gantt *et al.*, 1992; Taniguchi *et al.*, 1992; Turano *et al.*, 1992; Wardsworth *et al.*, 1993; Mett *et al.*, 1994). Bien que un ou deux gènes aient été clonés pour chacunes de ces espèces, **cinq gènes différents** ont été clonés chez *Arabidopsis* (Schlutz et Coruzzi, 1995; Wilkie *et al.*, 1995). ASP1 code pour une forme mitochondriale d'AAT, ASP3 pour une forme peroxisomale ou plastidiale, ASP4 et ASP2 codent chacun pour une forme cytosolique d'AAT (Schlutz et Coruzzi, 1995). Un autre gène AAT1 code pour une forme chloroplastique (Wilkie *et al.*, 1995). Les gènes ASP1 et ASP3 sont exprimés à des taux similaires dans la plupart des tissus examinés, alors que le gène ASP2, codant pour une forme cytosolique d'AAT, est exprimé en grande quantité dans les racines (Schlutz et Coruzzi, 1995).
Afin de déterminer le rôle de chacune des isoformes de l'AAT, des **mutants déficients** en isoenzymes AAT ont été isolés, notamment chez *Arabidopsis* (Schultz, 1994). Quatres types de mutants AAT ont été identifiés: deux classes ayant perdu soit l'activité de l'**AAT cytosolique** soit celle de l'**AAT chloroplastique** (Schultz, 1994; Lam *et al.*, 1995); deux autres présentant une altération de la mobilité sur gel de ces isoformes cytosoliques ou chloroplastiques (Schultz , 1994). Des études réalisées avec ces mutants déficients en l'isoforme cytosolique ou chloroplastique devraient permettre de mieux comprendre le rôle de chaque AAT dans le métabolisme de l'aspartate.

L'**Ala-T** est aussi connue comme la glutamate pyruvate transaminase et est distribuée dans la plupart des tissus d'une plante (Bryan, 1990). En effet, on en trouve dans les jeunes pousses, les racinaires primaires et surtout dans les cotylédons du Pin sylvestre (Otter *et al.*, 1992). Cette enzyme joue aussi un rôle clé dans les aminotransférases car elle permet la synthèse de L-alanine

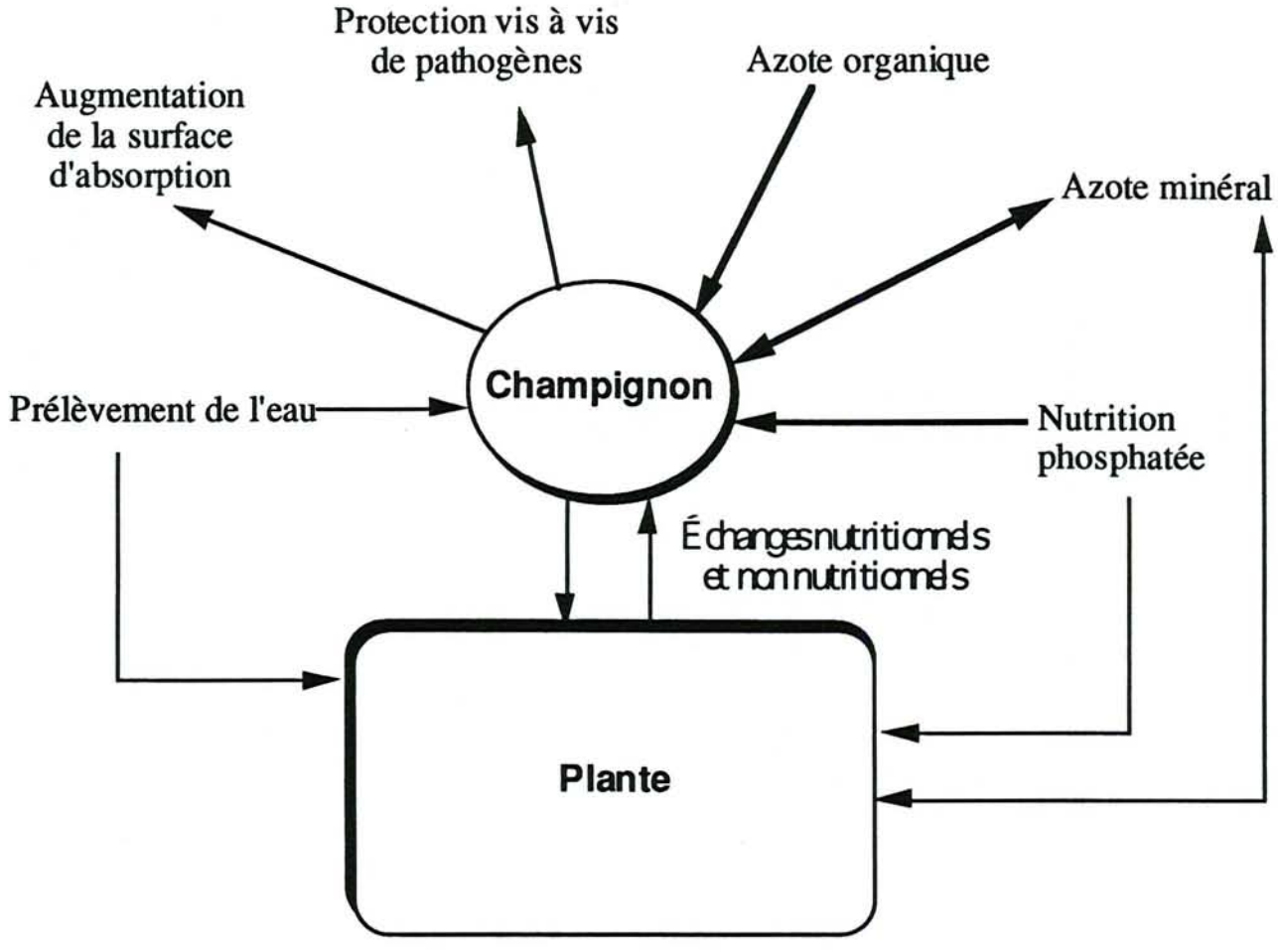


Figure 1.16 : Divers rôles du partenaire fongique lors de la mycorhization.

qui va servir non seulement à la synthèse protéique mais aussi comme donneur de fonction amine pour d'autres acides aminés (Ta et Joy, 1986) et pour le métabolisme secondaire (Wink et Hartmann, 1981). L'Ala-T est aussi **impliquée** dans la **photorespiration** où une grande quantité d'ammonium est relarguée et réassimilée (Givan *et al.*, 1988). Les isoformes de l'Ala-T ont été trouvées chez de nombreux végétaux. Une **isoforme dans les péroxisomes** a été révélée comme dominante dans les tissus chlorophylliens, et une autre isoforme attribuée au **cytosol et/ou** à la **mitochondrie** (Noguchi et Hayashi, 1981; Biekmann et Feierabend, 1982; Noguchi et Fujiwara, 1982; Bryan, 1990; Penther, 1991). Chez de nombreuses espèces végétales, la **lumière** peut augmenter l'activité Ala-T mesurée (Heddley et Stoddart, 1972; Biekmann et Feierabend, 1982; Lillo, 1984; Appenroth *et al.*, 1986; Abou-Zeid *et al.*, 1991; Penther, 1991). Chez la Moutarde, Pender (1991) a ainsi démontré que l'activité de deux isoformes péroxisomales était fortement stimulée par l'action du **phytochrome**, alors que l'isoforme cytosolique était indépendante vis à vis de la lumière. Chez le Pin sylvestre, Otter *et al.* (1992) ont également démontré que l'accumulation de l'isoforme AlAT 1, dominante dans les cotylédons, développée à la lumière et absente des racines primaires, était fortement stimulée par la lumière, et que le phytochrome était impliqué dans cet effet; alors que l'isoforme AlAT 2, présente dans les racines primaires et les cotylédons développés à l'obscurité, n'est pas affectée par la lumière. La présence de nitrate ou d'ammonium n'a pas d'effet sur l'activité totale Ala-T dans les cotylédons, mais l'ion NH_4^+ influence l'accumulation de l'Ala-T dans les racines primaires (Otter *et al.*, 1992).

2. MYCORHIZATION : IMPORTANCE POUR LES PLANTES

2.1. Généralités

Les **effets** de la mycorhization pour la plante peuvent être **d'ordre nutritonnels** ou non (Chalot *et al.*, 1988; Harley, 1991). Parmi les **effets non nutritionnels** (Figure 1.16), nous rappelerons le rôle de protection des mycorhizes vis à vis des pathogènes (Trappe, 1977, Sinclair *et al.*, 1982), l'effet stimulant sur la synthèse de certains composés (phytohormones) (Chalot *et al.*, 1988), et une certaine tolérance aux métaux lourds (Bradley *et al.*, 1981; Weissenhorn *et al.*, 1995). En ce qui concerne les effets favorables sur la croissance des plantes-hôtes (Figure 1.16), nous rappelerons que la présence du partenaire fongique entraîne une augmentation de la surface d'absorption, du prélèvement de l'eau, du phosphore et surtout de l'azote (Le Tacon 1985; Chalot *et al.*, 1988). Nous nous contenterons surtout de développer l'effet de la mycorhization au niveau de tissus symbiotiques du type ectomycorhize. En effet, les **ectomycorhizes** représentent la principale forme de mycorhize rencontrée dans nos forêts. Les plantes-hôtes associées appartiennent soit à la famille des Gymnospermes comme le Pin, le Sapin, le Mélèze ou l'Épicéa, soit à la famille des Angiospermes comme le Hêtre, le Chêne ou le Bouleau. Les espèces

fongiques associées sont le plus souvent des Ascomycètes comme les Truffes, ou des Basidiomycètes comme les Bolets ou les Lactaires. Différents types d'ectomycorhizes existent de par leurs diversités morphologiques.

Cependant, les ectomycorhizes sont toutes caractérisées par l'existence d'un manchon mycélien qui entoure les racines latérales. De ce manchon fongique partent des hyphes qui peuvent être soit extramatricielles et explorer le milieu environnant par l'intermédiaire d'hyphes individuelles et/ou par des structures végétatives agrégées (rhizomorphes, cordons mycéliens), soit entourant les cellules racinaires formant ainsi le réseau de Hartig. La pénétration entre les cellules du rhizoderme et du cortex racinaire s'effectue uniquement par voie intercellulaire. Une fois la symbiose établie, le **réseau de Hartig** va être le lieu d'échanges bidirectionnels entre les deux partenaires :

– la **plante exporte** 10 à 20% des photosynthétats vers le champignon pour la formation, la maintenance et le fonctionnement des structures mycorhiziennes (Rygiewick et Andresen, 1994). Les substances organiques, essentiellement carbonées (saccharose, glucose), provenant de la plante-hôte, sont stockées dans le manteau fongique principalement sous forme de tréhalose, glycogène et mannitol (Martin *et al.*, 1987; Hampp et Schaeffer, 1995). Ces glucides ne sont pas catalysés par le partenaire végétal.

– le **champignon améliore** la nutrition minérale de la plante-hôte. Les plantes ainsi mycorhizées ont généralement de plus forte teneur en éléments minéraux (azote, phosphore, potassium, zinc). L'effet produit sur la croissance des arbres est comparable à une fertilisation (Villeneuve *et al.*, 1991; Le Tacon *et al.*, 1988, 1992). Cet effet favorable à la croissance peut s'expliquer par le fait que les partenaires fongiques ectomycorhiziens augmentent de façon importante le volume de sol prospecté par les racines du végétal grâce à leurs filaments végétatifs extraradiculaires. Le développement important et continu des hyphes du champignon (100 m de mycélium/m de racine) permet de dépasser la zone de prélèvement entourant les racines (Rousseau *et al.*, 1994). De plus, les hyphes des champignons mycorhziens s'agrègent souvent en cordons mycéliens et rhizomorphes (Agerer, 1991). En ce qui concerne les hyphes individuelles, leur contribution à l'absorption peut s'expliquer par leur faible diamètre (de 2 à 4 µm) qui leur permettrait de s'introduire dans les pores de sol trop étroits pour les poils absorbants des racines (de 15 à 50 µm) (Harley et Smith, 1983).

2.2. Importance de la mycorhization dans la nutrition azotée de la plante

Les nombreux bénéfices résultants de l'infection ectomycorhizienne furent longtemps attribués à la nutrition phosphatée des plantes (Melin et Nilsson, 1950; Strullu *et al.*, 1985; Mousain, 1989; Strullu, 1991). Or, les champignons ectomycorhiziens jouent un rôle essentiel dans la nutrition azotée de la plante-hôte, en permettant une meilleure utilisation du stock d'azote

disponible dans les sols (Melin et nilson, 1953; Finlay *et al.*, 1989; Plassard *et al.*, 1991; Marschner et Dell, 1994). Tout d'abord, les champignons ectomycorhiziens sont capables de **prélever des formes d'azote mal utilisées** par les végétaux supérieurs comme les acides aminés et les composés organiques solubles (peptides). Et puis, ils augmentent aussi la quantité d'azote minéral absorbé par le système racinaire.

2.2.1. Effet de l'azote sur la mycorhization

Meyer (1985) avait observé une réduction très nette du développement d'ectomycorhizes dans des pots fertilisés en azote. Des expériences, réalisées en pot sur l'association Chêne rouge et *Pisolithus tinctorius*, ont montré que l'abondance des **ectomycorhizes formées** était **dépendante** des éléments nutritifs, dont l'**azote**, présents dans le milieu de croissance (Ruehle, 1980). Cependant , Ingestad *et al.* (1986) n'ont pas trouvé d'effet d'une nutrition optimale de croissance sur la mycorhization du Pin sylvestre, alors que des taux élevés de substances nutritives s'étaient avérées comme limitant la colonisation par des microorganismes symbiotiques (Stribley et Read, 1976; Marx *et al.*, 1977). La fertilisation azotée de certaines parcelles forestières a donné lieu à une augmentation du rapport racines non mycorhizées/racines mycorhizées, mais sans effet sur la diversité des ectomycorhizes rencontrées (Haug *et al.*, 1992). Lors de traitement à forte concentration en ion ammonium, le sapin ne présente pas de différence significative du nombre d'ectomycorhizes formées, mais les structures symbiotiques, notamment le réseau de Hartig, sont altérés (Brunner et Scheidegger, 1994). Les éléments nutritifs, dont l'azote, présents dans le sol, s'avèrent donc comme un facteur potentiel de la mycorhization. L'effet est sans doute plus net à l'échelle des modèles de laboratoire puisque les mycorhizations réalisées le sont dans des conditions de croissance restreintes. Hutchison et Piché (1994) ont ainsi pu mettre en évidence un effet du glucose sur l'obtention de mycorhizes *in vitro*.

2.2.2. Effet de la mycorhization sur le prélèvement de l'azote

2.2.2.1. Azote organique

L'**azote organique** est la forme d'azote prédominante dans la plupart des sols des forêts tempérées (Aguilera *et al.*, 1993) et les microorganismes sont capables d'incorporer directement des composés organiques azotés de faible poids moléculaire et des acides aminés (Hadas *et al.*, 1992).

Les micro-organismes vivant dans ces sols sont capables d'utiliser efficacement cet azote, les trois groupes les plus importants étant les bactéries, les Actinomycètes et les champignons. Si les bactéries représentent le groupe numériquement le plus important, les champignons, en terme de biomasse, sont dominants dans les sols forestiers acides car ils tolèrent des pHs plus faibles que les bactéries. Les valeurs de pH optimum de prélèvement du glutamate et de la glutamine sont

entre 3,8 et 4,5 pour *Paxillus involutus* (Chalot *et al.*, 1995). Ces valeurs de pH se situent dans la fourchette de pH généralement trouvées dans les sols forestiers (Aguilera *et al.*, 1993).

De nombreuses souches ectomycorhiziennes sont capables de croître sur des milieux contenant des **acides aminés** comme seule source d'azote et en particulier, le glutamate et **l'arginine** (Laiho, 1970). La **glutamine, le glutamate, l'aspartate et l'alanine** sont les acides aminés libres les plus importants dans le sol; leur concentration varie de 1 à 10 $\mu g.g^{-1}$ de sol sec (Abaurghub et Read, 1988). Ainsi, des études réalisées sur *Paxillus involutus* ont démontré la capacité de ce champignon ectomycorhizien à utiliser les acides aminés comme source d'azote (Finlay *et al.*, 1992; Chalot *et al.*, 1995, 1994a, 1994b). Récemment, un transporteur de ces acides aminés a été étudié chez ce champignon ectomycorhizien (Chalot *et al.*, 1996). Certains de ces champignons ectomycorhiziens, lorsqu'ils sont cultivés *in vitro,* ont aussi la capacité d'utiliser les sources d'azote organiques (peptide ou protéine) (Abuzinadah et Read, 1988, 1986a; Finlay *et al.*, 1992) en produisant des enzymes capables d'hydrolyser ces polymères. L'excrétion de **protéases** a été mise en évidence chez des éricoïdes (Leake et Read, 1991, 1990) et chez diverses souches ectomycorhiziennes (El-Badaoui et Botton, 1989) dont *Pisolithus tinctorius* (Ramstedt et Söderall, 1983), *Cenococcum geophilum* et *Lactarius subdulcis* (Botton *et al.*, 1985).

Ainsi, quelques espèces forestières mycorhizées telles que le Pin, le Bouleau, le Sapin peuvent accéder à des sources d'azote organique, ce qui résulte directement de la présence du partenaire fongique (Abuzinadah *et al.*, 1986; Abuzinadah et Read, 1986b). En **absence de mycorhization**, ces espèces ligneuses sont **incapables** d'utiliser l'**azote protéique**. Chez le Pin, des expériences réalisées en présence de BSA ont clairement montré qu'en absence de mycorhization, cet arbre était incapable d'utiliser les protéines comme source d'azote (Finlay *et al.*, 1992).

2.2.2.2. Azote minéral

La présence du partenaire fongique sur les racines de quelques espèces de conifères **améliore** significativement **l'absorption de l'ion ammonium** (Rygiewicz *et al.*, 1984a; Plassard *et al.*, 1991). En effet, la vitesse maximale d'aborption de l'ammonium chez le Douglas et le Sapin double dans des racines mycorhizées (Rygiewicz *et al.*, 1984a). Cependant, le pH doit être maintenu à une valeur constante en raison de l'acidification du milieu de culture due à une extrusion de protons par les racines (Rygiewicz *et al.*, 1984a, 1984b). En présence de nitrate, l'effet de la mycorhization varie selon l'espèce ligneuse (Carrodus, 1967; Rygiewicz *et al.*, 1984b; Scheromm et Plassard, 1988). Ainsi, seule la vitesse maximale d'absorption du nitrate du Douglas semble légèrement augmentée (Rygiewicz *et al.*, 1984b). Chez le Pin maritime, 80 à 90% du nitrate absorbé sont réduits dans les racines non-mycorhizées (Scheromm et Plassard, 1988). De plus, chez cette espèce ligneuse, la mycorhization n'affecte ni l'accumulation du nitrate, ni les capacités d'absorption de cet anion, seul le transfert phloémique d'azote réduit est affecté puisque

Tableau 1.10 : Changement de distribution et d'activités des enzymes de l'assimilationde l'azote sur divers modèles mycorhiziens.

Associations mycorhiziennes	Enzymes étudiées				Techniques employées	Références
	GS	GDH à NADP	GDH à NAD	AAT		
Douglas / *Lac. laccata*	Racinaire et Fongique	Fongique	Racinaire	Racinaire	Profils électrophorétiques Immunolocalisation Immunoprécipitation Western-blott	Bedell et al. (1994) Brun et al. (1994) Brun (1992)
Eucalyptus / *Lac. laccata*	-------	Racinaire	Racinaire	Racinaire	Profils électrophorétiques	Botton et Dell (1994)
Eucalyptus / *Heb. westraliense*	-------	Fongique	Racinaire	-------	Profils électrophorétiques	Botton et Dell (1994)
Épicéa / *Hebeloma* sp.	Racinaire et fongique	Fongique	Fongique	Racinaire	Profils électrophorétiques Immunoprécipitation Localisation histochimique Immunocytochimie	Dell et al. (1989); Chalot et al. (1990) Dell et al. (1989) Dell et al. (1989) Chalot et al. (1990)
Hêtre / *Heb. crustuliniforme*	-------	Fongique	Racinaire	-------	Profils électrophorétiques	Dell et al. (1989)
Hêtre / *Paxillus involutus*	-------	-------	Racinaire	-------	Profils électrophorétiques	Dell et al. (1989)
Bouleau / *Paxillus involutus*	Racinaire et fongique	-------	-------	Racinaire et fongique	Profils électrophorétiques	Blaudez et al. (1996)
Hêtre / *Ceno. geophilum*	-------	Racinaire	-------	Racinaire	Immunoprécipitation Immunocytochimie	Chalot et al. (1989) Chalot et al. (1990)
Épicéa / *Ceno. geophilum*	-------	Fongique	-------	-------	Immunocytochimie	Chalot et al. (1989)

son intensité est environ le double que celle mesurée chez des plants de Pin non mycorhizés (Scheromm *et al.*, 1990; Plassard, 1991).
Il semble donc que la mycorhization est surtout bénéfique à l'absorption d'ions peu mobiles tels que l'ammonium, alors que l'absorption d'ions plus mobiles tels que les nitrates n'est que peu influencée par la présence du partenaire fongique. De plus, l'azote prélevé par le mycélium peut être directement transféré à la plante-hôte sous cette forme inorganique. Chez des plants de Bouleau et d'Épicéa colonisés par *Paxillus involutus*, le nitrate marqué, fourni sous forme NH_4NO_3 au mycélium, est absorbé par celui-ci puis est directement transporté vers la plante-hôte sans être réduit, ni assimilé (Ek *et al.*, 1994). L'assimilation de ce nitrate se fera alors dans les cellules de la racine.

2.2.3. Effet de la mycorhization sur l'assimilation de l'azote

L'assimilation de l'azote emprunte des voies différentes chez les végétaux supérieurs et les champignons. Dans la mycorhize, cellules racinaires et fongiques se juxtaposent, les **différentes voies de l'assimilation de l'azote** (GDH à NADP et cycle GS/GOGAT) pourraient coexister. La répartition quantitative du flux d'azote entre ces deux voies métaboliques serait alors commandée par l'importance des tissus de l'un ou l'autre des partenaires et par les activités des différentes enzymes (France et Reid, 1983; Martin *et al.*, 1986). Mais de nombreuses **modifications biochimiques et moléculaires** interviennent chez les deux partenaires lors de la formation d'une ectomycorhize (Martin et Hilbert, 1991). Ainsi, environ 60% des ARNm fongiques ont une concentration modifiée lors de la mycorhization (Martin et Tagu, 1995; Tagu *et al.*, 1993). Plusieurs gènes, dont l'expression est modifiée par la symbiose, ont été caractérisés par séquençage (Tagu *et al.*, 1995). Ces modifications dans l'expression génique confirment l'existence de profonds remaniements lors de la mycorhization. La détermination des voies métaboliques de l'assimilation azotée dans les ectomycorhizes a effectivement montré que les tissus symbiotiques n'étaient pas une simple juxtaposition de deux partenaires, mais qu'il y avait **une véritable intégration et coordination du métabolisme de chacun** pour former un nouvel organe mixte.

2.2.3.1. Expression des enzymes dans les ectomycorhizes

L'étude des enzymes de l'assimilation azotée a été réalisée sur divers modèles d'associations ectomycorhiziennes (Tableau 1.10) toujours en regardant les changements de distribution et d'activité des enzymes à la fois sur le partenaire végétal et fongique (pris séparemment) et sur les tissus symbiotiques. Ainsi, les travaux réalisés jusqu'à présent se sont surtout développés sur les **GDH** (notamment à NADP, grâce à de nombreux anticorps fongiques disponibles) et sur l'**AAT**.

Les glutamate déshydrogénases (GDH à NAD et à NADP) :

La GDH à NADP a été étudiée chez les racines d'Épicéa, le mycélium de *Hebeloma* sp. et leurs ectomycorhizes (Dell *et al.*, 1989). Les résultats de dosage enzymatique et les révélations des bandes d'activité dans les différents extraits ont montré que la GDH fongique était active au sein des ectomycorhizes de *Picea excelsa* L./*Hebeloma* sp. Des essais *in vivo* de marquage à l'azote ^{15}N ont montré également que la GDH d'*Hebeloma* était fonctionnelle dans de telles structures symbiotiques (Chalot *et al.*, 1991). Enfin, l'immunoquantification par marquage à l'or d'anticorps spécifiques de cette enzyme dans des ectomycorhizes d'Épicéa avec *Cenococcum geophilum* a permis de révéler une accumulation de la GDH à NADP dans les cellules fongiques des tissus symbiotiques. Cependant, chez des associations mycorhiziennes avec Eucalyptus, Botton et Dell (1994) ont montré que l'expression de la GDH à NADP fongique était dépendante de l'espèce fongique partenaire. Ainsi la GDH à NADP fongique était présente dans les mycorhizes d'Eucalyptus/*Hebeloma westraliense* et pas dans celles d'Eucalyptus/*Laccaria bicolor S238N*. Chez des mycorhizes de Douglas/*Laccaria bicolor S238N*, la GDH à NADP fongique ne semble pas être réprimée (Bedell *et al.*, 1994). Par contre, la GDH à NAD fongique est réprimée dans les mycorhizes d'Eucalyptus/*Laccaria bicolor S238N* (Botton et Dell, 1994) et dans celle de Douglas/*Laccaria bicolor S238N* (Bedell *et al.*, 1994).

L'aspartate aminotransférase (AAT) :

Les activités enzymatiques et les profils électrophorétiques de l'AAT ont été examinés chez les racines de Hêtre, d'Épicéa, de Douglas et d'Eucalyptus, non mycorhizées, mycorhizées, et chez les symbiotes fongiques en culture pure (Botton *et al.*, 1989; Chalot *et al.*, 1990; Bedell *et al.*, 1994; Botton et Dell, 1994). Dans toutes ses associations étudiées, l'isoforme racinaire est toujours présente, voir même stimulée. La dissection des tissus mycorhiziens d' Épicéa/*Hebeloma* sp. en trois parties (cylindre central, région corticale et mycélium externe) ont confirmé ces résultats: la région corticale, constituée des cellules végétales et fongiques, ne contient que les isoformes de la plante hôte (Chalot *et al.*, 1990). De plus, des expériences de marquage à l'azote ^{15}N sur le même modèle ont indiqué l'absence de radioactivité dans l'aspartate qui est le produit final de l'AAT (Chalot *et al.*, 1991). L'absence de marquage dans l'aspartate a aussi été retrouvée sur d'autres modèles d'étude (Finlay *et al.*, 1988; Rabbani *et al.*, 1992). Des expériences immunologiques de marquages ont aussi démontré l'absence de l'enzyme de *Cenococcum geophilum* dans les ectomycorhizes d'Épicéa (Chalot *et al.*, 1990).
La répression de l'AAT fongique dans les tissus ectomycorhiziens suggère que des acides aminés peuvent être transférés de la plante au champignon partenaire. Il semblerait que la glutamine et l'alanine soient de bon candidats pour être transférés du mycélium vers la plante (Rabbani *et al.*, 1992).

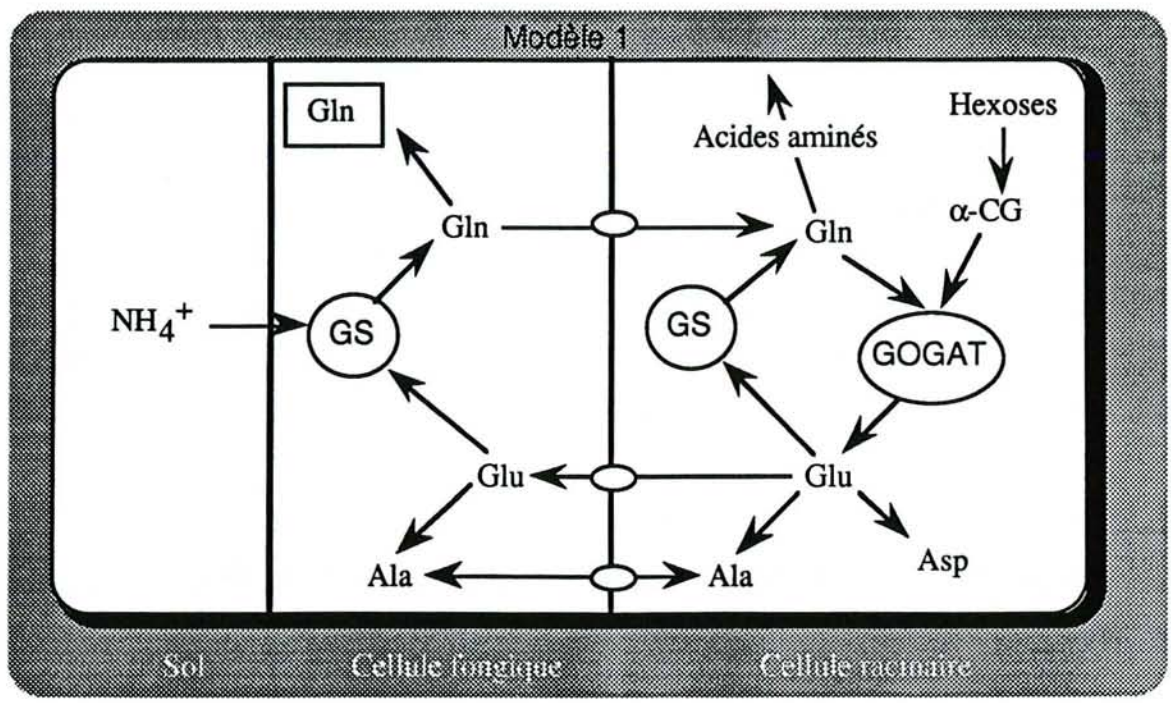


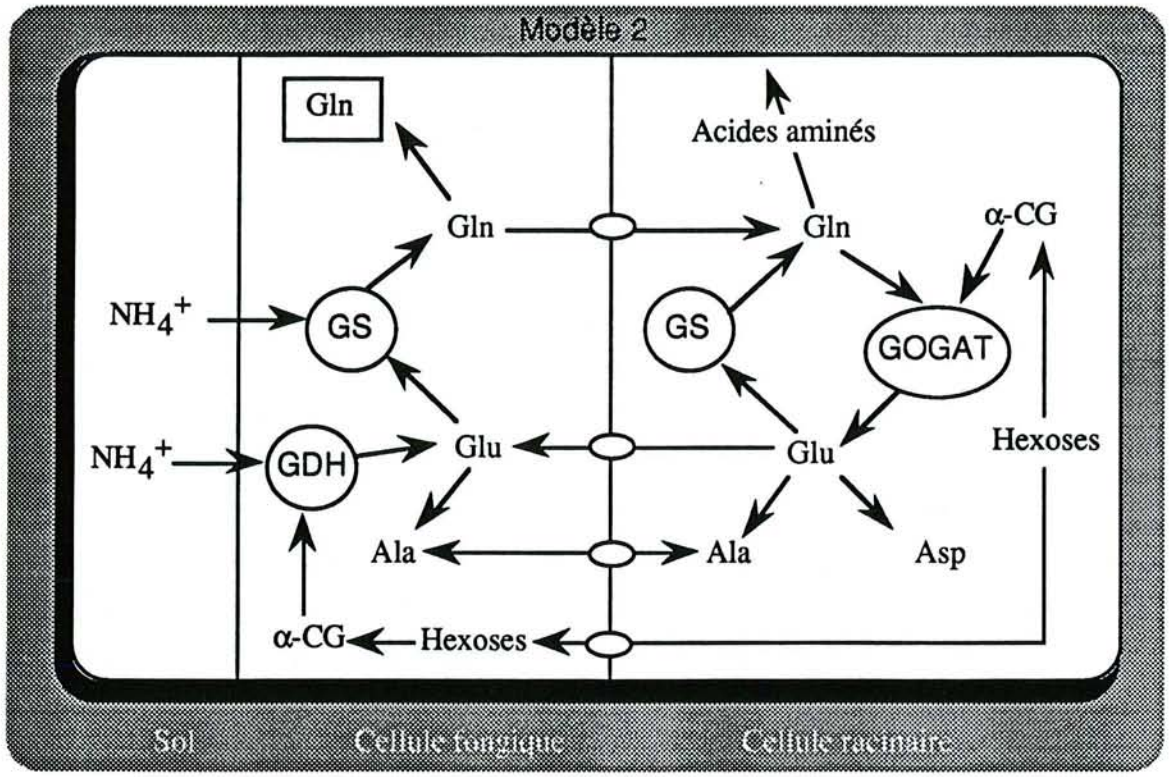
Figure 1.17 : Modèles de l'incorporation de l'azote dans les ectomycorhizes (d'après Martin and Botton, 1993; Botton and Chalot, 1995).

2.2.3.2. Modèles de l'incorporation et du transport de l'azote dans les ectomycorhizes

Des expériences de marquage au [^{15}N] NH_4^+ sur des associations mycorhiziennes intactes de Pin ont démontré que l'azote prélevé par le mycélium est incorporé préférentiellement dans les acides aminés suivants: la glutamine, l'alanine et parfois l'aspartate (Finlay *et al.*, 1989, 1988). Martin *et al.* (1986) ont montré que la glutamine s'accumulait dans le manteau fongique avant d'être transférée vers la plante comme le montrent les cinétiques de marquage obtenues par Finlay *et al.* (1989, 1988). La rapidité du marquage dans l'alanine et son intensité (Martin *et al.*, 1986), ainsi que la mesure d'une forte activité Ala-T (Dell *et al.*, 1986) indiquent que cet acide aminé est synthétisé dans les hyphes du partenaire fongique avant d'être problablement transféré aux cellules racinaires. Au vu de ces résultats expérimentaux complexes et variés, trois modèles différents de l'assimilation de l'azote (Figure 1.17) ont été proposés et discutés selon la distribution des enzymes de chaque partenaire dans les tissus symbiotiques (Martin, 1987; Martin et Botton, 1993; Botton et Chalot, 1995):

1) Le **premier modèle** concerne les mycorhyzes de **Hêtres**, ou de l'association ***Eucalyptus*** sp/*Laccaria bicolor S238N*, où l'**absence de GDH à NADP fongique** suggère que seul la GS est responsable de l'assimilation azotée. Avec la GS des cellules fongiques et un cycle GS/GOGAT dans les cellules racinaires, il faudrait assez de glutamate importé dans le champignon afin de servir d'accepteur d'ion ammonium et que la glutamine soit exportée vers les cellules racinaires. Martin *et al.* (1986) ont montré que chez les ectomycorhizes du Hêtre, l'ammonium marqué à l'azote ^{15}N était successivement incorporé dans le groupe amide de la glutamine, dans le glutamate et l'alanine. L'utilisation d'inbiteur de la GS (MSX) et de la GOGAT (azasérine) ont démontré que le cycle GS/GOGAT était responsable dans ce type de mycorhize de l'assimilation de l'azote. L'accumulation de la glutamine dans le manteau fongique a été étudié (Harley, 1978; Martin *et al.*, 1986) et des études ont montré que cet acide aminé était transféré vers les racines de la plante (France et Reid, 1983; Martin *et al.*, 1987; Finlay *et al.*, 1988). L'alanine peut aussi être fournie aux cellules racinaires par le mycélium (Martin *et al.*, 1986). Même si le flux majoritaire d'azote se fait en direction de la plante, certains acides aminés, comme le glutamate et l'alanine, peuvent transiter de la plante vers le champignon (Rabbani *et al.*, 1992). L'enrichissement isotopique de l'aspartate dans les mycorhizes de Hêtre est très faible, indiquant une faible activité de l'AAT (Martin *et al.*, 1986).

2) Dans le deuxième groupe représenté par les ectomycorhizes d'**Épicéa**, de **Douglas** et par l'association Eucalyptus/*Hebeloma westralienne*, la **présence d'une GDH à NADP fongique** opérationnelle rend le métabolisme comparable à celui observé chez la majorité des champignons supérieurs. Ce type de métabolisme implique une fourniture en squelette carboné par



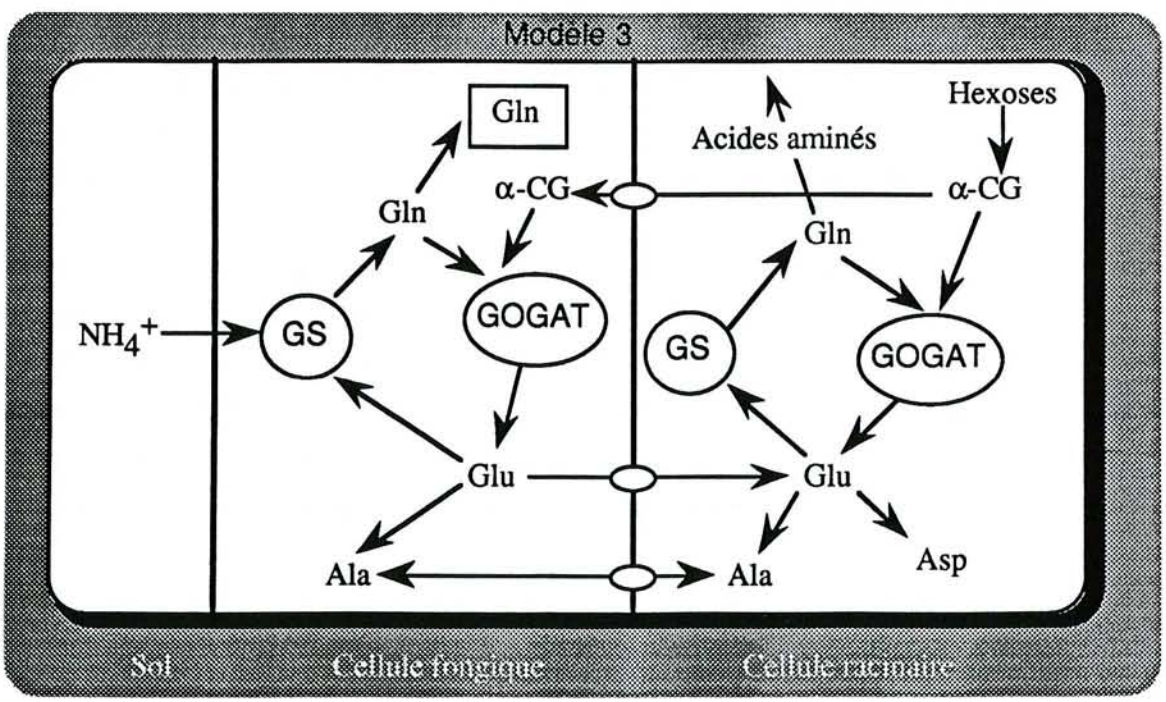


Figure 1.17 (suite): **Modèles de l'incorporation de l'azote dans les ectomycorhizes** (d'après Martin and Botton, 1993; Botton and Chalot, 1995).

la plante hôte, principalement sous forme de glucose (Hampp et Schaeffer, 1995). Dans les ectomycorhizes d'Épicéa-*Hebeloma*, la présence de MSX stimule l'incorporation de l'azote marqué dans l'alanine et le glutamate alors que sans inhibiteur cette incorporation se faisait surtout dans la glutamine (Chalot *et al.*, 1991). De plus, l'emploi d'albizzine dans ces ectomycorhizes n'a aucun effet sur l'accumulation de glutamine marquée, suggérant l'absence d'une GOGAT active dans le partenaire fongique. Dans les ectomycorhizes d'Épicéa, l'alanine se marque rapidement, alors que l'aspartate reste non marqué (Chalot *et al.*, 1991; Botton *et al.*, 1994), ce qui est en accord avec la répression de l'AAT fongique.

3) Le dernier modèle est représentatif de mycorhizes formées par ***Paxillus involutus*** ou ***Pisolithus tinctorius*** dans lesquelles l'assimilation de l'ion ammonium est réalisée par le cycle **GS/GOGAT du champignon**. Ainsi, chez les mycorhizes de Bouleau et de *P. involutus*, la GS fongique et racinaire sont présentes au sein des tissus symbiotiques (Blaudez, communication personnelle). Le glutamate, la glutamine ou l'alanine, synthétisés dans le compartiment fongique, sont transférés à la plante en échange de squelettes carbonés. La répression de l'AAT de *Pisolithus tinctorius* dans les ectomycorhizes d'Eucalyptus a été mise en évidence (Botton et Dell, 1994) alors que l'AAT de *Paxillus involutus* dans les mycorhizes du Bouleau est présente (Blaudez, communication personnelle).

Ces trois modèles situent l'assimilation primaire de l'azote principalement dans le mycélium externe, impliquant le transfert de composés organiques tels que la glutamine, l'alanine ou le glutamate vers la plante. La diversité des modèles présentés traduit sans doute les différences taxonomiques et morphologiques des symbioses ectomycorhiziennes.

De cette analyse bibliographique, nous soulignerons plusieurs données:

⇒ l'ion ammonium n'est pas seulement issu de la source exogène de la plante mais peut aussi provenir de bons nombres de réactions métaboliques.

⇒ le prélèvement de l'azote n'est pas le seul facteur limitant, la régulation des enzymes du métabolisme azoté ainsi que celles des autres réactions pourvoyeuses en ammonium notamment, le sont toute autant

⇒ la voie métabolique majoritaire de l'assimialtion de l'ion ammonium chez les végétaux est le cycle GS/GOGAT. Ces deux enzymes paraissent indisociables du point de vue fonctionnel chez les plantes supérieures compliquant par là même la régulation de chacune d'elles

⇒ la GS est une enzyme clé du métabolisme azoté et la compréhension des mécanismes contrôlant son activité et sa synthèse est toujours d'actualité et bien développée grâce à la biologie moléculaire

⇒ la diversité et la régulation fine, notamment par des facteurs environnementaux, des enzymes qui interviennent dans l'assimilation de l'azote tant chez les végétaux supérieurs qu'au sein de leurs ectomycorhizes

⇒ si de nombreux travaux ont porté surtout sur la compréhension du métabolisme de l'azote chez des Angiospermes, de récents travaux ont permis de comparer ce métabolisme à celui des Gymnospermes

Au vue de cette synthèse bibliographique, la GS racinaire tant par sa position dans l'espace (sol-azote) que par son importance dans le temps (incorporation de l'azote dans les racines; assimilation de l'azote en premier par la GS) apparaît comme un élément clé de la plante. La compréhension des mécanismes de régulation de la GS racinaire permettrait de mieux comprendre la mise en place du métabolisme azoté lors de la croissance de l'arbre et lors de sa mycorhization.

OBJECTIFS

Ce travail s'inscrit dans le cadre des études réalisées sur les voies métaboliques impliquées dans l'assimilation primaire de l'ammonium chez les plantes supérieures et leurs ectomycorhizes. Il a consisté plus particulièrement à caractériser la glutamine synthétase racinaire du Douglas et sa régulation. Il a été montré que le cycle GS/GOGAT était le principal responsable de l'assimilation primaire de l'ammonium (Miflin et Lea, 1980; Lea *et al.*, 1990) et que les facteurs de régulation de la GS étaient nombreux.

Le choix du Douglas est justifié par le fait qu'il représente une espèce d'intérêt sylvicole et qu'il est le partenaire hôte de *Laccaria bicolor* S238N (= *Lac. laccata*) qui est un champignon utilisé en pépinière forestière et dont nous avons développé l'étude au sein du laboratoire.
Une étude a tout d'abord été réalisée sur le métabolisme azoté des racines du Douglas non mycorhizées et mycorhizées avec le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*. Cette étude a été consignée dans la publication n°1:

*Étude de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme azoté de l'association ectomycorhizienne Douglas/*Laccaria laccata.
(Bedell JP, Garnier A, Pireaux JC, Chalot M, Brun A et Botton B, *Acta Botanica Gallica*, 1994).

La purification de la glutamine synthétase racinaire du Douglas et l'étude de ses propriétés physico-chimiques ont été réalisées. Certains éléments de régulation de la GS_r ont été par là même abordés. Ces résultas ont fait l'objet de la publication n°2:

Purification et *properties of glutamine synthetase from Douglas fir roots.*
(Bedell Jean-Philippe, Chalot Michel, Brun Annick et Botton Bernard, *Physiologia Plantarum*, 1995).

L'étude de la régulation de cette enzyme au cours du dévelopement du Douglas a été entreprise. Dans un premier temps, la distribution de l'enzyme et de ses isoformes a été étudiée au niveau de la graine, de sa germination et des tout premiers stades de croissance. A ces stades précoces, l'effet possible de l'ammonium et du nitrate a été abordé. Cette étude a été retranscrite dans la publication n°3:

*Glutamine synthetase during early development of Douglas fir (*Pseudotsuga menziessi *Mirb. Franco) seedlings.*

(Bedell JP, Chalot M, Garnier-Petit A et Botton B, *Australian Journal of Plant Physiology*, soumis)

Puis l'étude de la GS s'est poursuivie sur des stades plus avancés du Douglas et sur l'influence de facteurs environnementaux, comme la source d'azote lors de sa croissance. L'effet de différentes sources azotées (ammonium, nitrate, ou les deux en même temps) sur le développement du Douglas et sur la distribution de l'activité GS, NAD-GDH et AAT a été étudié. La répartition de l'activité GS tout le long du système racinaire a également été étudiée. Ces travaux sont décrits dans la publication n°4:

Effects of nitrogen sources on growth et *activity of some enzymes of nitrogen metabolism in Douglas fir.*
(Bedell JP, Chalot M et Botton B, *Physiologia Plantarum*)

Après avoir décrit dans la section "Matériel et Méthodes" les techniques employées au cours de ce projet de recherche, les résultats expérimentaux seront exposés sous la forme des publications citées ci-dessus. Dans la "Discussion générale et Conclusions", nous résumerons les données acquises dans ce projet de recherche et nous discuterons de nos résultats par rapport, notamment, à ceux rapportés dans l'"Analyse Bibliographique".

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

2.1.1 Conditions de culture

Les graines de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco; Office National des Forêts, France, Zone 422, 1990) proviennent du laboratoire de Microbiologie Forestière (INRA, Nancy). Les graines sont stérilisées dans de l'eau oxygénée à 30% (v/v) pendant 60 min puis rincées dans de l'eau stérile pendant 4 h (Duponnois et Garbaye, 1991). Les graines sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu solide agar-glucose (1 $g.l^{-1}$) afin de détecter les éventuelles contaminations. Placées à l'étuve à 24°C, les graines contaminées sont écartées et celles qui ont germé (radicule d'environ 2 cm) sont transférées dans des bacs remplis de perlites imbibées soit d'eau, soit de la solution nutritive selon les expériences. La croissance du végétal se poursuit en salle climatisée dont les paramètres sont : 23°C le jour avec 60% d'humidité relative ; 70% d'humidité relative et 19°C la nuit avec une photopériode de 15h. Les plants sont arrosés 2 à 3 fois par semaine avec la solution nutritive décrite par Ingestad (1970; 1971). La solution nutritive est constituée (mg l^{-1}) de: NH_4NO_3 (100), Na_2HPO_4 (20), KCl (40), $CaCl_2$ (40), $MgSO_4.7H_2O$ (20), du fer sous forme d'ions chelatés (5,6) $NaMo0_4.7H_2O$ (0,001), $CuSO_4.7H_2O$ (0,006), H_3BO_3 (0,09), $ZnSO_4.7H_2O$ (0,1) et $MnCl_2.4H_2O$ (0,7). Si nécessaire, l'azote est apportée soit sous forme nitrique exclusive (KNO_3, 100 $mg.l^{-1}$), soit sous forme ammoniacale exclusive ($(NH_4)_2SO_4$, 50 $mg.l^{-1}$).

2.1.2. Récolte du matériel végétal

2.1.2.1. Expériences sur les graines en germination

Les boîtes de Pétri sont placées à l'étuve à 24°C et ceci pendant une semaine. La récolte des graines ainsi que leur répartition en fonction de la longueur de leur radicule (Figure 2.1) a été réalisée sous une hotte à flux laminaire. Après séchage sur du papier buvard, les graines ainsi réparties sont pesées. La séparation des différentes parties de la graine est réalisée sous loupe binoculaire.

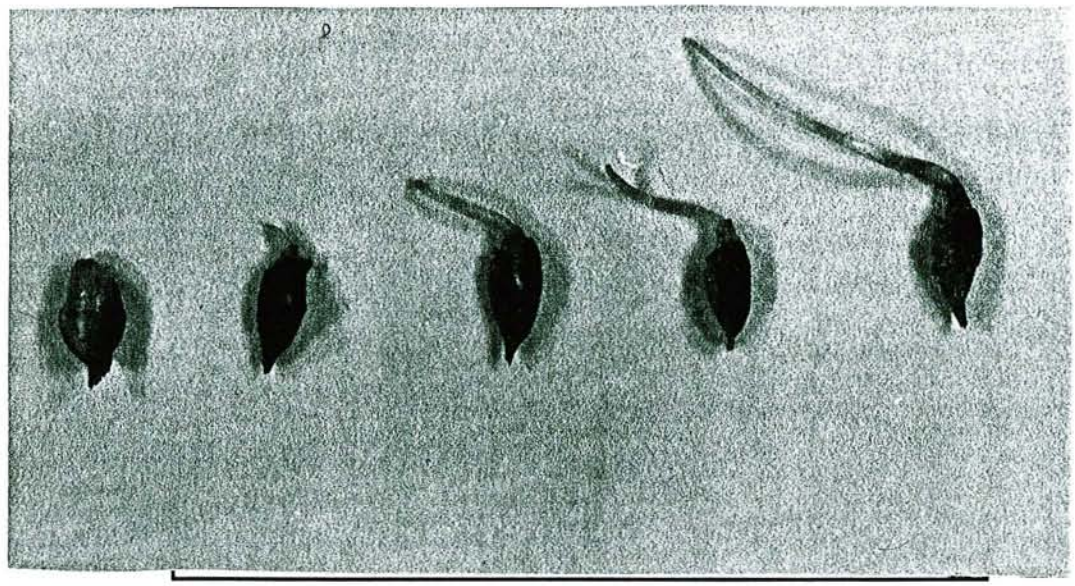


Figure 2.1 : Présentation des différents stades en fonction de la longueur de la radicule retenue pour les graines de Douglas.

2.1.2.2. Expériences sur les jeunes plantules

Pour les expériences concernant l'effet de la source azotée, les plants cultivés sur ces différentes sources d'azote sont prélevés chaque semaine. Lors de chaque prélèvement, la mesure de la longueur des parties racinaires et aériennes, ainsi que le nombre de racines secondaires sont réalisés sur au moins 8 plants par traitement. La masse fraîche sera pesée sur l'ensemble des plants; une partie sera conservée afin de réaliser la mesure des activités enzymatiques et protéiques et l'autre partie utilisée pour la mesure de la masse sèche et l'extraction des acides aminés. Quant aux plants qui ont servis pour l'étude et la purification de l'enzyme, ils ont été prélevés, leur racines rincées puis séchées sur un papier buvard avant d'être pesées pour l'extraction.

2.1.3. Synthèse de mycorhizes axéniques

Certaines expériences sont réalisées sur des ectomycorhizes de Douglas/*Laccaria laccata*. (Fig. 2.2). La synthèse de mycorhizes en conditions axéniques a été réalisée au laboratoire de Microbiologie Forestière (INRA Champenoux) grâce à la collaboration du Dr. Garbaye. La technique de synthèse utilisée pour l'obtention de mycorhizes axéniques est celle préconisée par Duponnois et Garbaye (1991). Les racines mycorhizées sont prélevées sous la loupe binoculaire. Une coupe semi-fine ainsi qu'un dosage de l'ergostérol sont les moyens retenus afin de vérifier la bonne mycorhization des prélèvements.



Figure 2.2 :Racines de Douglas mycorhizées par le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N

2.2. TECHNIQUES ANALYTIQUES GENERALES

2.2.1. Extraction et dosages

2.2.1.1. Extraction des protéines solubles

Toutes les opérations d'extraction et de purification sont effectuées en chambre froide à 4°C. Les racines sont broyées au mortier, en présence de sable de Fontainebleau (à raison de 0,5 g par gramme de matière fraîche). Le tampon d'extraction, dont la composition est donnée dans le tableau 2.1, est utilisé le plus souvent à raison de 20 ml par gramme de matière fraîche. Sa composition est celle donnée par Brun *et al.* (1992), et qui donne une activité GS racinaire maximale.

L'extrait est centrifugé une première fois à 40000*g* pendant 30 min. Une deuxième extraction est réalisée sur ces culots afin d'extraire la totalité des protéines enzymatiques. Le surnageant recueilli après chacune des extractions constitue l'extrait brut.

2.2.1.2. Détermination des activités enzymatiques de la glutamine synthétase (GS, EC 6.3.1.2.)

Deux types de dosage permettent de déterminer l'activité GS:

- Dosage colorimétrique du produit formé:

Ce dosage est basé sur la propriété que possède l'enzyme de catalyser la formation du γ-glutamylhydroxamate lorsque l'ion ammonium est remplacé par l'hydroxylamine (Rhee *et al.*, 1976). Lorsque le substrat est le glutamate, la réaction est appelée **réaction biosynthétique:**

$$\text{(1)}\quad \text{L-glutamate} + NH_2OH + ATP \xrightarrow{+\ Mg^{++}} \gamma\text{-glutamylhydroxamate} + ADP + Pi$$

Lorsque le substrat est la glutamine, la réaction est appelée **réaction transférasique:**

$$\text{(2)}\quad \text{L-glutamine} + NH_2OH \xrightarrow[+\ ADP\ +\ \text{arsenate}]{+\ Mg^{++}} \gamma\text{-glutamylhydroxamate} + NH_4^+$$

En présence de $FeCl_3$, le γ-glutamylhydroxamate forme un complexe coloré en brun dont la densité optique est lue au spectrophotomètre à 540 nm. Les quantités de produit formé sont déterminées à partir d'une courbe étalon (Fig. 2.3) réalisée avec des concentrations croissantes en γ-glutamylhydroxamate de 0 à 3 µmoles par ml de mélange réactionnel.

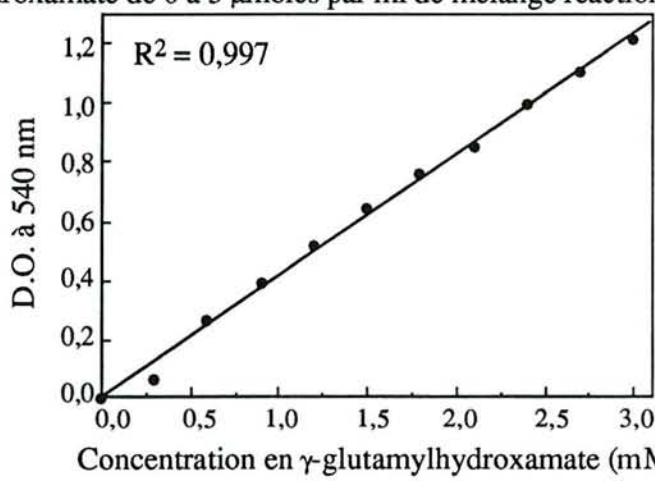


Figure 2.3 : *Courbe étalon pour le dosage de l'activité glutamine synthétase. La solution de γ-glutamylhydroxamate est préparée dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,6). La coloration se développe pendant 20 min à température ambiante.*

La composition des milieux réactionnels établie d'après Shapiro et Stadtman (1970) pour le dosage biosynthétique et Winter *et al.* (1982) pour le dosage transférasique est donnée dans les tableaux 2.2 et 2.3, respectivement.

.Des témoins sont réalisés par omission du glutamate ou de la glutamine ainsi que de l'ATP ou de l'ADP suivant le dosage utilisé, la réaction étant généralement déclenchée par l'un des substrats. Elle s'effectue à 30°C pendant 30 min et est stoppée par l'addition de 1 ml d'une solution contenant:

$FeCl_3$	0,37 M
TCA	0,20 M
HCl	0,67 N

Après agitation, la coloration se déroule pendant 20 min à température ambiante, puis les tubes contenant le milieu réactionnel sont centrifugés à 2000*g*.

- Dosage spectrophotométrique par couplage enzymatique:

Ce dosage est réalisé par addition de deux enzymes de couplage suivant la méthode décrite par Winter *et al.* (1982), selon la réaction suivante:

(3) L-glutamate + NH_4^+ + ATP $\xrightarrow[GS]{+ Mg^{++}}$ L-glutamine+ PEP + ADP + Pi

↓ pyruvate kinase

pyruvate + ATP + NADH + H^+

↓ lactate déshydrogénase

lactate + NAD^+

La diminution de la densité optique à 340 nm due à l'oxydation du cofacteur au cours de la formation du lactate est mesurée au spectrophotomètre. La composition du milieu réactionnel est donnée dans le tableau 2.4.

La réaction est déclenchée par l'addition de l'ATP. Il est indispensable d'effectuer parallèlement à l'essai un témoin sans glutamate ou sans ammonium pour s'assurer de la spécificité de la réaction glutamine synthétase (en particulier, des ATPases, présentes dans l'extrait enzymatique, peuvent interférer dans le dosage).

2.2.1.3. Détermination d'autres activités enzymatiques

o ***Glutamate déshydrogénase à NADP (GDH à NADP, E.C. 1.4.1.4.)***

Cette enzyme catalyse la réaction suivante:

α-cétoglutarate + NH_4^+ + NADPH + H^+ ⟶ L-glutamate + H_2O + $NADP^+$

Son activité est déterminée par la mesure de l'oxydation du NADPH suivie à 340 nm en cellule thermostatée. La composition du milieu réactionnel est donnée dans le tableau 2.5.

Des témoins sont réalisés par omission de l'α-cétoglutarate ou du sulfate d'ammonium, la réaction étant déclenchée par l'addition de l'un des substrats.

o ***Glutamate déshydrogénase à NAD (GDH à NAD, E.C. 1.4.1.3.)***

Le dosage de l'enzyme GDH à NAD suit le même protocole que celui de l'enzyme à NADP. Seul le NADPH est remplacé par le NADH.

o ***Aspartate aminotransférase (AAT, E.C. 2.6.1.1.)***

Cette enzyme est responsable du transfert du groupement aminé-NH_2 d'un acide aminé à un acide organique selon la réaction suivante :

aspartate + α-cétoglutarate ⟷ oxaloacétate + glutamate

Cette réaction est suivie à 340 nm par une réaction couplée avec la malate déshydrogénase à NAD. La diminution de la D.O. à 340 nm due à l'oxydation du NADH est suivie en cellule thermostatée à 30 °C au spectrophotomètre. La composition du milieu réactionnel est indiquée dans le tableau 2.6. Des témoins sans α-cétoglutarate et sans aspartate sont réalisés.

o ***Alanine amino transférase (Ala-T, E.C. 2.6.1.2)***

La réaction catalysée par l'alanine aminotransférase est suivie à 340 nm par la réaction couplée avec la lactate déshydrogénase (LDH).

α-cétoglutarate + alanine ⟷ glutamate + pyruvate

NADH + H^+ → NAD^+ (LDH)

lactate

La diminution de la densité optique due à l'oxydation du NADH est suivie à 30°C au spectrophotomètre. La composition du milieu réactionnel est donnée dans le tableau 2.7. Des témoins sans α-cétoglutarate et sans alanine sont réalisés.

2.2.1.4. Expression des résultats

Les activités enzymatiques sont habituellement exprimées en nkatals par g de tissus frais ou par mg de protéines (ce qui correspond alors à l'activité spécifique) pour la GDH à NADP, en µmoles de γ-glutamylhydroxamate formé par min et par unité de poids pour la GS. Afin d'homogénéiser les résultats, toutes les activités seront exprimées en nkatals Un nkatal correspond à 1 nmole de substrat disparu ou de produit formé par seconde.

- Activité GS (dosage colorimétrique)

La gamme étalon (Fig. 2.3) donne le résultat sous forme de µmoles de γ-glutamylhydroxamate formé pendant 30 min et par ml de milieu réactionnel.
Le nombre de nkatals pour la prise d'essai est alors donné par la formule:

$$\underbrace{\text{µmoles de γ-glutamylhydroxamate} \times \frac{1}{30}}_{\text{µmoles de γ-GH formées / min}} \times \underbrace{\frac{1}{60}}_{\text{µmoles de γ-GH formées / sec}} \times \underbrace{1000}_{\text{nmoles de γ-GH formées / sec = nkatals}}$$

- Activité GDH à NADP, à NAD et GS (dosage spectrophotométrique):

Une nmole de NAD(P)H réduite produit une variation de densité optique de 0,00622 unité à 340 nm avec une cuve de 1 cm de large (la valeur de 0,00622 correspond au coefficient d'extinction molaire du NAD(P)H).
Le nombre de nkatals pour la prise d'essai est alors donné par la formule suivante:

$$\underbrace{\Delta DO/min \times \frac{1}{0{,}00622}}_{\text{nmoles de NAD(P)H transformées par min}} \times \underbrace{\frac{1}{60}}_{\text{nmoles de NAD(P)H transformées par sec = nkatals}}$$

- Activité AAT et Ala-T (dosage spectrophotométrique):

De la même façon que pour le calcul des activités GDH et GS, le formule suivante donne le nombre de nakatals par prise d'essai:

$$\Delta DO/min \times \frac{1}{0,00622} \times \frac{1}{60} \times 1,15 = \Delta DO/min \times 3$$

nmoles de NADH transformées par min

nmoles de NADH transformées par sec = nkatals

nmoles de NADH transformées par sec = nkatals pour 1,15 ml

2.2.1.5. Dosage des protéines

Basée sur la méthode développée par Bradford (1976), la technique de dosage utilisée repose sur le déplacement d'absorption de 465 nm à 595 nm qui se produit lorsque le bleu de Coomassie se lie aux protéines. Le dosage utilise le réactif de Pierce (Bleu de Coomassie G 250) qui ne nécessite ni dilution, ni filtration et qui peut se conserver intact pendant plusieurs mois. Cette méthode est très sensible et la détection n'est pas affectée par de nombreuses substances susceptibles d'interférer lors de l'utilisation d'autres réactifs.

Aux 500 µl d'extrait protéique dilués ou non sont ajoutés 500 µl de réactif de dosage. Après 10 min d'incubation à température ambiante, la densité optique est lue au spectrophotomètre (Shimadzu UV 160) à 595 nm contre un témoin sans protéines. La quantité de protéines de la prise d'essai est déterminée par référence à une courbe étalon réalisée avec des concentrations croissantes en sérum albumine bovine de 0 à 25 µg/ml de mélange réactionnel.

2.2.2. Purification de la GS

Le protocole de purification utilisé pour la GS des racines de Douglas est résumé dans la figure 2.4. A partir de l'extrait brut, la purification s'effectue en trois étapes:

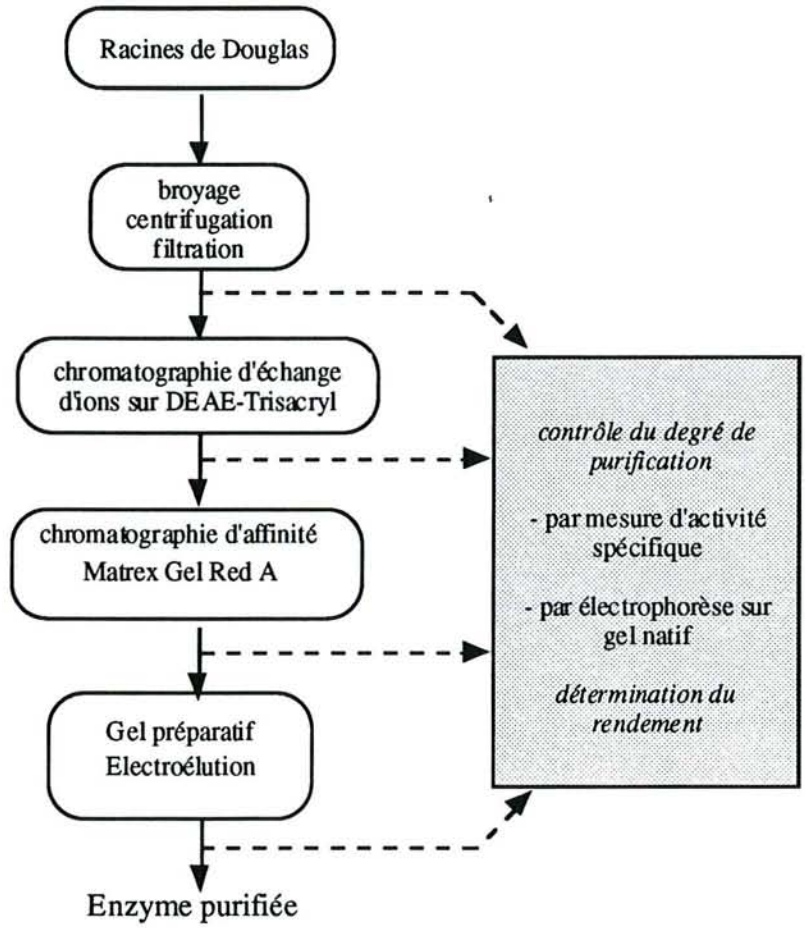


Figure 2.4 :*Principales étapes du protocole de purification de la glutamine synthétase des racines de Douglas.*

2.2.2.1. Chromatographie sur DEAE-Trisacryl

2.2.2.1.1. Principe

Cette méthode repose sur les liaisons électrostatiques qui s'établissent entre les protéines chargées négativement (dans les conditions de pH utilisées) et sur les dérivés acryliques de l'adsorbant chargés positivement (Harris, 1989). Un gradient de force ionique croissant permet d'éluer les protéines qui seront séparées en fonction de leur charge électrostatique nette ou de leur densité de charge.

Le DEAE-Trisacryl est un copolymère acrylique, présenté sous forme de perles rigides de diamètre compris entre 40 et 80 µM. Sa macroporosité, sa stabilité chimique et thermique, ses propriétés mécaniques en font un échangeur d'ions remarquable. En effet, le tamisage moléculaire est inexistant, la résistance des billes à l'écrasement permet de minimiser les variations de volume du support dans la colonne, d'appliquer des débits élevés aux colonnes et d'effectuer ainsi des séparations en des temps très courts.

2.2.2.1.2 Protocole

L'extrait brut obtenu par extraction d'environ 25 g de racines est filtré sous vide sur filtre de 0,45 µM (Millipore) puis déposé sur la colonne de DEAE-Trisacryl (2 x 20 cm) préalablement équilibrée avec le tampon A dont la composition est donnée dans le tableau 2.8., ceci à un débit de 1,5 ml/min. Après lavage avec ce même tampon, les protéines sont éluées par un gradient linéaire de NaCl de 0 à 200 mM préparé dans le tampon A. Des fractions d'environ 2,5 ml sont collectées et la vitesse d'élution est maintenue à 1,5 ml/min à l'aide d'une pompe péristaltique LKB.

2.2.2.2. Chromatographie d'affinité

2.2.2.2.1. Principe

La chromatographie d'affinité est un type de chromatographie d'adsorption pour laquelle la molécule qui doit être purifiée est spécifiquement et réversiblement adsorbée sur une substance complémentaire appelé ligand qui peut être soit un inhibiteur de l'enzyme, un substrat ou son analogue, ou encore l'anticorps spécifique dirigé contre cette enzyme. Ce ligand est lui-même immobilisé sur un support insoluble (matrice).
Le gel d'affinité utilisé pour la glutamine synthétase est une Matrex Gel Red A (Amicon). La Matrex Gel Red A n'est pas un support d'affinité au sens strict mais une chromatographie d'affinité de colorant. C'est une technique assez peu spécifique mais commode pour purifier de nombreuses protéines ayant toutes en commun de lier des mono ou di-nucléotides (enzymes utilisant l'ATP, ce qui est le cas de la GS). Les protéines fixées spécifiquement sur le gel sont éluées par le tampon d'équilibration contenant de faibles concentrations en cofacteurs.

2.2.2.2.2 Protocole

Les fractions issues de la DEAE-Trisacryl et possédant la plus forte activité GS sont chargées sur la colonne Red A (1 x 8 cm), préalablement équilibrée par le tampon A (Tableau 2.8), à un débit de 0,15 ml/min. La colonne est lavée par le tampon A puis les protéines fixées spécifiquement sur le gel sont éluées par 15 ml d'un mélange de NaCl 0,5 M et d'ADP à 5 mM dans ce même tampon A, à un débit de 0,3 ml/min.

2.2.2.3. Électrophorèse préparative

L'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide a constitué l'étape ultime de la purification à homogénéité de la GS. Cette étape est réalisée avec 20 ml de gel répartis dans des tubes de 18 mm de diamètre interne et de 160 mm de hauteur. Après migration à 15 mA, l'enzyme est légèrement révélée par son activité biosynthétique (Fig 2.5), puis le disque ainsi marqué est

séparé du reste du gel. Ce disque isolé sera placé dans un électro élueur (modèle 422, Biorad) pendant 12 h à 15 mA selon la technique décrite par Botton et Msatef (1983).

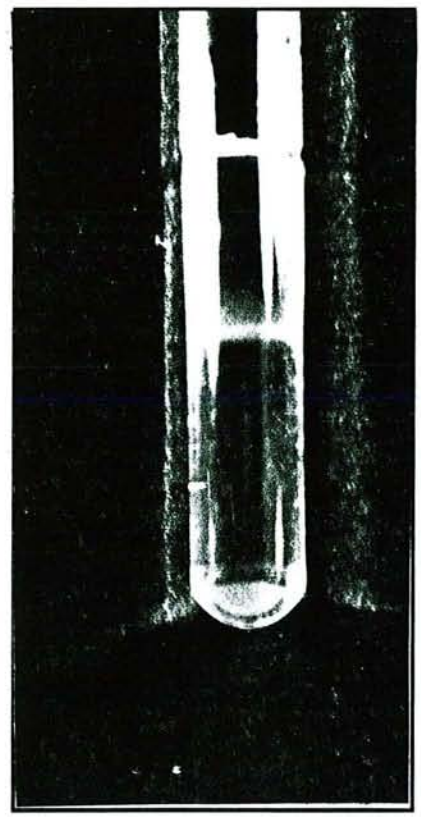


Figure 2.5: Électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide. La bande blanche correspond à la révékation de l'activité biosynthétique de la GS.

2.2.3. Techniques électrophorétiques

2.2.3.1. Electrophorèse non dénaturante sur gel de polyacrylamide

2.2.3.1.1. Principe

Cette technique possède un haut pouvoir résolutif pour la séparation des protéines et surtout pour la détection d'isoformes d'une même enzyme. En effet, ces macromolécules sont soumises simultanément à une filtration moléculaire sur le tamis constitué par l'acrylamide et à une migration dans un champ électrique dépendante de leur charge. La technique employée est celle de Davis (1964), modifiée.

2.2.3.1.2. Protocole

Les gels sont généralement réalisés à la concentration de 6% sur plaque de 8,2 x 10,1 cm contenant 4,5 ml de gel. Les compositions des gels de séparation et de concentration sont

indiquées dans les tableaux 2.9 et 2.10, respectivement. L'échantillon à déposer est additionné de bleu de bromophénol (1%) qui permet de visualiser le front de migration, et de glycérol (1/5 du volume) pour augmenter la densité.
L'électrophorèse est réalisée sur le système Miniprotean II de Biorad. L'ampérage est fixé à 25 mA et l'électrophorèse se déroule à 4°C. La composition du tampon d'électrophorèse utilisé est donnée ci-dessous:

Tris (pH 8,3)	6,8 mM
Glycine	129 mM

2.2.3.1.3. Révélation des activités enzymatiques

o ***Glutamine synthétase***

- Révélation du γ-glutamylhydroxamate

Cette méthode de révélation repose sur la réaction transférasique de la GS. Après migration, le gel est mis à incuber pendant 30 à 45 min à 30°C dans le milieu réactionnel présenté dans le tableau 2.11 (Winter *et al.*, 1982). Le γ-glutamylhydroxamate formé au cours de la réaction est révélé par addition d'une solution de chlorure de fer dont la composition est donnée dans le § 2.2.1.2. Une coloration brun-rouge, caractéristique de la GS, apparaît immédiatement après addition de la solution de révélation. La même révélation peut être effectuée en utilisant la réaction biosynthétique.

- Révélation des phosphates formés:

La méthode repose sur la révélation des phosphates libérés au cours de la réaction biosynthétique. En présence de $CaCl_2$, ceux-ci forment un précipité de phosphate de calcium. Aussitôt après électrophorèse, le gel est incubé 30 à 45 min dans le milieu réactionnel présenté dans le tableau 2.12. Les phosphates formés au cours de la réaction biosynthétique sont précipités sous forme d'une bande blanche par le chlorure de calcium. Il est absolument nécessaire, dans ce cas, de réaliser un témoin pour lequel la solution d'incubation est dépourvue de glutamate ou d'hydroxylamine, afin d'éviter les artéfacts dus à la présence d'ATPases dans l'extrait.

o ***Glutamate déhydrogénase (à NADP et à NAD)***

A la fin de la migration, la révélation de la glutamate déshydrogénase s'effectue par un bain de 5 à 15 min à l'obscurité dans la solution dont la composition est donnée ci-dessous :

glutamate	5,6 mg/ml

NADP ou NAD	0,3 mg/ml
N.B.T. (Nitroblue tétrazolium)	0,8 mg/ml
P.M.S. (Phénazine méthosulfate)	0,14 mg/ml

Tout ces composés repris dans du tampon Tris-HCl 100 mM (pH=7,8)

Une coloration bleu-violet, due à la formation du formazan et correspondant à l'activité GDH apparaît après quelques minutes d'incubation à température ambiante.

o ***AAT***

Après migration, le gel d'acrylamide est mis à incuber 20 à 30 min à température ambiante et à l'obscurité dans le milieu de révélation suivant :

α-cétoglutarate	0,735 mg/ml
acide aspartique	1,33 mg/ml
pyridoxal 5-phosphate	80 µM

Tout ces composés sont repris dans du tampon Tris-HCl 100 mM (pH=8)

Puis le gel est transféré dans une solution de fast-violet-blue (Sigma) à 3 $mg.ml^{-1}$ qui va réagir avec l'acide oxaloacétique formé. Des bandes de coloration rouge brique correspondant à l'activité AAT apparaissent au bout de quelques minutes.

2.2.3.1.4. Révélation des protéines

- Révélation par le bleu de Coomassie:

Après électrophorèse, les gels sont incubés pendant une à deux heures dans la solution suivante:

- Coomassie Brillant Blue R (Sigma)	275	mg
- Acide acétique glacial	10	ml
- Méthanol 95% (v/v)	50	ml
- H_2O distillée	50	ml

La décoloration des gels est ensuite réalisée sous agitation douce, en plaçant le gel dans la solution de décoloration suivante:

- Acide acétique glacial	75	ml
- Méthanol 95% (v/v)	50	ml
- H_2O distillée	qsp	1 l

- Révélation par la coloration argentique:

Cette technique est environ 100 fois plus sensible que la révélation des protéines par le bleu de Coomassie. La méthode utilisée est celle de Blum *et al.* (1987); elle est résumée dans le tableau 2.13.

2.2.3.2. Electrophorèse en conditions dénaturantes

2.2.3.2.1. Principe

L'électrophorèse en conditions dénaturantes permet de séparer les protéines selon leur taille. En effet, les charges propres des protéines sont neutralisées par le SDS, détergent anionique qui leur confère une charge globalement négative. Les protéines, qui sont dissociées en sous-unités sous l'action conjuguée de la chaleur, du 2-mercaptoéthanol et du SDS, migrent alors en fonction de leur taille dans le tamis moléculaire constitué par le gel d'acrylamide.

2.2.3.2.2. Protocole

- Préparation des solutions et des échantillons:

Les compositions des gels de concentration et de séparation sont données dans les tableaux 2.14 et 2.15.

Environ 3 à 5 µg de protéines sont précipités à l'acétone, centrifugés à 10 000*g* pendant 10 min puis resolubilisés dans le tampon de Laemmli (1970) dont la composition est donnée dans le tableau 2.16. Les échantillons sont ensuite placés pendant 3 min dans l'eau bouillante avant d'être déposés sur le gel.

L'étalonnage du gel est réalisé à l'aide du kit de protéines marqueurs de bas poids moléculaire (Pharmacia) dont la composition est la suivante:

Phosphorylase b	94,0 kDa
Serum albumine bovine	67,0 kDa
Ovalbumine	43,0 kDa
Anhydrase carbonique	30,0 kDa
Inhibiteur de la trypsine de soja	20,1 kDa
α-Lactalbumine	14,4 kDa

- Conditions de migration:

La composition du tampon d'électrophorèse, préconisée par Laemmli (1970) est donnée ci-dessous:

Tris (pH 8,4)	90 mM
Glycine	80 mM
SDS	2,5 mM

L'électrophorèse est conduite à 15 mA tant que les échantillons sont dans le gel de concentration, puis à 25 mA jusqu'à la fin de la migration, voltage et puissance étant non limitants. Les gels sont ensuite révélés par la coloration argentique (Tableau 2.13).

2.2.4. Détermination de la masse moléculaire des protéines natives

Afin de pouvoir déterminer la masse moléculaire de l'enzyme, trois techniques différentes ont été employées: la migration sur gel de gradipore, la filtration moléculaire sur HILOAD Séphacryl S-300 (FPLC) et sur la construction du diagramme de Ferguson.

2.2.4.1. Electrophorèse sur gradipore

2.2.4.1.1. Principe

La méthode consiste à effectuer une électrophorèse de l'enzyme en gel de polyacrylamide dont la porosité varie suivant un gradient. La migration de la protéine s'arrête lorsque celle-ci atteint la zone de concentration en acrylamide correspondant à sa taille.

2.2.4.1.2. Protocole

La composition du gradient d'acrylamide (4-25%) est donnée dans les tableaux 2.17 et 2. 18.
L'estimation de la masse moléculaire de la GS a été réalisée en accord avec la méthode décrite par Botton et Msatef (1983), Botton et Chalot (1991). Les gels ont été étalonnés à l'aide du kit de protéines de masse moléculaire élevée (Pharmacia) composé des protéines suivantes:

Thyroglobuline	669 kDa
Ferritine	440 kDa
Catalase	232 kDa
Lactate déshydrogénase	140 kDa
Sérum albumine bovine	67 kDa

- Préparation des solutions:

Environ 2,5 µg (5 µl) de chacune des protéines sont déposés sur le gel après addition de bleu de bromophénol (1%) et de glycérol (1/5 du volume). Le tampon d'électrophorèse utilisé est le suivant:

Tris (pH 8,4)	90 mM
Acide borique	80 mM
Na_2 EDTA	2,5 mM

- Migration:

Le gel est prééquilibré pendant 20 min à 70 volts puis, après dépôt des échantillons, l'électrophorèse se déroule pendant 15 à 20 min à 70 volts jusqu'à ce que les protéines pénètrent dans le gel. Elle se poursuit enfin pendant 15 à 16 heures à 150 volts (voltage constant).

- Révélation des protéines:

A la fin de la migration, les protéines sont révélées, soit par le bleu de Coomassie, soit par leur activité enzymatique.

2.2.4.1.3. Expression des résultats

La courbe de calibration est obtenue en portant le logarithme décimal de la masse moléculaire des protéines marqueurs en fonction de leur mobilité électrophorétique (R_f).

2.2.4.2. Filtration moléculaire sur HILOAD Séphacryl S-300 (FPLC)

2.2.4.2.1. Principe

Au cours d'une séparation sur support chromatographique, deux facteurs influencent le comportement des molécules de l'échantillon: le débit volumétrique de la phase mobile et le mouvement provoquant la diffusion des molécules à l'intérieur et à l'extérieur de la phase stationnaire.
Le principe de la filtration sur gel est basé sur les capacités différentes des molécules à pénétrer dans les pores de la phase stationnaire. Les très grosses molécules ne pénètrent jamais dans le gel et traversent plus rapidement le support chromatographique. Les petites molécules entrent dans les pores du gel et se déplacent plus lentement. Les molécules sont donc éluées dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

2.2.4.2.2. Protocole

La colonne de chromatographie (Hiload Séphacryl S-300, 1,6 x 60 cm) est équilibrée dans du tampon Tris-HCl, 100 mM (pH 7,5) contenant du NaCl à la concentration de 0,1 M et du glycérol à 10%, ceci à un débit de 0,5 ml/min. Le volume interstitiel de la colonne (V_o) est déterminé à l'aide d'une solution de bleu dextran à 0,2% (MM = 2.000 kDa).

L'étalonnage est effectué en 2 passages (marqueurs notés 1 puis 2) avec le kit de protéines marqueurs Pharmacia dont la composition est la suivante:

Thyroglobuline (1)	669 kDa
Ferritine (2)	440 kDa
Catalase (1)	232 kDa

Aldolase (2)	158 kDa
Sérum albumine bovine (1)	67 kDa

Un échantillon de 0,5 à 1 ml contenant la protéine enzymatique est déposé sur la colonne puis élué à un débit de 0,3 ml. Des fractions de 1 ml sont collectées.

2.2.4.2.3. Expression des résultats

L'élution des protéines marqueurs est suivie par l'enregistrement de l'absorbance à 280 nm. La courbe de calibration est obtenue en portant le logarithme décimal de la masse moléculaire des protéines marqueurs en fonction du coefficient K_{av} qui est déterminé de la façon suivante:

$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$

V_o: volume mort de la colonne

V_e: volume d'élution de la protéine

V_t: volume total du gel (donné par le fabriquant)

Le volume d'élution de l'enzyme étudiée puis son K_{av} sont déterminés par localisation du pic d'activité dans les fractions d'élution. La masse moléculaire de l'enzyme est alors estimée à partir de la courbe de calibration; il existe en effet une relation linéaire entre le coefficient K_{av} et la masse moléculaire des protéines natives.

2.2.4.3. Représentation de Ferguson

2.2.4.3.1. Principe

Au cours de l'électrophorèse de protéines natives sur un gel de polyacrylamide, la séparation des protéines a lieu à la fois en fonction de leur taille et de leur différence de charge. En construisant le diagramme de Ferguson, la charge est éliminée par le fait que le coefficient de retardement, K_r, est une mesure de la masse moléculaire (Hames et Rickwood, 1990). Il existe en effet une relation linéaire entre le coefficient K_r et la masse moléculaire des protéines natives.

2.2.4.3.2. Protocole

Les extraits enzymatiques à forte activité GS sont déposés sur des gels de concentration variable en acrylamide (6, 7,5, 9 et 10,5%). Après électrophorèse, l'activité GS est révélée selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.3.1.3. Une gamme étalon est réalisée en déposant sur chacun de ces gels des protéines marqueurs citées dans le paragraphe 2.2.4.1.2. qui seront ensuite révélées au bleu de Coomassie.

2.2.4.3.3. Expression des résultats

L'expression du logarithme décimal du coefficient de mobilité, R_f, en fonction du pourcentage de concentration en acrylamide, permet d'obtenir une droite pour chacune des protéines marqueurs.

En établissant la pente de ces droites (coefficient de retardement, K_r) en fonction de la masse moléculaire des protéines, on obtient la droite d'étalonnage des protéines marqueurs. Il suffit ensuite de porter sur cette droite le K_r de l' enzyme, pour obtenir sa masse moléculaire.

2.3. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

2.3.1. Obtention des immunsérums purifiés

2.3.1.1. Synthèse des immunsérums

La meilleure synthèse d'anticorps anti-protéiques est obtenue avec les lapins. Pour chacune des deux enzymes, deux lapins (race "Fauve de Bourgogne") d'environ deux kg chacun ont été immunisés par des injections primaires sous-cutanées. En vue des injections, la GS est localisée sur un gel de polyacrylamide en tube par une légère révélation de son activité, puis la bande correspondant à l'enzyme est découpée et broyée avant d'être additionnée d'adjuvant de Freund dans les proportions suivantes:

-250 µl de suspension de gel d'acrylamide renfermant l'enzyme active soit 400 µg de GS
- 250 µl d'adjuvant complet de Freund

Chaque lapin reçoit une injection de 0,5 ml d'émulsion. Des injections intraveineuses de rappel (200 µg de GS) sont ensuite réalisées un mois puis un mois et demi après la première injection.

2.3.1.2. Purification des immunsérums

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau de la carotide, 15 jours après la dernière injection. La coagulation se poursuit pendant 1 heure à température ambiante puis pendant 12 h à 4°C. Le sérum est recueilli, puis le caillot centrifugé à vitesse lente (3000 rpm) pendant 5 min. Le caillot est ensuite lavé 3 fois avec de petits volumes de tampon borate dont la composition est la suivante:

Acide borique	0,05 M	(ajusté à pH 8,14 avec de la soude)
NaCl	0,9 %	

A 50 ml de sérum recueilli est ajouté un volume égal du même tampon saturé en sulfate d'ammonium. Après 1 heure d'agitation à température ambiante et 20 min de centrifugation à 40000*g*, le culot protéique est recueilli et resolubilisé dans 25 ml du tampon borate précédemment utilisé. A cette solution sont ajoutés 12,5 ml du tampon borate saturé en sulfate d'ammonium de façon à réaliser une précipitation des immunoglobulines G jusqu'à une saturation de 33% en sulfate d'ammonium. Le culot est repris dans 25 ml du tampon borate et dialysé 24 h contre ce tampon. L'extrait contenant 7,8 mg de protéines est stérilisé par filtration (filtre Sartorius; 0,2 µm) puis conservé au congélateur à - 80°C. Il constitue l'immunsérum anti-GS.

2.3.1.2. Isolement de la GS par chromatographie d'immunoabsorption

Afin d'obtenir de l'enzyme purifiée sans passer par les différentes étapes de purification, une colonne d'immunoabsorption, sur laquelle sont fixés des anticorps anti-GS, est réalisée. Le gel de chromatographie d'affinité utilisé est l'Ultrogel ACA 22 activé par le glutaraldéhyde (I.B.F.). Ce gel est particulièrement bien adapté pour l'immobilisation de protéines et pour des interactions entre macromolécules telles que l'interaction antigène-anticorps.
L'Ultrogel ACA 22 est tout d'abord lavé par 10 ml d'eau distillée sur du verre filtré (G4), puis par du tampon phosphate 0,4 M (pH 7,6). Le gel est repris par 10 ml de tampon phosphate de potassium 0,1 M (pH 7,6).Un volume de 5 ml d'immunsérum (40 mg de protéines) est ajouté à la suspension de l'Ultrogel et l'ensemble est mis en agitation douce durant une nuit à 4°C. Le gel est déposé dans une colonne puis rincé avec du tampon phosphate 0,4 M (pH 7,6). La colonne est lavée à 3 reprises par de l'éthanolamine 0,1 M dans du tampon carbonate 0,1 M (pH 8), puis laissée 4 à 5 heures en contact avec l'éthanolamine. L'ultrogel ACA 22 est enfin équilibré avec du tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 7,6).
L'utilisation du tampon Tris-HCl s'est révélée inefficace pour la fixation des anticorps anti-GS. En effet, les tampons possédant un groupement amine primaire ne peuvent être employés avec un tel gel.
C'est pourquoi l'extrait enzymatique partiellement purifié est tout d'abord repris dans du tampon phosphate 50 mM (pH 7,6) sur membrane Amicon avant d'être déposé sur la colonne d'immunoabsorption. Un rinçage est réalisé avec 10 ml de tampon phosphate 50 mM (pH 7,6), puis avec 10 ml de ce même tampon contenant 1 M de NaCl et enfin avec 10 ml de tampon phosphate 10 mM (pH 7,6). Les fractions issues de ce lavage sont récoltées et ne présentent aucune trace d'activité GS.

L'élution de l'enzyme est obtenue par rinçage de la colonne par l'eau distillée. L'enzyme est collectée en fractions de 2 ml dans 1 ml de tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7,6; $MgSO_4$ 10 mM; EDTA 4 mM; Glu 20 mM; glycérol 20%[v/v] et 28 mM 2-mercaptoéthanol). Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976).

2.3.2. Identification et contrôle de la spécificité

2.3.2.1. Empreintes Immunoélectrophorétiques

2.3.2.1.1. Principe

Pour déterminer la spécificité des immunsérums anti-GS, nous avons également réalisé des empreintes immunoélectrophorétiques (ou Western blot), par transfert des protéines sur une membrane d'Immobilon de type polyvinylidène difluoride (PVDF, Millipore), les protéines ayant été préalablement séparées sur gel d'acrylamide.

Après reconnaissance spécifique des protéines par leur anticorps (qui constituent l'immunsérum "primaire"), le complexe antigène-anticorps formé est visualisé par l'utilisation d'un deuxième immunsérum, dit immunsérum "secondaire", dont les immunoglobulines sont couplées à la phosphatase alcaline. La présence du marqueur sera alors visualisée par révélation de son activité enzymatique.
Une membrane d'immobilon de type PVDF a été utilisée préférentiellement aux membranes de nitrocellulose ou de nylon car elle permet d'établir des liaisons hydrophobes très fortes, avec une grande capacité de fixation des protéines. Elle est également compatible avec la plupart des techniques de coloration des protéines couramment utilisées, ainsi qu'avec la plupart des systèmes de détection immunochimiques.

2.3.2.1.2. Protocole

Après migration, le gel d'acrylamide est incubé en même temps que la membrane d'Immobilon pendant 10 min, dans le tampon d'électrotransfert dont la composition est donnée ci-dessous:

Tris-HCl (pH 8,3)	48	mM
Glycine	39	mM
SDS	0,0375	% (p/v)
Méthanol	20	% (v/v)

Le transfert est ensuite réalisé sur le système Multiphor II Novablot, en conditions semi-sèches, à raison de 0,8 mA/cm^2 par gel, pendant 1 heure. Après transfert, les sites de fixation libres de la membrane sont bloqués par incubation pendant une nuit, à 4°C, dans un tampon de saturation (tampon S) dont la composition est donnée ci-dessous:

Tris-HCl (pH 7,5)	10	mM
Lait en poudre (demi-écrémé)	10	%
NaCl	150	mM

Après mise en contact pendant 4 h à température ambiante avec l'immunsérum "primaire" (immunsérum anti-GS), dilué au 1/250ème dans le tampon S, la membrane est lavée pendant environ une heure, à raison de 3 ou 4 bains avec le tampon S, de façon à éliminer l'excès d'anticorps, puis est placée 1 heure dans ce même tampon de saturation contenant alors l'immunsérum "secondaire" (anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin marqués à la phosphatase alcaline), à la dilution de 1/3000.
Après de nouveaux lavages de la membrane pendant environ 1 heure, les complexes antigène-anticorps sont visualisés par incubation de la membrane pendant 10 à 20 min dans le milieu de révélation de l'activité enzymatique phosphatase alcaline, dont la composition est donnée ci-dessous:

Bicarbonate de sodium (pH 9,8)	0,1	M
$MgCl_2$	1	mM
Nitroblue tétrazolium (NBT)	0,03	%
Bromochloroindolylphosphate (BCIP)	0,015	%

Le BCIP et le NBT, insolubles dans l'eau, sont préalablement solubilisés dans une fraction aliquote de diméthylformamide.

2.3.2.2. Immunoprécipitation quantitative

Des quantités croissantes d'immunsérum sont ajoutées à différentes fractions renfermant un volume fixe d'extrait enzymatique partiellement purifié. L'extrait est alors incubé 1 h à température ambiante puis une nuit à 4°C. L'extrait est alors centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min. Les activités enzymatiques sont mesurées dans le surnageant.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 - Étude de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme azoté de l'association ectomycorhizienne Douglas/*Laccaria laccata.*

Étude de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme azoté de l'association ectomycorhizienne Douglas/Laccaria laccata.
(Bedell JP, Garnier A, Pireaux JC, Chalot M, Brun A et Botton B, *Acta Botanica Gallica*, 1994).

3.2 - Purification et propriétés de la glutamine synthetase des racines de Douglas.

Purification et *properties of glutamine synthetase from Douglas fir roots.*
(Bedell Jean-Philippe, Chalot Michel, Brun Annick et Botton Bernard, *Physiologia Plantarum*, 1995).

3.3 - La glutamine synthetase au cours des jeunes stades de croissance du Douglas.

*Glutamine synthetase during early development of Douglas fir (*Pseudotsuga menziessi *Mirb. Franco) seedlings.*
(Bedell JP, Chalot M, Garnier-Petit A et Botton B, *Australian Journal of Plant Physiology*, soumis)

3.4 - Effets de la source azotée sur la croissance et l'activité de quelques enzymes du métabolisme azoté du Douglas.

Effects of nitrogen sources on growth et *activity of some enzymes of nitrogen metabolism in Douglas fir.*
(Bedell JP, Chalot M et Botton B, *Physiologia Plantarum*, soumis)

3.1. Étude de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme azoté de l'association ectomycorhizienne Douglas/*Laccaria laccata*.

Résumé

Le champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata* possède une glutamate déshydrogénase (GDH) à NADP ayant une bonne affinité pour l'ammonium (Km : 5 mM) et une GDH à NAD ayant une forte affinité pour le glutamate (Km : 0,24 mM), ce qui est en accord avec les rôles anabolique et catabolique généralement attribués respectivement à chacune de ces enzymes. Les glutamines synthétases (GS) du champignon et de la racine du Douglas montrent une très grande affinité pour l'ammonium (Km : 24 et 28 µM), ce qui donne à penser qu'elles sont fortement impliquées dans l'assimilation de l'azote ammoniacal. La GDH à NAD trouvée chez *Laccaria laccata* en culture pure n'est pas détectée dans les mycorhizes de Douglas, alors que la GDH à NADP et la GS fongiques restent actives dans les tissus symbiotiques. Le marquage immunologique à l'or colloïdal montre que ces deux dernières enzymes sont localisées dans le cytosol des cellules fongiques et qu'elles sont uniformément réparties au sein de la mycorhize. Les deux isoformes de l'aspartate aminotransférase (AAT) mises en évidence chez *Laccaria laccata* en culture pure ne sont pas détectées dans les ectomycorhizes de Douglas. Ce résultat concorde avec les travaux antérieurs qui ont constamment montré une répression de cette enzyme fongique dans les associations ectomycorhiziennes.

Mots clés : aspartate aminotransférase; ectomycorhizes; glutamate déshydrogénase; glutamine synthétase; *Laccaria laccata*; *Pseudotsuga menziesii*.

Acta bot. Gallica, 1994, 141 (4), 483-490.

Etude de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme azoté de l'association ectomycorhizienne Douglas/*Laccaria laccata*

par Jean-Philippe Bedell, Agathe Garnier, Jean-Claude Pireaux, Michel Chalot, Annick Brun et Bernard Botton

Laboratoire de Biologie forestière associé INRA, Université de Nancy I, B.P. 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex

Résumé.- Le champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata* possède une glutamate déshydrogénase (GDH) à NADP ayant une bonne affinité pour l'ammonium (Km : 5 mM) et une GDH à NAD ayant une forte affinité pour le glutamate (Km : 0,24 mM), ce qui est en accord avec les rôles anabolique et catabolique généralement attribués respectivement à chacune de ces enzymes. Les glutamine synthétases (GS) du champignon et de la racine du Douglas montrent une très grande affinité pour l'ammonium (Km : 24 et 28 µM), ce qui donne à penser qu'elles sont fortement impliquées dans l'assimilation de l'azote ammoniacal. La GDH à NAD présente chez *Laccaria laccata* en culture pure n'est pas détectée dans les mycorhizes de Douglas, alors que la GDH à NADP et la GS fongiques restent actives dans les tissus symbiotiques. Le marquage immunologique à l'or colloïdal montre que ces deux dernières enzymes sont localisées dans le cytosol des cellules fongiques et qu'elles sont uniformément réparties au sein de la mycorhize. Les deux isoformes de l'aspartate aminotransférase (AAT) mises en évidence chez *Laccaria laccata* en culture pure ne sont pas détectées dans les ectomycorhizes de Douglas. Ce résultat concorde avec les travaux antérieurs qui ont constamment montré une répression de cette enzyme fongique dans les associations ectomycorhiziennes.

Summary.- The ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* was found to contain two different glutamate dehydrogenases (GDH) ; one is dependent on NADP as cofactor whereas the other utilizes NAD. The NADP-GDH exhibited a fairly good affinity for ammonium (Km : 5 mM) and NAD-GDH exhibited a high affinity for glutamate (Km : 0,24 mM) which is consistent with an anabolic role for the former enzyme and a catabolic role for the latter. Both fungal and Douglas-fir root glutamine synthetases (GS) were found to have a very high affinity for ammonium (Km : 24 and 28 µM), suggesting that these enzymes can play a key role in the assimilation of ammonium into amino acids. The NAD-GDH found in the free-living *Laccaria laccata* was suppressed in Douglas-fir ectomycorrhizas, while the fungal NADP-GDH and GS remained active in symbiotic tissues. Immunogold labelling also indicated the presence of both enzymes which were found to be located in the cytosol of the fungal cells

© Société botanique de France 1994. ISSN 1253-8078.

and evenly distributed in the ectomycorrhizas. Aspartate aminotransferase (AAT), clearly expressed as two isoforms in *Laccaria laccata* cultivated in pure culture was not detected in Douglas ectomycorrhizas, which is in agreement with previous data indicating a constant repression of this fungal enzyme in ectomycorrhizal associations.

Key words : aspartate aminotransferase - ectomycorrhizas - glutamate dehydrogenase - glutamine synthetase - *Laccaria laccata* - *Pseudotsuga menziesii.*

INTRODUCTION

Les mycorhizes sont des associations symbiotiques entre les plantes supérieures et les champignons qui se développent spontanément dans la nature. La plante-hôte fournit essentiellement au champignon des substances carbonées. Le champignon, quant à lui, alimente la plante-hôte en éléments minéraux, notamment en azote et en phosphore. Les bases physiologiques de ces effets bénéfiques ont déjà été décrites antérieurement (Dexheimer *et al.*, 1985 ; Martin *et al.*, 1987). L'amélioration de la nutrition de la plante est d'autant plus importante que les éléments concernés sont peu mobiles et en faible concentration dans le sol. L'azote étant un des facteurs les plus limitant de la croissance de la plante-hôte dans un système forestier (Kramer et Kozlowski, 1979), il est apparu intéressant d'étudier des enzymes impliquées dans le métabolisme azoté d'une telle association symbiotique. Certains travaux ont déjà montré que l'assimilation de l'azote par les associations ectomycorhiziennes subit de profondes modifications par rapport aux partenaires cultivés séparément. Ainsi, la GDH à NADP fongique est réprimée dans les ectomycorhizes de Hêtre associé à *Lactarius* sp. (Martin *et al.*, 1986), à *Paxillus involutus* et à *Hebeloma crustuliniforme* (Dell *et al.*, 1989). En revanche, dans les ectomycorhizes d'Epicéa, la GDH à NADP fongique reste présente et fonctionnelle (Dell *et al.*, 1989 ; Chalot *et al.*, 1991).

Cette étude porte sur l'association Douglas (*Pseudotsuga menziesii*)/*Laccaria laccata* et sur chacun des deux partenaires. Les enzymes retenues sont les suivantes : glutamine synthétase (EC 6.3.1.2.), glutamate déshydrogénase à NAD (EC 1.4.1.2.) et à NADP (EC 1.4.1.4.), et aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1.). La glutamine synthétase (GS) et les glutamates déshydrogénases (GDH) interviennent préférentiellement dans l'assimilation primaire de l'ammonium, alors que l'aspartate aminotransférase (AAT) joue un rôle important dans la redistribution de l'azote assimilé par les enzymes précédentes (Wightman et Forest, 1978).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel biologique

Environ 20 implants de *Laccaria laccata*, souche S 238, sont prélevés à partir de culture sur milieu de Pachlewski solide, puis déposés dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 125 ml de milieu de Pachlewski liquide. Les fioles sont placées durant 3 semaines sur un agitateur rotatif (142 rotations par minute). Cette méthode fournit un mycélium sous forme d'agrégats sphériques. Les plants ont été mycorhizés en présence de billes d'alginate renfermant le champignon selon la méthode décrite par Duponnois et Garbaye (1991). Les plants de Douglas sont cultivés dans un mélange tourbe-vermiculite.

Dosages enzymatiques

Le broyage des différents tissus (racines non mycorhizées, mycorhizes et mycélium) s'effectue à l'aide d'un mortier en présence de sable de Fontainebleau. La composition du tampon d'extraction utilisé est la suivante : tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), ß-mercaptoéthanol 14 mM, EDTA 2 mM, $MgSO_4$ 10 mM, PVP-40 2 % (m/v), PVPP 10 % (m/m), glycérol 10 % (v/v). Le broyage de 600 mg de matière fraîche s'opère en présence de 1,5 ml de tampon. L'extrait obtenu est

ensuite centrifugé à 40000 g durant 30 min. et le dosage des activités s'effectue à partir du surnageant.

Les activités enzymatiques sont mesurées par spectrophotométrie. Les GDH sont dosées à 340 nm. Le milieu de dosage a la composition suivante : tampon phosphate 100 mM (pH 7,4), $(NH_4)_2SO_4$ 140 mM, NAD(P)H 200 µM, α-cétoglutarate 5 mM. L'activité GS est déterminée à 540 nm (réaction transférasique) ou à 340 nm (réaction biosynthétique) selon la méthode de Winter *et al.* (1982). L'activité aspartate aminotransférase est déterminée par une technique couplée à la malate déshydrogénase décrite par Sizer et Jenkins (1962).

Les propriétés physico-chimiques des différentes enzymes ont été étudiées à partir d'extraits enzymatiques partiellement purifiés par passage sur colonne échangeuse d'ions de type DEAE-Trisacryl. Les profils électrophorétiques des différentes enzymes ont été réalisés sur des gels uniformes de polyacrylamide à 6 %. Les activités GS, GDH à NAD et AAT ont été révélées sur ces gels selon les protocoles décrits respectivement par Winter *et al.* (1982), Blumenthal et Smith (1973) et Chalot *et al.* (1990).

Techniques immunocytochimiques

Des anticorps dirigés contre la GS et la GDH à NADP fongiques ont permis de localiser ces deux enzymes sur coupe ultrafine en microscopie électronique. Les enzymes sont visualisées grâce à des anticorps secondaires (anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin) conjugués à des particules d'or colloïdal de 10 nm de diamètre.

RÉSULTATS

Constantes d'affinité des enzymes pour leurs substrats

La valeur des Km apparents est déterminée en utilisant la représentation de Lineweaver et Burk, en faisant varier la concentration d'un substrat, celle des autres demeurant constante.

En ce qui concerne les GDH fongiques, la GDH à NAD possède une forte affinité pour le glutamate et une affinité moins élevée pour l'ammonium (Tableau I). Des résultats opposés sont trouvés pour la GDH à NADP. Chez *L. laccata* les concentrations intracellulaires en ammonium et en glutamate sont respectivement de 2-4 mM et de 0,5-1 mM (Brun *et al.*, 1992). Ceci tend à confirmer le rôle anabolique de la GDH à NADP impliquée dans la synthèse de glutamate, en accord avec ce qui a été déterminé chez d'autres organismes fongiques (Smith *et al.*, 1975 ; Botton et Msatef, 1983), et le rôle catabolique de la GDH à NAD impliquée dans la dégradation du glutamate, comme cela a été démontré chez les plantes supérieures (Robinson *et al.*, 1991). Les deux GDH du champignon semblent donc être régulées de façon opposée par les concentrations cellulaires en glutamate et en ammonium.

La GS, qu'elle soit fongique ou racinaire, présente une relativement bonne affinité pour le glutamate, mais le fait le plus frappant est son extrême affinité pour l'ammonium avec des valeurs de Km environ 200 fois plus faibles que celles de la GDH à NADP (Tableau I). Ceci conforte le rôle prépondérant attribué à la GS dans l'assimilation de l'ammonium chez *L. laccata*. Enfin, la GS fongique a davantage d'affinité pour les nucléotides phosphate que la GS racinaire (Tableau I).

Modifications enzymatiques induites lors de la mycorhization

L'activité GDH à NAD observée dans la mycorhize est environ 3 fois plus élevée que celle mesurée dans les racines (Tableau II). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'activité très intense rencontrée dans le champignon (Tableau II). Cependant, il n'en est rien, puisque les profils électrophorétiques révèlent que seule la GDH à NAD racinaire est conservée dans la mycorhize (Fig. 1A) où son activité serait par conséquent stimulée.

Contrairement à la GDH à NAD, la GDH à NADP fongique ne semble pas être réprimée dans les mycorhizes. En effet, aucune activité GDH à NADP racinaire n'ayant été détectée, l'activité mesurée dans les tissus mycorhiziens provient très vraisemblablement de l'enzyme fongique.

Tableau I.- Constantes d'affinité des glutamate déshydrogénases fongiques et des glutamine synthétases fongique et racinaire.
Table I.- Apparent Km values for fungal glutamate dehydrogenases and for fungal and root glutamine synthetases.

	Enzyme fongique			Enzyme racinaire
	GDH à NADP	GDH à NAD	GS	GS
Ammonium	5 mM	37 mM	24 µM	28 µM
Glutamate	26 mM	0,24 mM	3,2 mM	2,6 mM
Glutamine	- -	- -	30 mM	10,5 mM
α-cétoglutarate	1 mM	1,3 mM	- -	- -
NADP	30 µM	- -	- -	- -
NADPH	10 µM	- -	- -	- -
NAD	- -	282 µM	- -	- -
NADH	- -	89 µM	- -	- -
ADP	- -	- -	2 µM	83 µM
ATP	- -	- -	0,18 mM	0,5 mM

Tableau II.- Activités des glutamate déshydrogénases, de la glutamine synthétase et de l'aspartate aminotransférase dans les racines mycorhizées et non mycorhizées de Douglas et dans le champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata* en culture pure.
Table II.- Activities of glutamate dehydrogenases, glutamine synthetase, and aspartate aminotransferase in mycorrhizal and nonmycorrhizal Douglas roots and in the free-living ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*.

Enzyme	Activité (nkat.g^{-1} Matière Fraîche)		
	racine non mycorhizée	mycorhize	*Laccaria laccata* en culture pure
GDH à NAD	2,9 ± 0,25	9,3 ± 0,8	67,3 ± 4,2
GDH à NADP	n.d.	3,4 ± 0,3	36,3 ± 2,1
GS	20,6 ± 4,7	18,4 ± 2,7	15,4 ± 3,4
AAT	21,8 ± 1,3	17,2 ± 1,8	85,0 ± 3,5

n.d. : non détecté

En ce qui concerne la GS, les activités mesurées dans les différents tissus sont très voisines (Tableau II).

Enfin, les profils électrophorétiques de l'aspartate aminotransférase révèlent la présence dans le champignon en culture pure de deux isoformes qui disparaissent dans les tissus symbiotiques où seule l'isoforme trouvée dans les racines non mycorhizées est présente (Fig. 1B).

Localisation de la GS et de la GDH à NADP fongiques dans les mycorhizes

Le marquage à l'or colloïdal à l'aide d'anticorps montre que la GDH à

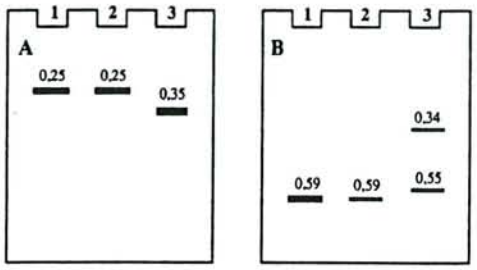


Fig. 1.- Représentation schématique des profils électrophorétiques sur gel non dénaturant à 6 % de polyacrylamide de la glutamate déshydrogénase à NAD (A) et de l'aspartate aminotransférase (B) des racines mycorhizées et non mycorhizées de Douglas et du champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata*. Puits 1 : racine non mycorhizée ; puits 2 : mycorhize ; puits 3 : *L. laccata*. Les chiffres au niveau des bandes d'activité enzymatique indiquent la valeur des Rf.

Fig. 1.- Diagram of the electrophoretic patterns on 6% native polyacrylamide gels of NAD-glutamate dehydrogenase (A) and aspartate aminotransferase (B) from mycorrhizal and nonmycorrhizal Douglas roots and from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. Well 1 : nonmyccorhizal root ; well 2 : mycorrhiza ; well 3 : *L. laccata*. Figures above the bands denote Rf values.

NADP et la GS sont localisées dans le cytoplasme des cellules fongiques. La GS s'accumule souvent dans des granules dont la nature n'a pu être précisée jusqu'à présent (Brun *et al.*, 1994). De plus, quelle que soit l'enzyme, le marquage est uniforme au sein des différents tissus fongiques (Tableau III). Ainsi, les cellules du réseau de Hartig possèdent une densité de marquage équivalente à celle des cellules du manteau. Dans ce type de mycorhize, il n'existe donc pas de gradient de répartition des deux enzymes étudiées, comme cela avait été mis en évidence dans les mycorhizes d'Epicéa pour la GDH à NADP (Chalot *et al.*, 1989). Enfin, il est à noter que dans les cellules fongiques, la GS est une enzyme abondante représentant environ 3 % des protéines solubles, tandis que la GDH à NADP n'en représente que 0,15 % (Brun *et al.*, 1992).

DISCUSSION

Ces travaux entrepris chez *L. laccata* montrent que la GDH à NADP catalyserait préférentiellement la synthèse de glutamate, alors que la GDH à NAD interviendrait plutôt dans la dégradation de cet acide aminé. Ces deux enzymes étant toutes deux cytosoliques chez les champignons, elles sont vraisemblablement régulées différemment, comme cela a été montré chez divers organismes (Miflin et Lea, 1980 ; Stewart *et al.*, 1980). En outre, les deux enzymes pourraient s'exprimer à des stades de croissance différents ; des études récentes ont en effet montré que chez *Laccaria bicolor*, la GDH à NADP s'exprime davantage en phase exponentielle de croissance, alors que la GDH à NAD est plus active en phase stationnaire de croissance (Ahmad *et al.*, 1990). D'autre part, l'existence de plusieurs pools de glutamate dans la cellule semble manifeste (Martin *et al.*, 1988 ; Chalot *et al.*, 1994) et, dans ce cas, les deux GDH ne métaboliseraient pas forcément le même pool de cet acide aminé.

Chez le champignon en culture pure, les valeurs des Km de la GDH à NADP et de la GS pour l'ion ammonium indiquent que cette dernière enzyme pourrait intervenir préférentiellement dans l'assimilation primaire de l'ammonium. Néanmoins, ce résultat devra être complété par des études isotopiques et une meilleure connaissance des enzymes lors de la croissance des champignons. En effet, d'après Genetet *et al.* (1984), 70 % de l'ammonium est métabolisé par la GDH à NADP et 30 % par la GS chez *Cenococcum geophilum*, mais ceci n'est valable qu'en phase stationnaire de croissance, ces proportions s'inversant lorsque le champignon se développe rapidement. La fourniture d'azote peut aussi jouer un rôle déterminant. Ainsi, chez *Neurospora crassa* cultivé en pré-

Tableau III.- Localisation et quantification de la glutamate déshydrogénase à NADP (GDH à NADP) et de la glutamine synthétase (GS) fongiques dans les ectomycorhizes de Douglas/*Laccaria laccata*. Les coupes ultraminces ont été marquées avec les anticorps obtenus contre les enzymes purifiées du champignon. Les particules d'or colloïdal ont un diamètre de 10 nm.

Table III.- Localization and quantification of fungal NADP-glutamate dehydrogenase (NADP-GDH) and glutamine synthetase (GS) in Douglas-fir/*Laccaria laccata* ectomycorrhizas. Antiserum raised against *Laccaria laccata* NADP-GDH and GS were used to label ultrathin sections with 10 nm gold particles.

Tissus et fractions cellulaires fongiques de la mycorhize	Nombre de particules d'or/µm²	
	GDH à NADP	GS
Cellules périphériques		
cytoplasme	13,2	76
granules	(a)	300
bruit de fond	0,6	3,5
Cellules du manteau		
cytoplasme	24	71,5
granules	(a)	420
bruit de fond	1,3	5,2
Réseau de Hartig		
cytoplasme	17,2	83,9
granules	(a)	(a)
bruit de fond	1,5	3,6

(a) : pas de granule détectable.

sence d'un excès d'ammonium, les deux enzymes (GDH à NADP et GS) participent à l'assimilation de l'ammonium (Hernandez *et al.*, 1983). En revanche, lorsque le milieu de culture est limitant en azote, l'ammonium est principalement incorporé par la voie GS/GOGAT (Lara *et al.*, 1982). Chez les mycorhizes d'Epicéa associé à l'Hébélome, il a été montré que le champignon incorpore environ 1/3 de l'ammonium par la GDH à NADP et 2/3 par la voie de la GS (Chalot *et al.*, 1991).

Les études réalisées chez les deux partenaires symbiotiques et dans les tissus mycorhiziens ont révélé des modifications dans l'expression des enzymes. Ainsi, la GDH à NAD de *L. laccata* est réprimée dans les ectomycorhizes de Douglas. Par contre, la GDH à NADP s'exprime, ce qui est en accord avec l'immunodétection de cette enzyme dans les tissus symbiotiques. L'assimilation de l'azote dans l'association Douglas/*Laccaria laccata* se fait donc très vraisemblablement en partie par la GDH à NADP fongique comme cela a été démontré dans l'association Epicéa/*Hebeloma* sp. (Chalot *et al.*, 1991). La répression de la GDH à NAD fongique a également été mise en évidence dans les ectomycorhizes d'Eucalyptus où le champignon symbiote était une souche australienne de *L. laccata* (Botton et Dell, 1994). Dans ce cas, la GDH à NADP fongique était aussi réprimée,

contrairement à ce qui a été trouvé dans ce travail qui a utilisé la souche fongique S 238 d'origine américaine. La répression de plus grande ampleur notée chez les mycorhizes d'Eucalyptus peut aussi bien être due à la plante-hôte qu'à l'utilisation d'une souche différente de Laccaire. On sait que la souche S 238 de *Laccaria* mycorhize très mal l'Eucalyptus (Dell, comm. pers.), mais il serait sans doute intéressant de mycorhizer le Douglas avec la souche australienne ce qui, en cas de succès, permettrait de mieux cerner le rôle de la plante-hôte dans la répression des GDH fongiques.

Les techniques de localisation immunologique révèlent la présence de GS fongique dans les tissus ectomycorhiziens, aussi peut-on penser qu'elle demeure active dans la mycorhize, mais ceci devra être confirmé par les techniques isotopiques et électrophorétiques qui font appel à l'activité de l'enzyme.

Enfin, les deux isoformes de l'aspartate aminotransférase fongique sont absentes des tissus mycorhiziens, ce qui est en accord avec la constante répression de cette enzyme trouvée chez les mycorhizes étudiées (Chalot *et al.*, 1990 ; Botton et Dell, 1994). La répression de certaines enzymes dans le compartiment fongique de la mycorhize va aboutir à un métabolisme propre à la mycorhize, sensiblement différent de ceux des partenaires, avec des échanges d'acides aminés, vraisemblablement dans les deux directions (Rabbani *et al.*, 1992). Cela témoigne que la mycorhize constitue un système intégré à part entière.

BIBLIOGRAPHIE

Ahmad I., T.J. Carleton, D.W. Malloch & J.A. Hellebust, 1990.- Nitrogen metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (R Mre) Orton. *New Phytol.*, **116**, 431-441.

Blumenthal K.M. & E.L. Smith, 1973.- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, **248**, 6002-6008.

Botton B. & B. Dell, 1994.- Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase expression in Eucalyptus ectomycorrhizas. *New Phytol.*, **126**, 249-257.

Botton B. & Y. Msatef, 1983.- Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Sphaerostilbe repens*. *Physiol. Plant.*, **59**, 438-444.

Brun A., M. Chalot, B. Botton & F. Martin, 1992.- Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiol.*, **99**, 938-944.

Brun A., M. Chalot, R. Duponnois, B. Botton & J. Dexheimer, 1994.- Immunogold localization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase of *Laccaria laccata* in Douglas-fir ectomycorrhizas. *Mycorrhiza* (in press).

Chalot M., A. Brun & B. Botton, 1989.- Occurence and distribution of the fungal NADP-dependent glutamate dehydrogenase in spruce and beech ectomycorrhizas. *In* : Fast Growing Trees and Nitrogen Fixing Trees. Werner D. & P. Müller (eds.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 324-327.

Chalot M., A. Brun, R.D. Finlay & B. Söderström, 1994.- Metabolism of [^{14}C] glutamate and [^{14}C] glutamine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*, **140**, 1641-1649.

Chalot M., G.R. Stewart, A. Brun, F. Martin & B. Botton, 1991.- Ammonia assimilation by spruce-*Hebeloma* sp. ectomycorrhizas. *New Phytol.*, **119**, 541-550.

Chalot M., A. Brun, A. Khalid, B. Dell, R. Rohr & B. Botton, 1990.- Occurrence and distribution of aspartate aminotransferases in spruce and beech ectomycorrhizas. *Can. J. Bot.*, **68**, 1756-1762.

Dell B., B. Botton, F. Martin & F. Le Tacon, 1989.- Glutamate dehydrogenase in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytol.*, **111**, 683-692.

Dexheimer J., C. Kreutz-Jeanmaire, J. Gérard, V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi, 1985.- Approche cellulaire du fonctionnement des endomycorhizes à vésicules et arbuscules : les plasmalemmes de l'interface. *In* : Aspects Physiologiques et Génétiques des Mycorhizes, Actes du 1er Symposium Européen sur les Mycorhizes, Dijon, 1-5 Juillet 1985. Gianinazzi-Pearson V. & S. Gianinazzi (eds.), INRA, Paris, 277-283.

Duponnois R. & J. Garbaye, 1991.- Technics for controlled synthesis of the Douglas fir-*Laccaria*

laccata ectomycorrhizal symbiosis. *Ann. Sci. For.*, **48**, 641-650.

Genetet I., F. Martin & G.R. Stewart, 1984.- Nitrogen assimilation in mycorrhizas. Ammonium assimilation in the N-starved ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *Plant Physiol.*, **76**, 395-399.

Hernandez G., R. Sanchez-Pescador, R. Palacios & J. Mora, 1983.- Nitrogen source regulates glutamate dehydrogenase NADP synthesis in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, **154**, 524-528.

Kramer P.J. & T.T. Kozlowski, 1979.- Nitrogen metabolism and nutrition. *In* : Physiology of Woody Plant, Academic Press, New York, London.

Lara M., L. Blanco, M. Campomanes, E. Calva, R. Palacios & J. Mora, 1982.-Physiology of ammonium assimilation in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, **133**, 1235-1242.

Martin F., M. Ramstedt & K. Söderhall, 1987.- Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *Biochimie*, **69**, 569-581.

Martin F., G.R. Stewart, I. Genetet I. & F. Le Tacon, 1986.- Assimilation of $^{15}NH_4^+$ by beech (*Fagus sylvatica* L.) ectomycorrhizas. *New Phytol.*, **102**, 85-94.

Martin F., G.R. Stewart, I. Genetet & B. Mourot, 1988.- The involvement of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in ammonia assimilation by the rapidly growing ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum geophilum* Fr. *New Phytol.*, **110**, 541-550.

Miflin B.J. & P.J. Lea, 1980.- Ammonia assimilation. *In* : The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Miflin B.J. (ed.), Vol. **5**, Academic Press, New York, 169-202.

Rabbani S., M. Chalot M., B. Botton & F. Martin, 1992.- Utilisation de l'alanine par les plantules d'Eucalyptus associées au champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. *Bull. Acad. et Soc. Lorraines des Sciences*, **31**, 131-139.

Robinson S.A., A.P. Slade, G.G. Fox, R. Phillips, R.G. Ratcliffe & G.R. Stewart, 1991.- The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.*, **95**, 509-516.

Sizer I.W. & W.T. Jenkins, 1962.- Glutamic aspartic transaminase from pig ventricles. *Methods Enzymol.*, **5**, 677-684.

Smith E.L., B.M. Austen, K.M. Blumenthal & J.F. Nyc, 1975.- Glutamate dehydrogenase. *In* : The enzymes. Boyer P. (ed.), Vol. **11**, Academic Press, New York, 293-367.

Stewart G.R., A.F. Mann & P.A. Fentem, 1980.- Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. *In* : The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Miflin B.J. (ed.), Vol. **5**, Academic Press, New York, 271-327.

Wightman F. & J.C. Forest, 1978.- Properties of plant aminotransferases. *Phytochem.*, **17**, 1455-1471.

Winter H.C., G.K. Powell & E.E. Dekker, 1982.- Glutamine synthetase of germinating peanuts. *Plant Physiol.*, **69**, 41-47.

3.2. Purification et propriétés de la glutamine synthétase des racines de Douglas.

Résumé

La glutamine synthétase (GS, EC 6.3.1.2) a été purifiée à homogénéité électrophorétique chez les racines de Douglas selon un protocole en trois étapes incluant une chromatographie échangeuse d'ions (DEAE-Trisacryl), une chromatographie d'affinité sur la Matrex Gel Red A et un gel d'électrophorèse préparatif en polyacrylamide. L'enzyme a été purifiée 40 fois avec un rendement de 16%. L'enzyme native présente un poids moléculaire de 460 ± 5 kDa estimé par filtration moléculaire, par la représentation de Fergusson et par l'emploi de gel en gradient d'acrylamide en condition non dénaturante. Cette enzyme apparaît constituée de deux sous-unités différentes de 54 et 64 kDa. Les constantes d'affinité de la GS pour le glutamate, la glutamine, l'ATP et l'ADP sont respectivement de 2,6, 10,5, 0,5 et 0,083 mM. L'enzyme présente une coopérativité négative pour l'ammonium (nombre de Hill de 0,7) avec deux valeurs de Km de 11 et 75 µM respectivement en présence de concentrations en ammonium plus petites ou plus grandes que 1,3 mM. La glycine et l'ADP apparaissent comme des inhibiteurs potentiels de l'activité GS. Les valeurs de pH optimum sont respectivement de 7,2 et 7,6 pour la réaction transférasique et biosynthétique. L'enzyme perd 30% de son activité au bout de 25 jours de stockage à 4°C. Les températures optimales de l'activité sont respectivement de 40°C et 45°C pour les activités transférasiques et biosynthétiques.

Mots clés : Douglas; glutamine synthétase; métabolisme de l'ammonium; propriétés cinétiques; *Pseudotsuga menziesii*; purification d'enzyme.

PHYSIOLOGIA PLANTARUM 94: 597–604. 1995
Printed in Denmark – all rights reserved

Copyright © Physiologia Plantarum 1995
ISSN 0031-9317

Purification and properties of glutamine synthetase from Douglas fir roots

Jean-Philippe Bedell, Michel Chalot, Annick Brun and Bernard Botton

Bedell, J.-P., Chalot, M., Brun, A. and Botton, B. 1995. Purification and properties of glutamine synthetase from Douglas fir roots. – Physiol. Plant. 94: 597–604.

Glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2) was purified to apparent electrophoretic homogeneity from roots of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco by a three-step procedure involving diethylaminoethyl (DEAE)-Trisacryl chromatography, affinity chromatography on Matrex Gel Red A, and preparative polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme was purified 40-fold with a 16% recovery. The native enzyme had a molecular mass of 460 ± 5 kDa as estimated by gel filtration, interpolation of the Ferguson plots and non-denaturing gradient-PAGE. It was composed of two different subunits of 54 and 64 kDa. Affinity constants for glutamate (Glu), glutamine (Gln), ATP and ADP were 2.6, 10.5, 0.5 and 0.083 m*M*, respectively. The enzyme exhibited a negative cooperativity for ammonium (Hill number of 0.7) with two K_m values which were 11 and 75 μ*M* in the presence of ammonium concentrations lower and higher than 1.3 m*M*, respectively. Glycine and ADP appeared as potential inhibitors of the GS activity. The optimum pH values were 7.2 and 7.6 for the transferase and the biosynthetic assays, respectively. The enzyme lost 30% of its activity within 25 days of storage at 4°C. The optimum temperatures of activity were 40°C and 45°C for the transferase and biosynthetic activities, respectively.

Key words – Ammonium metabolism, Douglas fir, enzyme purification, glutamine synthetase, kinetic properties, *Pseudotsuga menziesii*.

J.-P. Bedell (corresponding author) et al., Univ. Henri Poincaré, Nancy I, Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie Forestière, associé INRA, B.P. 239, F-54506 Vandoeuvre Cedex, France.

Introduction

In conifer roots the assimilatory flow of free ammonium ions is considered far more important than that found in most other higher plants as ammonium is at a relatively high concentration in acidic forest soils and usually the sole available nitrogen (Berg 1986). This ion has to be assimilated into organic molecules because small increases in its concentration can result in physiological and metabolic disorders (Miflin and Lea 1980).

Two pathways for NH_4^+ assimilation have been described. One involves the enzyme glutamine synthetase (GS; L-glutamate:ammonia ligase, ADP forming, EC 6.3.1.2), which catalyzes the conversion of glutamate (Glu) to glutamine (Gln) through incorporation of free ammonium. According to Miflin and Lea (1980), glutamine synthetase is the major enzyme involved in the assimilation of ammonia into organic compounds in most higher plants. Many studies have dealt with the identification, the characterisation and the localisation of the different forms of GS in tissues of higher plants, and particularly of herbaceous species (Mc Nally and Hirel 1983, Ericson 1985, Yuan et al. 1993, Cabello et al. 1994). The second pathway involves the enzyme glutamate dehydrogenase (L-glutamate:NADP oxidoreductase, glutamate forming, EC 1.4.1.4), which catalyzes the conversion of α-ketoglutarate to Glu through incorporation of free ammonium. This enzyme, together with GS, is involved in the assimilation of NH_4^+ in fungi (Chalot et al. 1991a, Martin and Botton 1993, Botton and Chalot 1995) whereas it plays only a minor role in ammonium assimilation by higher plants (Miflin and Lea 1980, Vézina et al. 1992). In ectomycorrhizas, where fungal cells intimately colonise root tissue, the enzymology of nitro-

Received 25 January, 1995; revised 30 March, 1995

gen assimilation is altered in comparison with that of the two separate partners (Dell et al. 1989, Chalot et al. 1991b, Botton and Dell 1994). For example, in mycorrhizas of beech the NADP-GDH of the fungus is repressed, which is not the case in spruce or Douglas fir mycorrhiza where this enzyme is present (Dell et al. 1989). Using enzymological and immunological techniques, the fungal GS enzyme was found to be fully operative in spruce ectomycorrhizas (Chalot et al. 1991b) and was detected in Douglas fir mycorrhizas (Brun et al. 1993). However, the relative activities of plant and fungal GS were not clearly investigated.

Although extensive studies have been performed on pine (Vézina and Margolis 1990, Vézina et al. 1992, Canton et al. 1993) there is only little information available concerning the GS enzyme in woody species. As in higher plants, and especially trees, GS is the major enzyme involved in assimilation of inorganic nitrogen, it is of primary importance to know how this enzyme responds to different environmental conditions and particularly to the ammonium source which is the major form of nitrogen in forest soils. For these reasons, purification and characterisation of the GS from Douglas fir roots was undertaken.

Abbreviations – GS, glutamine synthetase; MSX, L-methionine-DL-sulfoximine; PVPP, polyvinylpolypyrrolidone.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) and Prolabo (Paris, France). DEAE-Trisacryl, HiLoad Sephacryl S-300, precast polyacrylamide gels (4–30%) and calibration kits (SDS-PAGE and gradient-PAGE) were obtained from Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Uppsala, Sweden) Matrex Gel Red A was from Amicon (Beverly, MA, USA).

Plant material and growth conditions

Seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco; Office National des Forêts, France, Zone 422, 1990) were obtained from the Laboratory of Forest Microbiology (Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches Forestières, Nancy, France). Seeds were surface sterilised in 30% (v/v) H_2O_2 for 60 min, washed for 4 h in sterile water, and placed on glucose (1 g l^{-1}) agar in order to detect contaminations (Duponnois and Garbaye 1991). Contaminated seeds were discarded and germinated seeds were transferred to tanks when taproots were 2–4 cm long. The tanks were filled with water-soaked Perlite. Seedlings were grown for 4 months in a climate-controlled growth chamber with 23°C and 60% relative humidity during the day, 19°C and 70% relative humidity at night, 15 h photoperiod with 47.5 µmol photons m^{-2} s^{-1} (Gro-Lux, Sylvania, Nancy, France). The nutrient solution contained (mg l^{-1}): NH_4NO_3 (100), Na_2HPO_4 (20), KCl (40), $CaCl_2$ (40), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (20), chelated Fe (5.6), $NaMoO_4 \cdot 7H_2O$ (0.001), $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.006), H_3BO_3 (0.09), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.1) and $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0.7).

Enzyme extraction and purification procedures

Roots were washed with distilled water, blotted on filter paper, weighed, and pulverised at 4°C in a chilled mortar and pestle with 30 volumes of buffer A (50 m*M* Tris-HCl, pH 7.6, 5 m*M* $MgSO_4$, 2 m*M* EDTA, 10 m*M* Glu, 10% [v/v] glycerol, 2% [w/v] PVP-40, 10% [w/w] PVPP, and 14 m*M* 2-mercaptoethanol). The homogenate was centrifuged at 40 000 *g* for 30 min. The resulting pellet was resuspended, homogenised with half the volume of the extraction buffer previously used, and centrifuged as before. The resulting supernatant fractions were pooled, filtered through a 0.45 µm filter (Millipore) and used for enzyme purification. All purification steps were carried out at 4°C. The crude filtrate was applied to a DEAE-Trisacryl column (2 × 20 cm) preequilibrated with buffer B (50 m*M* Tris-HCl, pH 7.6, 5 m*M* $MgSO_4$, 2 m*M* EDTA, 10 m*M* Glu, 10% [v/v] glycerol and 14 m*M* 2-mercaptoethanol). The column was washed with buffer B until A_{280} of the eluate was close to zero. A large single peak was eluted by a linear NaCl gradient (0 to 0.2 *M*) and fractions of approximately 2.5 ml were collected at a flow rate of 1.5 ml min^{-1}. Fractions containing the highest GS activity were pooled and applied to a column of Matrex Gel Red A (1 × 8 cm) preequilibrated with buffer B. The enzyme was eluted at 0.3 ml min^{-1} with buffer B supplemented with 5 m*M* ADP and 0.5 *M* NaCl. Fractions containing GS activity were concentrated by diafiltration in an Amicon cell and loaded onto a preparative polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out in a tube (1.8 × 16 cm) containing 20 ml of a 6% (w/v) polyacrylamide gel, with a current of 15 mA according to Botton and Msatef (1983). The gel was stained for GS biosynthetic activity and the band containing GS activity was removed. The enzyme was then eluted from this slice by using an electro-eluter (Model 422, Biorad, CA, USA) adjusted to 15 mA for 12 h in the presence of the elution buffer B.

The extracts used for determination of K_m values were those obtained after affinity chromatography on Matrex Gel Red A. For Glu and Mg^{2+}, extracts were prepared according to the procedure described above, except that Glu and Mg^{2+} were omitted from buffer B.

Enzyme and protein assays

GS activity was determined by a modification of the transferase assay as previously described by Brun et al. (1992). Protein contents were determined by the Bradford method (1976) using bovine serum albumin as a standard.

Electrophoresis

Uniform PAGE (6% resolving gels) was carried out in a Mini-Protean II unit (Biorad, CA, USA) for 1 h at constant voltage (200 V). Gradient PAGE was performed by using precast polyacrylamide gels (4–30%; Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Uppsala, Sweden) according to Botton and Msatef (1983). GS activity was determined immediately after electrophoresis by immersing the gels for 30 min at 30°C in the transferase or biosynthetic assay mixture and subsequent transfer to a ferric chloride reagent as described by Brun et al. (1992). SDS-PAGE (15% resolving gels) was performed in a Mini-Protean II electrophoresis unit at 200 V for about 90 min and gels were silver-stained as described by Botton and Chalot (1991).

Molecular mass determinations

Native molecular mass was determined as described by Brun et al. (1992) on uniform polyacrylamide gels at various concentrations of polyacrylamide (6, 7.5, 9, and 10.5%), or with gradient PAGE, or by gel filtration on a HiLoad Sephacryl S-300 High Resolution column (1.6 i.d. × 60 cm; Pharmacia LKB Biotechnology Inc.). Polyacrylamide gels and gel filtration column were calibrated as described by Brun et al. (1992).

Results and discussion

Extraction and stabilisation of the enzyme

Some potential protectants were added or omitted in the extraction medium and the GS activity was measured on crude preparations at various times after extraction in order to extract maximal activity and to improve GS stability.

The omission of one of the protectants in the extraction medium resulted in a 16 to 56% loss of activity when compared with the complete buffer (Tab. 1). PVP was the most effective in protecting the enzyme during the extraction process. Stability of the GS enzyme was also greatly improved by the presence of different protective agents. The absence of PVP in the extraction buffer resulted in a complete loss of GS activity in the root crude extract after only 5 days of storage at 4°C. To a lesser extent, EDTA, Glu, Mg^{2+} and PVPP also prevented a rapid decline in enzyme activity, as omission of these compounds resulted in 19, 21, 12 and 27% remaining activity after 15 days at 4°C (Tab. 1).

These protectants were tested at different concentrations and optimum extracted activity was found with 2 m*M* EDTA, 5 m*M* $MgSO_4$, 10 m*M* Glu and 10% (w/w) PVPP. The amount of GS activity extracted increased with increasing concentrations of PVP to a maximum at 2% PVP (w/v), and then decreased rapidly above this concentration (Fig. 1). Thiol compounds act as inhibitors of phenolic reactions, which cause enzyme inactivation in plant extracts (Mayer and Harel 1979). In fir root extracts, optimum GS activity was found at a concentration of 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol, whereas increasing concentrations of this thiol up to 0.5% and 1% (v/v) reduced enzyme activity by 50% and 78%, respectively. In crude extract of sunflower leaves, GS activity was also increased by addition of 2-mercaptoethanol and PVPP, an effective absorbent of phenolics (Cabello et al. 1994). The most stabilising concentration of glycerol for GS from Douglas fir roots was 10% (v/v). The optimum pH for extraction of GS from fir roots was 7.6, which is close to the buffer pH used by Vézina et al. (1988) for the extraction of GS from roots of jack pine. The detergent Nonidet P-40 was ineffective for both extracting and stabilising the enzyme from Douglas fir roots, whereas this compound was very efficient for extracting GS from roots of jack pine (Vézina et al. 1988).

Tab. 1. Effect of various protectants on extraction and stability at 4°C of the GS from Douglas fir roots. Values denote retained activity expressed in % of maximal activity equal to 100. The 100% of GS activity extracted represented 455 nkat from 25 g. ND, not detected. Data represent the means ± SD of 3 independant experiments.

Buffer	Time after extraction (days)				
	0	1	5	8	15
Buffer A (complete)	100	97 ± 1	94 ± 1	89 ± 2	81 ± 2
– Glu	59 ± 2	58 ± 2	50 ± 2	47 ± 1	21 ± 1
– $MgSO_4$	65 ± 2	57 ± 2	51 ± 2	34 ± 2	12 ± 2
– EDTA	84 ± 2	72 ± 1	64 ± 2	59 ± 2	19 ± 2
– PVP	44 ± 2	31 ± 2	1 ± 2	ND	ND
– PVPP	71 ± 2	67 ± 2	56 ± 2	41 ± 1	27 ± 1

Protein purification

The different steps for purification of GS from Douglas fir roots are summarized in Tab. 2. Anion-exchange chro-

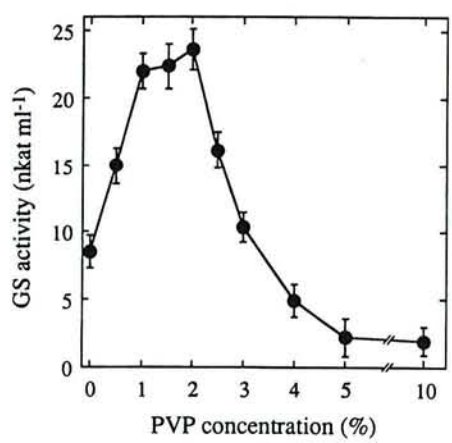


Fig. 1. Effect of PVP concentration on GS activity extracted from roots of Douglas fir. GS activity was determined by the transferase assay immediately after extraction. Concentration is expressed in weight percent PVP per volume of buffer A. Each point represents the mean ± SD of 3 independent experiments.

Tab. 2. Purification of GS from Douglas fir roots. Values are from 25 g of roots. Data are from one representative experiment out of three.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (nkat)	Specific activity (nkat [mg protein]$^{-1}$)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	24.6	458	18.6	100	1
DEAE-Trisacryl	1.4	252	184	55	10
Matrex Gel Red A	0.2	127	576	28	31
Preparative gel	0.1	74.4	744	16	40

matography proved to be very effective for GS purification since 94% of the total protein was eliminated, with a 55% recovery of the activity (Tab. 2). The enzyme was eluted from the DEAE-Trisacryl column as a single peak at 0.13 *M* NaCl. GS activity was eluted from Matrex Gel Red A, an affinity chromatography column, as a single peak with buffer B supplemented with 0.5 *M* NaCl and 5 m*M* ADP, which proved to be the optimal elution conditions. After this step, the preparation contained two bands, as revealed by native electrophoresis, and one of which corresponded to the GS activity. In order to eliminate the contaminating protein, fractions were concentrated by diafiltration and loaded on a preparative 6% polyacrylamide gel. The gel was stained for GS biosynthetic activity and the band part containing GS activity was cut out from the gel, and the enzyme electroeluted from this gel slice. After this final step, a single protein band was revealed by silver staining, corresponding to the band of GS activity, as revealed by the biosynthetic assay (Fig. 2) and the transferase assay (not shown). GS was purified 40-fold with 16% of the initial activity (Tab. 2).

From 25 g of Douglas fir roots, 100 μg of purified enzyme was obtained, an amount 4 times higher than for jack pine (Vézina and Margolis 1990). However, the yield (16%) was similar to that obtained by Vézina and Margolis (1990) who found a 14% recovery for the root GS of jack pine. The GS of fir roots was purified 40-fold to apparent electrophoretic homogeneity. The procedure used for purification of GS from rice roots was more efficient with a 79% recovery (Hirel and Gadal 1980), whereas the final specific activity (595 nkat mg^{-1} protein) was less than that obtained in the present study (744 nkat mg^{-1} protein). Similar purification yields concerning purification of different GS of higher plants have been published (Ericson 1985, Muhitch 1989, Mirando-Ham and Loyola-Vargas 1992, Yuan et al. 1993).

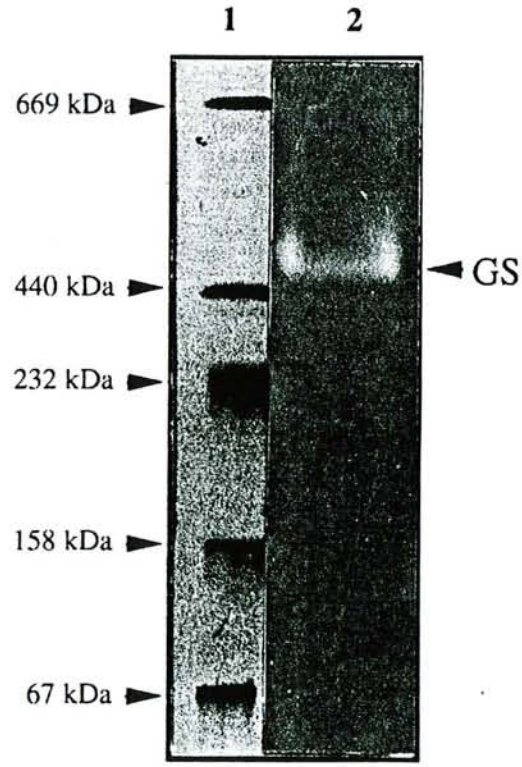


Fig. 2. Determination of native GS molecular mass by non-denaturing gradient PAGE (4–25%). Lane 1, high molecular mass markers stained with Coomassie blue; lane 2, staining of purified GS by incubation in the biosynthetic assay mixture. Each lane contained between 1 and 3 μg of protein. The molecular masses of protein standards is indicated on the left.

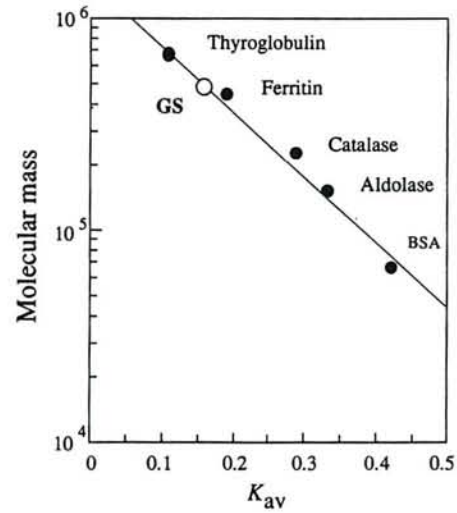


Fig. 3. Calibration curve for the determination of native GS molecular mass by gel filtration on a HiLoad Sephacryl S-300 High Resolution column. The relative position of the native GS is marked with an open symbol.

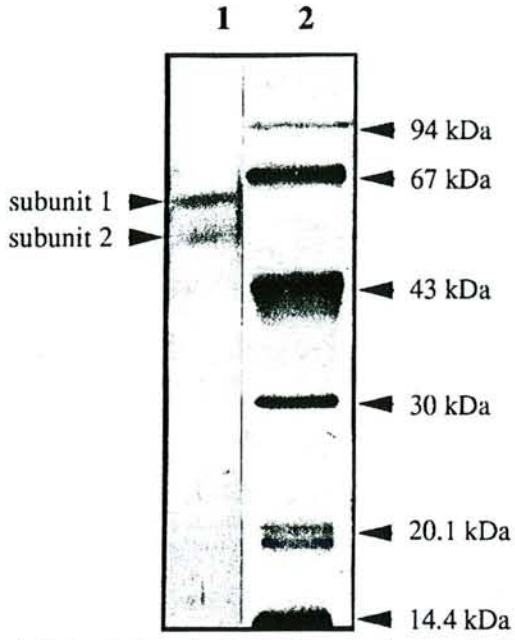


Fig. 4. Determination of subunit GS molecular mass by SDS-PAGE (6% resolving gel); lane 1, purified GS; lane 2, low molecular mass markers. Proteins were silver stained. Each lane contained between 0.5 and 2 μg of protein. The molecular mass of protein standards is indicated on the right.

Molecular mass estimations

The molecular mass of the native GS estimated by non-denaturing gradient-PAGE was 460 ± 5 kDa (Fig. 2). Similar values were obtained by molecular gel filtration (470 ± 6 kDa; Fig. 3) and by the interpolation of the Ferguson plots (455 ± 7 kDa) performed as described elsewhere (Brun et al. 1992). The GS enzyme extracted from *Laccaria laccata* mycelia was found to be split into two tetramers on a non-denaturing gradient-PAGE (Brun et al. 1992), whereas the GS from fir roots was not denaturated in similar conditions.

In the presence of SDS, two polypeptide bands were revealed, with molecular masses of 64 and 54 kDa (Fig. 4). Similarly, jack pine roots contained two subunits, with molecular masses of 44 kDa for the predominant peptide and 40 kDa for the less abundant peptide (Vézina and Margolis 1990). In contrast, roots from maritime pine contained only one GS polypeptide with a molecular mass of 43 kDa (Canovas et al. 1991).

Catalytic properties

Substrate saturation kinetics

The substrate saturation curves were analysed by Lineweaver and Burk plots and K_m values are summarized in Tab. 3. The apparent K_m values for Glu and ATP were 2.6 and 0.5 m*M*, respectively. The Hill number was calculated to be 0.98 for Glu and ATP, indicating an absence of cooperativity of the enzyme for these substrates. In comparison with the root enzyme of jack pine (Vézina and Margolis 1990), the GS of fir had a lower affinity for Glu and a higher affinity for ATP. The K_m values for ATP and for Glu are similar to those obtained previously for mustard (Manderscheid 1986) or for the two isoforms of GS from the pedicel of maize (Muhitch 1989).

For ammonium, the enzyme of Douglas fir roots exhibited a negative cooperativity (Hill number of 0.7), that is, at low ammonium concentrations (< 1.3 m*M*), the affinity for the substrate was high (apparent K_m, 11 μ*M*), while at higher concentrations (1.3 to 6 m*M*) the affinity decreased (apparent K_m, 75 μ*M*). Negative and positive cooperativities for K_m values of ammonium have been reported for GS in nodules of lupin (Lombatsi et al. 1987) and for GS from the pedicel of maize (Muhitch 1989). Similarly, GS from the ectomycorrhizal fungus *L. laccata* exhibited a negative cooperativity for ammonium (Brun et al. 1992). However no cooperativity was found for GS from roots of jack pine (Vézina and Margolis 1990) or other plants (Stewart et al. 1980).

The apparent K_m values for hydroxylamine, an artificial substrate used in the biosynthetic and transferase assays, was higher than that of ammonia which confirms previous results (Stewart et al. 1980, Brun et al. 1992, Cabello et al. 1994). Apparent K_m values for Gln and ADP, determined by the transferase assay are presented in Tab. 3. GS from *Chlamydomonas reinhardii* (Florencio and Vega 1983) and higher plants (Canovas et al. 1984, Ericson 1985) exhibited similar K_m values for these substrates.

Optimum pH and thermal stability

The optimum pH values of GS for transferase and biosynthetic activities were 7.2 and 7.6 respectively (Tab. 3). The optimum pH value for the biosynthetic assay is in agreement with the pH required for optimal stability of the enzyme and is slightly higher than that (6.5) found by

Tab. 3. Properties of GS from the roots of Douglas fir. The K_m values were determined by varying one substrate concentration while the others were kept near saturation. Results were analysed by Lineaweaver-Burk plots, and apparent K_m values were determined by linear regression. (–) Indicates a negative cooperativity for the substrate. The pH optima were established by varying the pH of the reaction mixture and measuring it at the beginning of the reaction. The temperature optima were obtained by incubating the reaction mixture and measuring the activity at various temperatures. Data are from one representative experiment out of three. Determined [a] by spectrophotometric assay, [b] by biosynthetic assay, [c] by transferase assay, according to Brun et al. (1992).

Property	Value
K_m (NH_4^+)	0.011 m*M*/0.075 m*M* (–)[a]
K_m (Glu)	2.6 m*M*[b]
K_m (Gln)	10.5 m*M*[c]
K_m (ATP)	0.5 m*M*[b]
K_m (ADP)	0.083 m*M*[c]
K_m (NH_2OH)	1.75 m*M*[c]
pH optimum	7.6[b]/7.2[c]
Temperature optimum	45°C[b]/40°C[c]

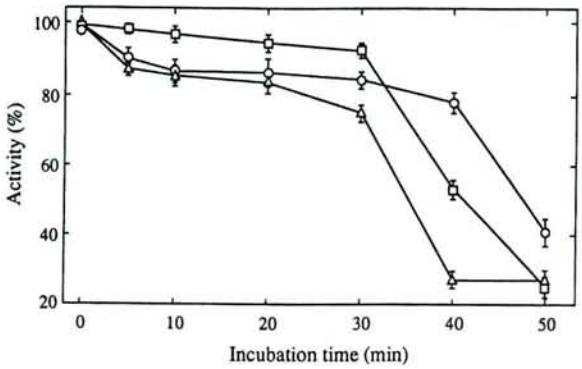


Fig. 5. Thermal inactivation of GS. Samples of purified enzyme were incubated at 30°C (○), 40°C (□) and 50°C (Δ). After incubation, the activities were measured under standard assay conditions. The 100% activity for each incubation was 20 nkat of purified enzyme measured under the standard assay. Results (means ± SD of 3 independent experiments) are expressed as % of activity measured before incubation.

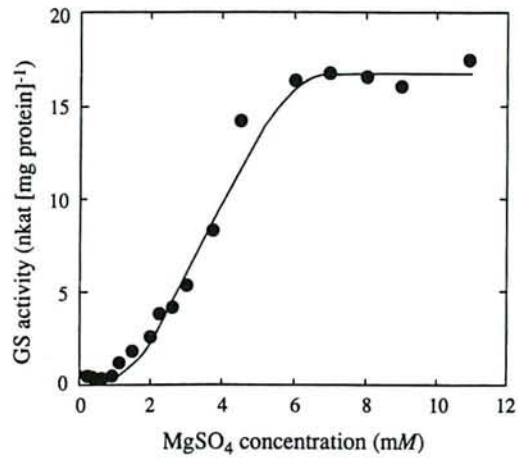


Fig. 6. Effect of $MgSO_4$ concentrations on GS activity. The standard enzyme assay at pH 7.6 was used as described in Materials and methods except that the Mg^{2+} concentration varied as indicated on the abscissa. Data from one representative experiment out of three.

Vézina and Margolis (1990) for jack pine. The temperature optima, obtained by incubating the reaction mixture and measuring the activity at various temperatures, were 40°C and 45°C for the transferase and biosynthetic assays, respectively (Tab. 3). These values are similar to those found by Manderscheid (1986) for mustard.

The effect of temperature was further determined on the stability of GS by incubating the enzyme extract at various temperatures for various periods of time, and measuring the enzyme activity in standard conditions at a temperature of 30°C. The enzyme was stable for 30 min at temperatures ranging from 30°C to 50°C, but 60% of its activity disappeared after 50 min at 30°C. After 50 min at 40°C and 40 min at 50°C, 75% of the activity was lost (Fig. 5). At 60°C, no GS activity was detected (data not shown). A similar marked instability of the enzyme was found with the GS from rice roots (Hirel and Gadal 1980) and sunflower leaves (Cabello et al. 1994). After purification by affinity chromatography, 10 and 30% of GS activity were lost after 25 days of storage at −75°C and 4°C, respectively.

Regulation of GS activity

The regulation of GS activity was undertaken by testing various compounds in the assay mixture with purified extracts obtained after affinity chromatography.

Effects of magnesium

When the Mg^{2+} concentration was varied, a sigmoidal response was observed, with a maximum GS activity obtained at 6 m*M* Mg^{2+} (Fig. 6). A magnesium requirement for plant GS has been previously suggested, based on the stimulation of enzyme activity when Mg^{2+} was added in excess of ATP (Stewart et al. 1980). Such Mg^{2+} requirements have been demonstrated for GS from jack pine roots (Vézina and Margolis 1990), maize pedicels (Muhitch 1989), rice leaves (Hirel and Gadal 1980), wheat leaves (Fröhlich et al. 1994) and *L. laccata* (Brun et al. 1992).

Effects of ADP, alanine, glycine and MSX

Various effectors reported to affect GS activity were tested at different concentrations (Fig. 7). L-methionine-DL-sulfoximine, a well-known inhibitor of GS (Miflin and Lea 1980), had a marked inhibitory effect on the enzyme. The biosynthetic activity was inhibited by 35

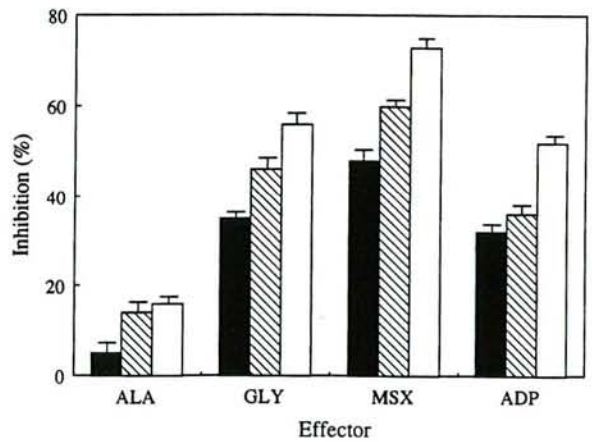


Fig. 7. Effects of different effectors on GS activity. Activities were determined by the biosynthetic assay as described in Materials and methods. The enzyme extract was purified on Matrex Gel Red A, and assayed with 5 (■), 10 (▨) or 20 m*M* (□) effector. Effectors and enzyme were added at the same time. Results (means ± SD of 3 independent experiments) are expressed as percent of control without effector. The 100% activity was 20 nkat measured under standard condition (without any effector).

and 32%, respectively by 5 m*M* Gly or 5 m*M* ADP. This is in contrast with the lack of inhibitory effect of these compounds on GS from various other sources (Ericsson 1985, Fröhlich et al. 1994). Glycine had no significant effect on GS from *L. laccata* (A. Brun, unpublished results). However, 20 m*M* Ala inhibited GS from Douglas fir roots by only 17% whereas this amino acid was a strong inhibitor of the *L. laccata* enzyme (A. Brun, unpublished results).

Conclusions

GS from Douglas fir roots was purified to electrophoretic homogeneity and characterised. One of the most important catalytic properties found for GS is its high affinity and negative cooperativity for ammonium. The possibility for this enzyme to adjust its affinity to the level of ammonium is obviously a very efficient way to assimilate NH_4^+ at different concentrations. Ammonium concentrations have not been determined in Douglas fir roots, but in spruce roots, concentration ranged from 0.5 to 1.7 m*M* (Chalot et al. 1991b). Assuming that such concentrations also exist in Douglas, GS can operate in vivo with its higher affinity for ammonium. Further work is now in progress to investigate the possible importance of this enzyme during germination and growth of this woody species under different nitrogen nutritions.

However, the problem of how the plant partner assimilates the ammonium ions when associated with an ectomycorrhizal fungus in a symbiotic relationship remains unanswered. The study of the relative contribution of plant and fungal GS in ectomycorrhizas of Douglas fir/*L. laccata* is of interest to determine where ammonium assimilation primarily occurs in the symbiotic tissues. Indeed, different models for ammonium assimilation have been proposed, based on the presence or absence of NADP-GDH (Martin and Botton 1993, Botton and Chalot 1995). However, pure culture studies have clearly demonstrated the role of GS in assimilation of ammonium by ectomycorrhizal fungi (Chalot et al. 1991b, Martin and Botton 1993, Chalot et al. 1994). The fungal GS has been detected and localized in the symbiotic tissues (Brun et al. 1994) but the actual flow of ammonium through fungal and host enzymes is not known. For instance, if the newly absorbed ammonium was entirely assimilated by the fungal partner (by either the GS enzyme in the beech model or by the GS/NADP-GDH pathway in the spruce model) in the symbiotic tissues, it would imply that the host GS has only a minor role in the metabolism of absorbed ammonium. Conversely, some of the newly absorbed ammonium could be transferred to the host cells and be assimilated. The possibility of discriminating between the root and fungal GS in extracts of Douglas fir ectomycorrhizas by their banding patterns and the use of antibodies raised against the plant GS together with the antibodies against the fungal GS (Brun et al. 1992) will undoubtedly allow us to determine the amount and relative activities of plant and fungal GS in symbiotic tissues.

References

Berg, B. 1986. Nutrient release from litter and humus in coniferous forest soils – a mini-review. – Scand. J. For. Res. 1: 359–369.

Botton, B. & Chalot, M. 1991. Techniques for the study of nitrogen metabolism in mycorrhizas. – *In* Methods in Microbiology (D. J. Read and A. K. Varma, eds), Vol. 23, pp. 203–252. Academic Press, New York, NY. ISBN 0-12-521523-1.

– & Chalot, M. 1995. Nitrogen assimilation: enzymology in ectomycorrhizas. – *In* Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology (A. K. Varma and B. Hock, eds), Vol. 23, pp. 325–363. Springer-Verlag, Berlin. ISBN 3-540-58525-7.

– & Dell, B. 1994. Expression of glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in eucalypt ectomycorrhizas. – New Phytol. 126: 249–257.

– & Msatef, Y. 1983. Purification and characterization of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Sphaerostilbe repens*. – Physiol. Plant. 59: 438–444.

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: 248–254.

Brun, A., Chalot, M., Martin, F. & Botton, B. 1992. Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. – Plant Physiol. 99: 938–944.

–, Chalot, M. & Botton, B. 1993. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*: occurrence and immunogold localization in the free living mycelium. – Plant Physiol. Life Sci. Adv. 12: 53–60.

–, Chalot, M., Duponnois, R., Botton, B. & Dexheimer, J. 1994. Immunogold localization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase of *Laccaria laccata* in Douglas fir ectomycorrhizas. – Mycorrhiza 5: 139–144.

Cabello, P., De La Haba, P. & Maldonado, J. M. 1994. Properties of the glutamine synthetase isoforms isolated from sunflower leaves. – J. Plant Physiol. 144: 1–6.

Canovas, F. M., Valpuesta, V. & Nunez de Castro, I. 1984. Characterization of glutamine synthetase from tomato leaves. – Plant Sci. Lett. 37: 79–85.

–, Canton, F. R., Gallardo, F., Garcia-Gutiérrez, A. & De Vicente, A. 1991. Accumulation of glutamine synthetase during early development of maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings. – Planta 185: 372–378.

Canton, F. R., Garcia-Gustiérrez, A., Gallardo, F., De Vincente, A. & Canovas, F. M. 1993. Molecular characterization of a cDNA clone encoding glutamine synthetase from a gymnosperm, *Pinus sylvestris*. – Plant Mol. Biol. 22: 819–828.

Chalot, M., Brun, A., Debaud, J. C. & Botton, B. 1991a. Ammonium-assimilating enzymes and their regulation in wild and NADP-glutamate dehydrogenase-deficient strains of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. – Physiol. Plant. 83: 122–128.

–, Stewart, G. R., Brun, A., Martin, F. & Botton, B. 1991b. Ammonium-assimilation by spruce-*Hebeloma* sp. ectomycorrhizas. – New Phytol. 119: 541–550.

–, Brun, A., Finlay, R. D. & Söderström, B. 1994. Metabolism of [^{14}C]glutamate and [^{14}C]glutamine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. – Microbiology 140: 1641–1649.

Dell, B., Botton, B., Martin, F. & Le Tacon, F. 1989. Glutamate dehydrogenase in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). – New Phytol. 111: 683–692.

Duponnois, R. & Garbaye, J. 1991. Techniques for controlled

synthesis of the Douglas fir-*Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. – Ann. Sci. For. 48: 641–650.

Ericson, M. C. 1985. Purification and properties of glutamine synthetase from spinach leaves. – Plant Physiol. 79: 923–927.

Florencio, F. J. & Vega, J. M. 1983. Separation, purification, and characterization of two isoforms of glutamine synthetase from *Chlamydomonas reinhardii*. – Z. Naturforsch. 38c: 531–538.

Fröhlich, V., Fischer, A., Ochs, G., Wild, A. & Feller, U. 1994. Proteolytic inactivation of glutamine synthetase in extracts from wheat leaves: Effects of pH, inorganic ions and metabolites. – Aust. J. Plant Physiol. 21: 303–310.

Hirel, B. & Gadal, P. 1980. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzyme from roots and leaves. – Plant Physiol. 66: 619–623.

Lombatsi, N. T., Solov'eva, N. A., Kim, E. E., Purskin, A. V. & Kretovich, V. L. 1987. Purification, properties and regulation of glutamine synthetase from the plant fraction of *Lupinus luteus* root nodules. – Biokhimiya 51: 1795–1801 (In Russian).

Manderscheid, R. 1986. Characterization of glutamine synthetase of roots, etiolated cotyledons and green leaves from *Sinapis alba* (L.). – Z. Naturforsch. 41c: 712–716.

Martin, F. & Botton, B. 1993. Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhiza. – *In* Advances in Plant Pathology (I. C. Tommerup, ed.), Vol. 9, pp. 83–99. Academic Press, New York, NY. ISBN 0-12-033709-6.

Mayer, A. M. & Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. – Phytochemistry. 18: 193–215.

Mc Nally, S. F. & Hirel, B. 1983. Glutamine synthetase isoforms in higher plants. – Physiol. Vég. 21: 761–774.

Miflin, B. J. & Lea, P. J. 1980. Ammonia assimilation. – *In* The Biochemistry of Plants, A Comprehensive Treatise (B. J. Miflin, ed.), Vol. 5, pp. 169–202. Academic Press, New York, NY. ISBN 0-12-675405-5.

Miranda-Ham, M. L. & Loyola-Vargas, M. 1992. Purification and characterization of glutamine synthetase from leaves of *Catharanthus roseus* plants. – Plant Physiol. Biochem. 30: 585–592.

Muhitch, M. J. 1989. Purification and characterization of two forms of GS from the pedicel region of maize (*Zea mays* L.) Kernels. – Plant Physiol. 91: 868–875.

Stewart, G. R., Mann, A. F. & Fentem, P. A. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. – *In* The Biochemistry of Plants, A Comprehensive Treatise (B. J. Miflin, ed.), Vol. 5, pp. 271–327. Academic Press, New York, NY. ISBN 0-12-675405-5.

Vézina, L.-P. & Margolis, H. A. 1990. Purification and properties of glutamine synthetase in leaves and roots of *Pinus banksiana* Lamb. – Plant Physiol. 94: 657–664.

– , Margolis, H. A. & Ouimet, R. 1988. The activity, characterization and distribution of the nitrogen assimilation enzyme, glutamine synthetase, in Jack pine seedlings. – Tree Physiol. 4: 109–118.

– , Lavoie, N., Joy, K. W. & Margolis, H. A. 1992. The fate of newly absorbed ammonium and nitrate ions in roots of Jack pine seedlings. – J. Plant Physiol. 141: 61–67.

Yuan, H. F., Chang, Y. H. & Wu, W. M. 1993. Purification and characterization of glutamine synthetase from the shoot of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). – Bot. Bull. Acad. Sin. 34: 61–71.

Edited by P. Gardeström

3.3. La glutamine synthetase au cours des jeunes stades de croissance du Douglas.

Résumé

Certaines enzymes du métabolisme de l'azote, et particulièrement la glutamine synthétase (GS, EC 6.3.1.2), ont été étudiées durant le développement des graines du Douglas. L'activité GS a augmenté au cours des différents stades de développement des graines. Cette activité GS a été dosée à la fois dans l'embryon et dans l'endosperme de la graine au cours des derniers stades de développement. Une seule bande d'activité GS a été révélée. Elle présente la même valeur de Rf que la GS racinaire du Douglas. Deux isoformes différentes de la GS ont été révélés uniquement dans les tissus "verts" de plantules de 15 jours. Un facteur environnemental, la nutrition azotée, est impliqué dans la régulation de la protéine GS. L'ammonium et le nitrate ajouté ont une faible influence *in vivo* sur l'activité GS, mais aucun effet *in vitro*. Dès les stades précoces de développement, la GS du Douglas semble être régulée par l'azote extérieur.

Mots clés : activité enzymatique; aspartate amino transférase; Douglas; glutamine synthétase; métabolisme de l'ammonium; *Pseudotsuga menziesii*.

Glutamine synthetase during early development of Douglas fir (*Pseudotsuga menziessi* Mirb. Franco) seedlings.

Bedell J.-P.[A], Chalot M., Garnier A. and Botton B.

Laboratoire de Biologie Forestière, associé INRA.Faculté des Sciences,

Université Henri Poincaré, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy CEDEX, FRANCE.

[A] author for correspondence, email: bedell@scbiol.u-nancy.fr

Running title: GS in Douglas fir seedlings

Abstract.

Enzymes of nitrogen metabolism, particulary glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2), were studied during the development of Douglas fir seedlings. GS activty was increased at the different stages of seedlings development. The GS activity was assayed both in the embryo and endosperm part of seedlings for the last developmental stages. Only one band of GS activity was revealed. It was at the same Rf value as GS of Douglas fir roots. Two differents isoforms of GS were revealed only in green tissue of 15 days-old seedlings. An environmental factors, nitrogen nutrition may be involved in the regulation of GS protein. Ammonium and nitrate supply had small influence *in vivo* on GS activity but any effect *in vitro*. Since earlier stage of development, GS from Douglas fir seems to be regulated by external nitrogen.

Key words: ammonium metabolism; aspartate amino transferase; Douglas fir; enzyme activity; glutamine synthetase; *Pseudotsuga menziesii*; seedlings.

Abbreviations: AAT, aspartate amino transferase; Ala-T, alanine transferase; GDH, glutamate dehydrogenase; GOGAT, glutamate synthase; GS, glutamine synthetase; GS1, glutamine synthetase cytosolic; GS2, glutamine synthetase chloroplastic; GSr, glutamine synthetase of roots; kDa, kilodalton; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

Introduction

In conifer roots the assimilatory flow of free ammonium ions is considered far more important than that found in most other higher plants as ammonium is at a relatively high concentration in acidic forest soils (Berg 1986). This ion has to be assimilated into organic molecules because small increases in its concentration can easily result in physiological and metabolic disorders (Miflin and Lea 1980). NH_3 is largely absorbed by the shoots, while NH_4^+ uptake mainly occurs in the roots. Nitrate taken up by the roots is also reduced to NH_4^+ and incorporated in the organic N pool in the same way (Oaks 1985).

It is well established that, in higher plants, glutamine synthetase (GS) (L-glutamate ammonia ligase, ADP forming, E.C. 6.3.1.2) is responsible for primary assimilation of ammonium (Miflin and Lea 1980; Lea *et al.* 1992). This enzyme catalyzes the biosynthesis of glutamine from ammonia and glutamate using ATP as an energy source. Previous studies have determined that plants contain different forms of GS, a cytosolic enzyme (GSr) in roots and two differents forms in green tissues, one cytosolic (GS1) and one chloroplast located isoenzyme (GS2) (Hirel and Gadal 1980; McNally and Hirel 1983; Ericson 1985; Vézina *et al.* 1992; Frölihch *et al.* 1994). During the germination of seedlings, the carbon and nitrogen reserves were mobilized for the development of the plant. GS has been studied during seed germination in some angiosperm plants (Nishimura *et al.*, 1982; Winter *et al.*, 1982). But in gymnosperms, it has been only reported that GS activity level increased markedly in cotyledons of dark-germinated *Pinus pinaster* seedlings (Cánovas *et al.* 1991). Elmlinger and Mohr (1992) show the mainly localization of the glutamine synthetase in the cotyledonary whorl of the Scots pine seedlings. Although extensive studies have already been performed on pine (Cánovas *et al.* 1991; Elmlinger and Mohr 1992; Otter *et al.* 1992) there is only little information available concerning the GS enzyme in woody species at first stage of development.

Our research group is interested in the regulation, especially in the root system, of nitrogen metabolism during growth and development of Douglas fir. In this paper we investigated enzymes of the nitrogen metabolism, which GS, as well as their distribution, during early development of Douglas fir seedling.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Ma, USA) and Prolabo (Paris, France). Calibration kits (SDS-PAGE and uniform-PAGE) were obtained from Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (LKB, Uppsala, Sweden).

Plant material and growth conditions

Seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco) (Office National des Forêts, France, Zone 422, 1990) were obtained from the Laboratory of Forest Microbiology (Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches Forestières, Nancy, France). Seeds were surface sterilised in 30% H_2O_2 for 60 min, washed for 4 h in sterile water, and placed on glucose (1 $g \cdot l^{-1}$) agar in order to detect contaminations (Duponnois and Garbaye 1991). Contaminated seeds were discarded and germinated seeds were harvested. Germination was carried out at 24°C under complete darkness.

Enzyme extraction and purification procedures

Samples were washed with distilled water, blotted on filter paper, weighed, and pulverised at 4°C in a chilled mortar and pestle with 30 volumes of buffer [50 m*M* Tris-HCl, pH 7.6, 5 m*M* $MgSO_4$, 2 m*M* EDTA, 10 m*M* Glu, 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) PVP-40, 10% (w/w) PVPP, and 14 m*M* 2-mercaptoethanol]. The homogenate was centrifuged at 40,000*g* for 30 min. The resulting supernatant fractions were used for enzyme activites and proteins determination. For each stages, twelves seedlings, coming from three different experiments, were collected.

Enzyme and protein assays

GS activity was determined by a modification of the transferase and the biosynthetic assays as previously described by Bedell *et al.* (1995). GDH activities was detemined by the reduction of NADH or NADPH according to Dell *et al.* (1989). AAT was measured as described by Chalot *et al.* (1990). Ala-T was assayed as described by Otter *et al.* (1992). Protein contents were determined by the Bradford method (1976) using BSA as a standard.

Electrophoresis analysis

Uniform-polyacrylamide (PAGE) (6% resolving gels) was carried out in a Mini-Protean II unit for 1 h at constant voltage (200 V) according to Botton and Msatef (1983). GS activity was determined immediately after electrophoresis by immersing the gels for 30 min at 30°C in the transferase or biosynthetic assay mixture and subsequent transfer in a ferric chloride

reagent as described by Brun *et al.* (1992). The gels were silver-stained as described by Botton and Chalot (1991).

Results

Several developmental stages were selected using the cotyledon length of the seedlings for the pine seedlings (Cánovas *et al.* 1991). With Douglas fir at one week-old, 72,5% of seedlings were germinated but not at a single homogenous stage and without any appearance cotyledons (Fig. 1). Thus different stage of development were determined according to the radicle lenght and germinated seedlings were distributet to these different developmental stages (Table 1). At these stages of development, some enzymes from the nitrogen assimilation pathway were measured on the whole seedlings (Fig. 2). And seedlings of Douglas fir were separated in three quite differents parts: the embryo, the endosperm, and the tegument (Fig. 3, 4 and 5). As before glutamine synthetase and aspartate ami,otransferase (AAT, EC 2.6.1.1) were measured on these different parts at the five stages (Figs. 4 and 5).

Whole seedlings

The two glutamates dehydrogenases (NADP-GDH, EC 1.4.1.4 and NAD-GDH, EC 1.4.1.3) and alanine aminotransferase (Ala-T, EC 2.6.1.2) activities were very small than not detected at some stage of development (Fig. 2). In contrast, GS and AAT increased during the seedlings development (Fig. 2). AAT activity was the most higher, and by decreasing order GS, NAD-GDH, Ala-T and NADP-GDH. But if we compare specific activity (data not shown) that could give us an idea of the enzyme quantity, the GS amount, with 21.6-fold, was the most important increased of enzymes. This increase of GS activity was due probably to an amount of GS-protein during seedlings development. For AAT, specific activity increased only 1.5-fold for a 5-fold amount of activity. Thus the increase of amount was not so significant, and it was the capacity of enzyme whose increased and not its quantity. In order to determine if the enhancement of GS activity was due to the activation of the enzyme during seed development or could be correlated with GS-protein accumulation, we performed an electrophoresis analysis at the same stages for which we had previously evaluated enzyme activity. Total soluble proteins were extracted from developing plants, separated by electrophoresis on PAGE gel and stained with Coomassie blue. The stained gels showed that there occurs a great change in the pattern of soluble polypeptides during germination of Douglas fir. A number of abundant proteins in the stage where tegument were opened disappear and many others accumulate gradually during seedlings development (Fig. 6). One of them increase gradually during the different stages of development (Fig. 6). This protein band corresponding at the same band of GS activity (corresponding of the arrows).

Different parts of seedling

Any enzymes activities were detected in the tegument part (Figs. 4, 5 and 7). As expected most of the specific activity was found in the embryo, whatever was the enzyme studied. GS and AAT were the most enzyme activity expressed in this part of seedlings (data not shown). But AAT expressed a specific activity 3 fold more than GS (Figs 4 and 5). And GS was 20 fold more than the NAD-GDH (data not show). The specific activity of Ala-T was very small, not more than 0.5 nkatal.mg^{-1} of protein (data not shown).
Until the last stage of seedling development, some AAT and GS enzymes were detected in the endosperm part (Figs. 4 and 5). At this five stage, GS and AAT enzymes expressed an increase and the most specific activity in this part of seedling.

Different isoforms of GS

The presence of GS isoenzymes was examined by electrophoretic PAGE gel (Fig. 7). The revelation of GS activity in the different parts of Douglas fir seedling exhibited no band of activity in tegument as expected by the assay, but a single common band of activity (Rf 0.293) was revealed both in the embryo and endosperm part (Fig. 7). A such Rf value was found by the revelation of GS activity from roots (Bedell *et al.* 1995). When we compare the GS isoforms found in extracts from Douglas fir seedlings of 17 days-old (with green needles), we reveleated this only one band at the same Rf value in the extracts of roots and stems (Fig. 8). But in the needles extract two different bands of GS activity were found; one at a Rf value of 0.200, and a second at the same place then root or embryo ectracts (Fig. 8). This band of activity reveleated both in endosperm and embryo in the differents stages of development correspond to the GS of roots (Fig. 8).

Environmental factors

An environmental factors, nitrogen nutrition may be involved in the regulation of GS protein. Seedlings were exposed *in vivo* to different concentrations of NO_3^- and NH_4^+ during 40 h (Cánovas et al., 1991). Figure 9 shows that increasing the amount of this nitrogen source in the medium modified substantially the GS activity compared with control plants incubated without this nitrogen.Effectively for concentration higher than 2 mM of ammonium, a small increase of GS activity was observed.In contrast, rapidly after nitrate supply, GS activity was decreased to around 20%. The results were different *in vitro* when the resulting supernatant of seedlings were used. NH_4^+ and NO_3^- seems to have no significant effect on GS activity (Fig.10). A decrease for higher concentration was observed and was typical results for excess of substrats.

Discussion

A major metabolic event during seed germination is the production of enzymes responsible for the mobilization and utilization of storage reserves. Thus some peptidases and proteinases, responsible for the storage protein breakdown have been characterized in several

coniferous species (Gifford and Tolley 1989; Gifford *et al.* 1989; Misra 1994). A study of the molecular characterization of a cDNAs cysteine protease have been showed its increase with a peak during germination phase of Douglas fir (Tranbarger and Misra 1995). The GS with AAT is the predominant enzyme expressed during these first step of growth. A such increae of GS activity of the whole seedlings have been described for pine (Cánovas *et al.* 1991) and for peanuts (Winter *et al.* 1982).

Short-term studies with $^{15}NH_4^+$ showed that the amide of glutamine (Gln) was the first compound to contain inorganic nitrogen as has been found in *Zea mays* (Amancio and Santos 1992), *Daucus carota* L. (Joy IV *et al.* 1996) or *Picea glauca* (Thorpe *et al.* 1989). Amino acids analysis showed too that Gln, with glutamate (Glu), aspartate and arginine as majors amino acids in Douglas fir seedlings (Feirer 1995). In young seedlings, amino acids and small peptides obtained from the hydrolysis of endosperm proteins provide most of nitrogen for growth. These data indicates that in the short term, GS/GOGAT pathway was functioning to produce an active pool of Gln and Glu. Thus, GS and AAT was efficient to use these amino acids as substrats for producing proteins and then for the development of seedlings.

The distribution of enzymes from nitrogen assimilation was localized in the embryo and endosperm. Embryon part could be expected because it was well known that it is a site of development. And cell differentiation is generally accompanied by structural changes and these physical alterations can sometimes be correlated with underlying changes in the activity of one or more enzymes. For example, invertase activity is known to be highest in the region of maximal cell elongation in roots, and the distribution of this activity was not uniformed according to the different region in *Vicia faba* L. roots (Macleod and Francis 1977). In endosperm part, GS activity was more unexpected but one GS isoforms was detected in tuber of potato (Pereira *et al.* 1996).

The single band of activity reveleated both in endosperm and embryo was the expression of GS root activity. And thus the GS activity found in endosperm was due probably by the excretion of GS from embryo, rather then a new synthesis in such tissue. A molecular-weight estimated by non-denaturing gradient PAGE showed that the molecular weight of this single band was similar to that reported for GS of higher plants (Stewart *et al.* 1980) and particulary for GS roots of Douglas fir (Bedell *et al.* 1995). GS roots and GS cytosolic, from stems or needles, have the same molecular weight in Douglas fir. In rice extracts, Hirel and Gadal (1980) have been not found different molecular weight of the GSr, GS1 and GS2, but they show two different isoforms in the leaves. In hypocotyls of soybean, Stasiewicz and Dunham (1979) have not found differences in the molecular weight between GS1 and GS2. But in barley leaves, Mann *et al.* (1979) expressed two different molecular weight of GS1 and GS2. In sugarbeet, Mäck and Tischner (1990) described two bands for leaf extracts and only one for root extracts. Moreover they revealed GS activity in tissue of reserve, the storage beet. Recently , western blot analysis separate distincts GS polypeptide in leaf-extracts of potato but only the GS cytosolic in tuber (Pereira *et al.* 1996).

The GS isoforms of higher plants are important in different aspects of ammonium metabolism: GS1 plays a role in translocation of seed storage reserves during germination, in remobilization of N-reserves during early development of maize and during leaf senescence (Ta 1991); GS2 functions in the re-assimilation of photorespiratory NH_4^+, in the assimilation of NH_4^+ derived from NO_3^- reduction and in amino acids catabolism (Redinbaugh and Campbell 1993).

In vitro GS enzyme was not affected by the NH_4^+ or NO_3^- concentration. But *in vivo*, GS activity were influenced by exposure of plants to increasing concentrations of nitrate or ammonium. The small GS induction, in the case of ammonium supply, indicated that GS levels in Douglas fir seedlings are sufficient to cover an increase in NH_4^+ concentrations and therefore prevent ammonium toxicity. Similar results were obtained in developing mustard cotyledons where nitrate and ammonium had a limited influence on GS accumulation (Schmidt and Mohr 1989) and for *P. pinaster* by nitrogen supply at such earlier stade of development was described (Cánovas *et al.* 1991). GS have the possibility to be regulated by the concentration of external nitrogen source. Thus , nitrate can have a small inhibitory effect on GS activity. This effect could be explain by the absence of chloroplastic GS, which use ammonium coming from nitrate reduction. Nitrogen source are known to influence the expression of the GS isozymes in higher plants (Hirel *et al.* 1987; Muhitch 1989; Mäck and Tischner 1990; Muhitch and Felker 1994).

In conclusion, in Douglas fir seedlings as expected the embryon axis was the place where most of nitrogen enzyme,and especially GS, were found. But the appeareance of these enzymes in endosperm was the prouve of degradation of its reserve. The GS isoform found here was the GS from roots. Finally, the results presented in this paper provide experimental evidence that in the early development of Douglas fir the regulation of GS appearance may be under developmental control, because nitrogen nutrition have a minor role in the adjustement of GS abundance. Work is in progress in our laboraory to understand how such environmental factors can influenced, or not, GS during latter stage developmental.

Table 1: Distribution of germinated seedlings from Douglas fir at one week-old

Development stages	Radicle lenght (cm)	% of germinated seedlings
0	Tegument opened	11,4
1	0 à 0.5	16,3
2	0.5 à 1.0	15,8
3	1.0 à 1.5	16,4
4	1.5 à 2.0	7,8
5	> 2.0	4,8

Figure 1: The different developmental stages of seedlings from Douglas fir. Stage 0, the tegument of seedlings was opened; stages 1, 2, 3, 4 and 5 correspond, in the order given, to the radicle lenght (for more details see Table 1).

Figure 2: GS activity during the development of Douglas fir seedlings. After one week at dark-grown, stages were determined as previously described.

Figure 3: The different parts of a Douglas fir seedling. Em, the embryo; E, the endosperm and T, the tegument.

Figure 4: Accumulation of GS activity in a Douglas fir seedling at the different developmental stages.

Figure 5: Accumulation of AAT activity in a Douglas fir seedling at the different developmental stages.

Figure 6: Analysis of soluble polypetides during the development of Douglas fir seedlings. Soluble proteins from whole seedlings at the different developmental stages (0 to 5) were revealed by Coomassie blue on a native PAGE (6%). Arrows were marked the band of protein corresponding to GS activity. Around 5 µg of protein was loaded per lane.

Figure 7: Determination of GS activity by non-denaturing PAGE (6%) of Douglas fir seedlings. Lanes 1 to 3; 4 to 6; 7 to 9; 10 to 12; 13 to 15; 16 to 18 were corresponded, in the order given, to the developmental stages 0, 1, 2 ,3, 4 and 5 respectively. Lanes 1, 4, 7, 10, 13, 16 were some extracts of tegument part; lanes 2, 5, 8, 11, 14, 17 were some extracts of embryo part; lanes 3, 6, 9, 12, 15, 18 were some extracts of endosperm part. Lane 19 was an extract of semi-purified GS from Douglas fir roots. Each lane contained 3 µg of protein and staining of extracts were realiezd by incubation in the transferasic assay mixture. The Molecular weight of protein markers are indicated on the left in kDa.

Figure 8: Determination of GS activity by non-denaturing gradient PAGE (4-25%) of 17 days-old Douglas fir. Lane M, high molecular mass markers stained with Coomassie blue. Lanes 1 to 5, staining of GS by incubation in the transferasic assay mixture. Lane 1, extracts from leaves; lane 2, extracts from roots; lane 3, extracts from stems; lane 4, extracts from embryo part;

and lane 5, extracts from semi-purified of GS root from Douglas fir. Each lane contained between 1 and 3 µg of protein. The molecular masses of protein standards is indicated on the left.

Figure 9: Effects *in vivo* of nitrate and ammonium supply on GS activity from Douglas fir seedlings. Seedlings utilized were at the developmental stage 5 (lenght radicle higher than 2 cm). Radicles were exposed to various concentrations of KNO_3 and NH_4Cl for 40 h. Extracts were then prepared from the seedlings as described in *Material and methods* and GS activity determined by the transferase assay.

Figure 10: Effects *in vitro* of nitrate and ammonium supply on GS activity from Douglas fir seedlings. Seedlings utilized were at the developmental stage 5 (lenght radicle higher than 2 cm). Radicles were exposed to various concentrations of KNO_3 and NH_4Cl for 40 h. Extracts were then prepared from the seedlings as described in *Material and methods* and exposed during 1 h before assays. GS activity was determined by the transferase assay.

References

Amancio, S., and Santos, H. (1992). Nitrate and ammonium assililation by roots of maize (Zea mays L.) seedlings as investigated by in vivo ^{15}N-NMR. *Journal of Experimental Botany* **43**, 633-639.

Berg, B. 1986. Nutrient release from litter and humus in coniferous forest soils - a mini-review. *Scandinav Journal of Forest Research* **1**, 359-369.

Bedell, J. P., Chalot, M., Brun, A., and Botton, B. (1995). Purification and properties of glutamine synthetase from Douglas fir roots. *Physioliogia Plantarum* **94**, 597-604.

Botton, B., and Chalot, M. (1991). Techniques for the study of nitrogen metabolism in mycorrhizas. In 'Methods in Microbiology'. Vol. 23, (eds Read, D. J., and Varma, A. K.) pp. 203-252. (Academic Press, New York.)

Botton, B., and Dell, B. (1994). Expression of glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytologist* **126**, 249-257.

Botton, B., and Msatef, Y. (1983). Purification and characterization of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from Sphaerostilbe repens. *Physioliogia Plantarum* **59**, 438-444.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anals of Biochemistry* **72**, 248-254.

Brun, A., Chalot, M., Martin, F., and Botton, B. (1992). Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiology* **99**, 938-944.

Cánovas, F. M., Canton, F. R., Gallardo, F., Garcia-Gutiérrez, A., and De Vicente, A. (1991). Accumulation of glutamine synthetase during early development of maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings. *Planta* **185**, 372-378.

Canton, F. R., Garcia-Gutiérrez, A., Gallardo, F., De Vicente, A., and Cánovas, F. M. (1993). Molecular characterization of a cDNA clone encoding glutamine synthetase from a gymnosperm, *Pinus sylvestris*. *Plant Molecular Biology* **22**, 819-828.

Chalot, M., Brun, A., Khalid, A., Dell, B., Rohr, R., and Botton, B. (1990). Occurrence and distribution of aspartate aminotransferases in spruce and beech ectomycorrhizas. *Canadian Journal of Botany* **68**, 1756-1762.

Dell, B., Botton, B., Martin, F., and Le Tacon, F. (1989). Glutamate dehydrogenase in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* L) and beech (*Fagus sylvatica* L). *New Phytologist* **111**, 683-692.

Duponnois, R., and Garbaye, J. (1991). Techniques for controlled synthesis of the Douglas fir fir-*Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Annales des Sciences Forestières* **48**, 641-650.

Elmlinger, M. W., and MOHR, N. (1992). Glutamine synthetase in Scots Pine seedlings and its control by blue light absorbed by phytochrome. *Planta* **188**, 396-402.

Ericson, M.C. (1985). Purification and properties of glutamine synthetase from Spinach leaves. *Plant Physiology* **79**, 923-927.

Feirer, R. P. (1995). The biochemistry of conifer embryo development: Amino acids, polyamines and storage proteins. *In* 'Somatic Embryogenesis in Woody Plants'. Vol. 1, (eds Jain, S., Gupta, P., and Newton, R.) pp. 317-336. (Kluwer Academic Publishers, Netherlands)

Fröhlich, V., Fischer, A., Ochs, G., Wild, A., and Feller, U. (1994). Proteolytic inactivation of glutamine synthetase in extracts from Wheat leaves: Effects of pH, inorganic ions and metabolites. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**, 303-310.

Gifford, D. J., and Tolley, M. C. (1989). The seed proteins of white spruce and their mobilization following germination. *Physioliogia Plantarum* **77**, 254-261.

Gifford, D. J., Wenzel, K. A., and Lammer, D. L (1989). Lodgepole pine seed germination. I. Changes in peptidase activity in the megagametophyte and embryonic axis. *Canadian Journal of Botany* **67**, 2539-2543.

Hirel, B., and Gadal, P. (1980). Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzyme from roots and leaves. *Plant Physiology* **66**, 619-623.

Hirel, B., Bouet, C., king, B., Layzell, D., Jacobs, F., and Verma, D. P. S.(1987). Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO Journal* **6**, 1167-1171.

Joy IV,R. W., McIntyre, D. D., Vogel, H. J., and Thorpe, T. A. (1996). Stage-specific nitrogen metabolism in developing carrot somatic embryos. *Physiologia Plantarum* **97**, 149-159.

Lea, P. J., Blackwell, R. D., and Joy, K. W. (1992). Ammonia assimilation in higher plants. In 'Nitrogen Metabolism of Plants'. (eds, Mengel, K., and Pilbeam, P. J.), pp 153-156.(Clarendon Press, Oxford.)

MacLeod, R. D., and Francis, D. (1977). Some observations on invertase activity in roots of *Vicia faba* L. *Journal of Experimental Botany* **28**, 853-863.

Mäck, G., and Tischner, R. (1990). Glutamine synthetase oligomers and isoforms in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* **181**, 10-17.

Mann, A. F., Fentem, P. A., and Stewart, G. R. (1979). Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (Hordeum vulgarae L.). *Biochemistry Biophysic Research Communication* **88**, 515-521.

Mc Nally, S. F., and Hirel, B. (1983). Glutamine synthetase isoforms in higher plants. - *Physiologie Végétale* **21**, 761-774.

Miflin, B.J., and Lea, P.J. (1980). Ammonia assimilation. In 'The Biochemistry of Plants, A Comprehensive Treatise'. Vol. 5, (ed Miflin, B. J.), pp. 169-202. (Academic Press, New-York.)

Misra, S. (1994). Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis and seed germination: biochemical and molecular advances. *Seed Sciences Research* **4**, 357-384.

Muhitch, M.J. (1989). Purification and characterization of two forms of GS from the pedicel region of maize (*Zea mays* L.) Kernels. *Plant Physiology* **91**, 868-875.

Muhitch, M.J., and Felker, F. C. (1994). Influence of nitrogen source on the growth, prolamin content, and glutamine synthetase isozyme profiles of endosperm-derived suspension cultures of maize. *Journal of Plant Physiology* **144**, 215-221.

Nishimura, M., Bhusawang, P., Strzalka, K., and Akazawa, T. (1982). Developmental formation of glutamine synthetase in greening pumpkin cotyledons and its subcellular localization. *Plant Physiology* **70**, 353-356.

Oaks, A., and Hirel, B. (1985). Nitrogen metabolism in roots. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 345-365.

Otter, T., Penther J. M., and Mohr, H. (1992). Control of the appearance of alanine aminotransferase in the Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Planta* **188**, 376-383.

Pereira, S., Pissarra, J., Sunkel, C., and Samela, R. (1996). Tissue-specific distribution of glutamine synthetase in potato tubers. *Annals of Botany* **77**, 429-432.

Redinbaugh, M. G., and Campbell, W. H. (1993). Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiology* **101**, 1249-1255.

Stasiewicz, S., and Dunham, V. L. (1979). Isolation and characterization of two forms of GS from soybean hypocotyls. *Biochemistry Biophysic Research Communication* **87**, 627-634.

Stewart, G. R., Mann, A. F., and Fentem, P. A. (1980). Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. In 'The Biochemistry of Plants, A Comprehensive Treatise'. Vol. 5, (ed Miflin, B. J.), pp. 271-327. (Academic Press, New-York,.)

Schmidt, S., and Mohr, H. (1989). Regulation of the appearance of glutamine synthetase in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons by light, nitrate and ammonium. *Planta* **177**, 526-534.

Ta, C. T. (1991). Nitrogen metabolism in the stalk tissue of maize. *Plant Physiology* **97**, 1375-1380.

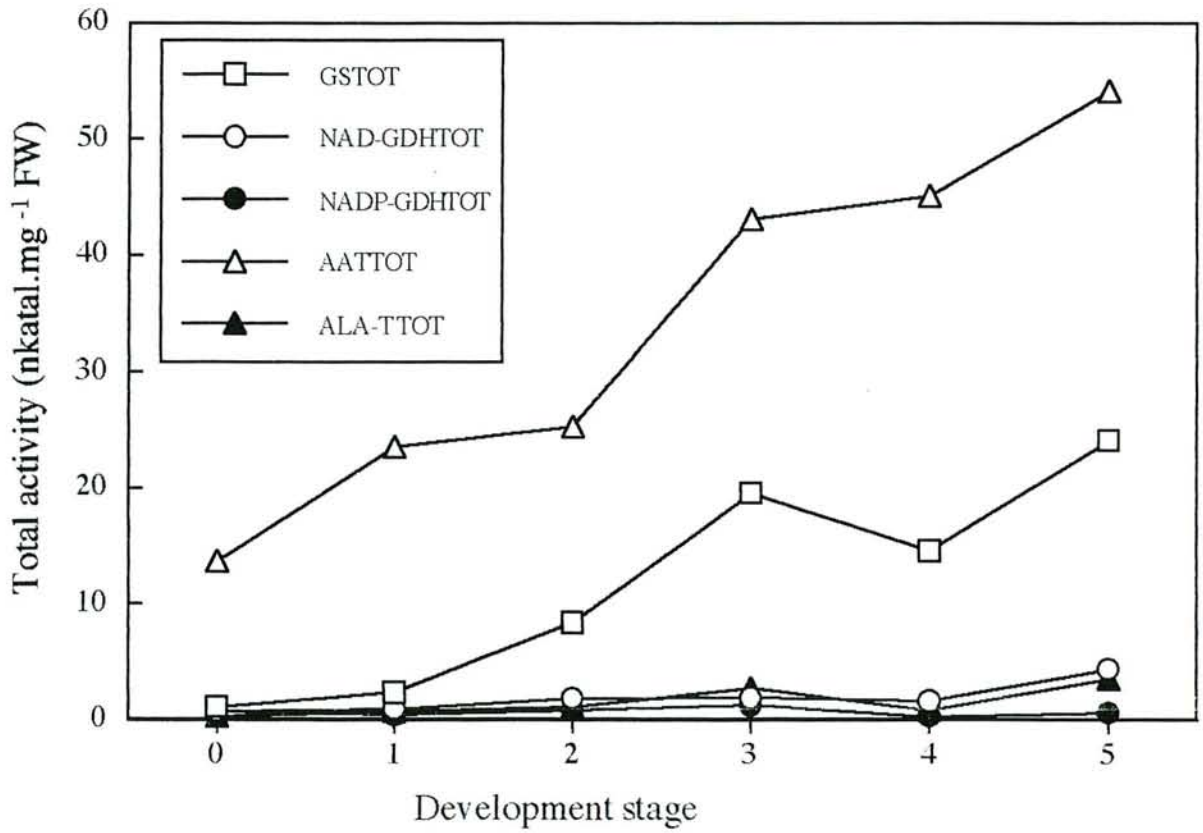
Thorpe, T. A., Bagh, K., Cutler, A. J., Dunstan, D. I., McIntyre, D. D., and Vogel, H. J. (1989). A ^{14}N and ^{15}N nuclear magnetic resonance study of nitrogen metabolism in shoot-forming cultures of white spruce (*Picea glauca*) buds. *Plant Physiology* **91**, 193-202.

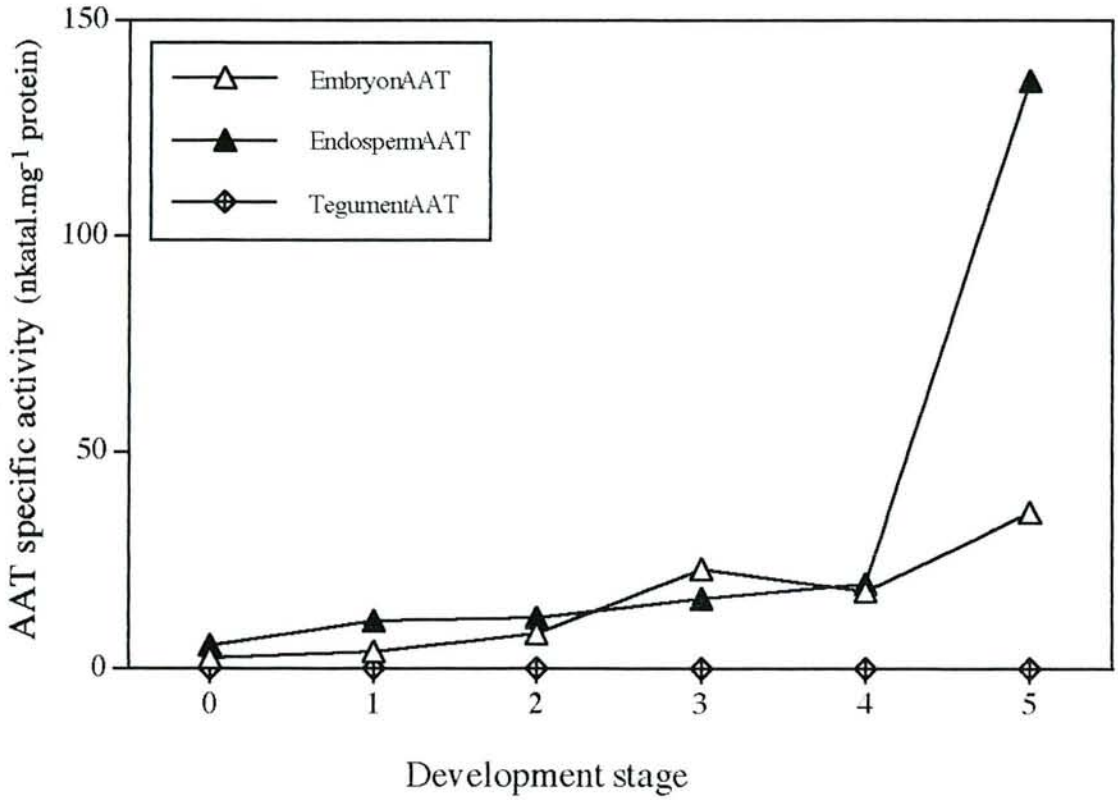
Tranbarger, T. J., and Misra, S. (1995). The molecular characterization of a set of cDNAs differentially expressed during Douglas-fir germination and early seedling development. *Physiologia Plantarum* **95**, 456-464.

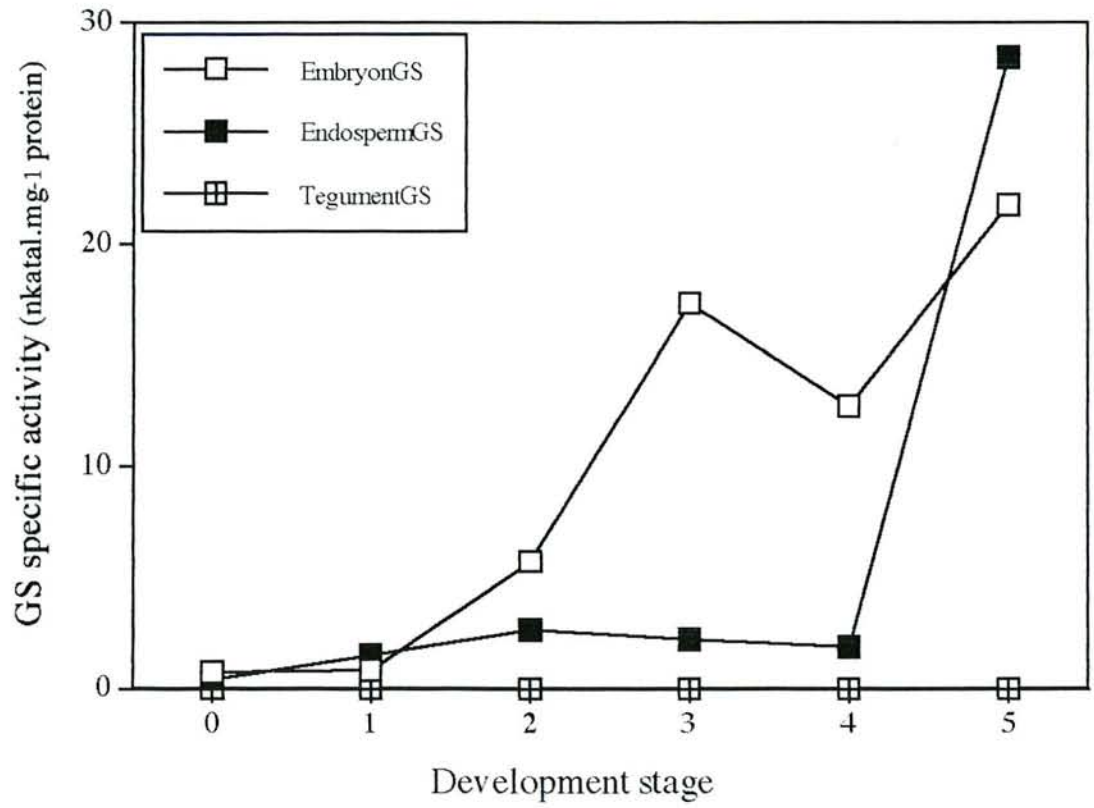
Vézina, L.-P., and Margolis, H. A. (1990). Purification and properties of glutamine synthetase in leaves and roots of *Pinus banksiana* Lamb. *Plant Physiology* **94**, 657-664.

Vézina, L.-P., Lavoie, N., Joy, K. W., and Margolis, H. A. (1992). The fate of newly absorbed ammonium and nitrate ions in roots of Jack pine seedlings. *Journal of Plant Physiology* **141**, 61-67.

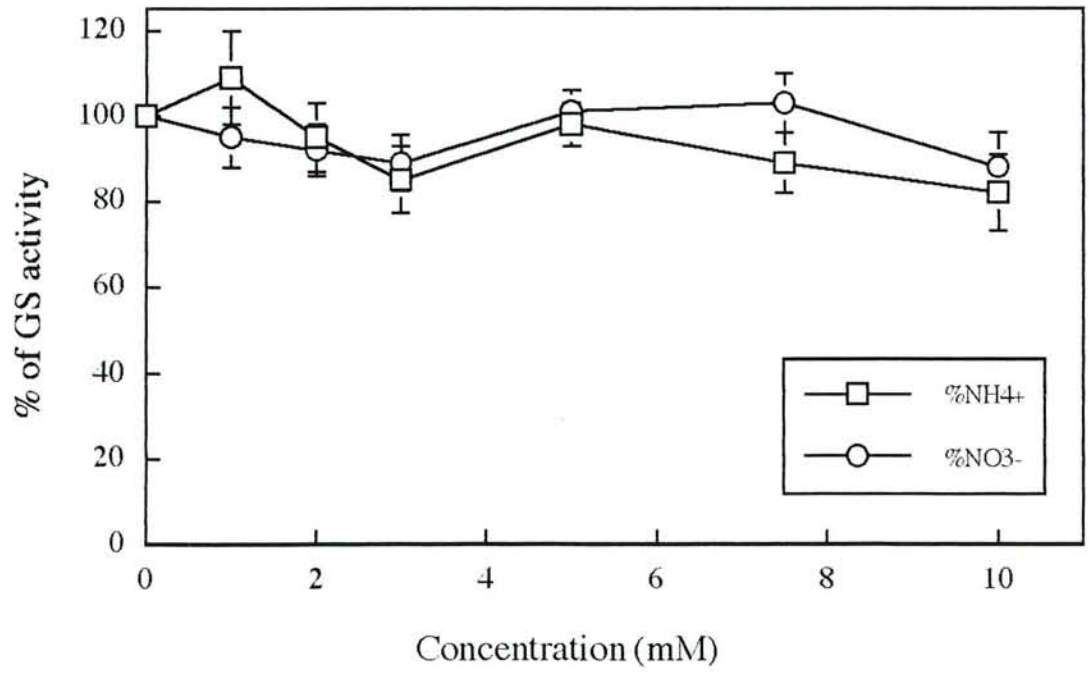
Winter, H. C., Powell, G. K., and Dekker, E. E. (1982). Glutamine synthetase of germinating peanuts. *Plant Physiology* **69**, 41-47.

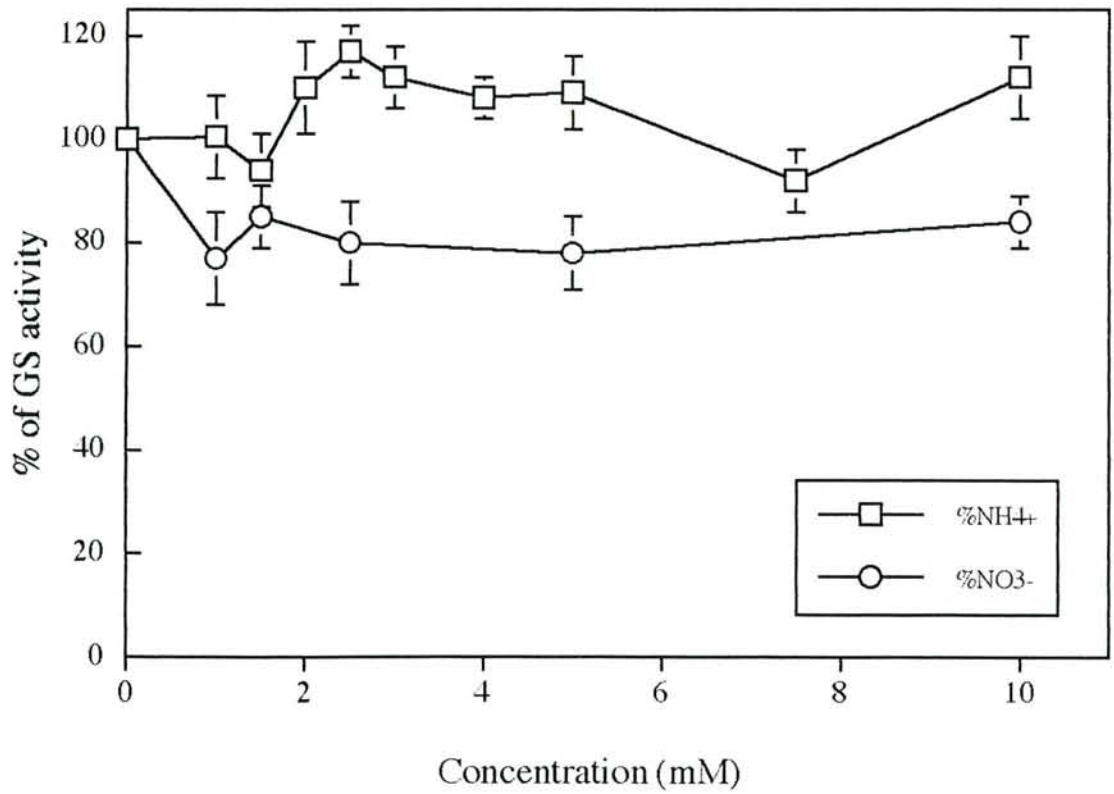

60
50
40
30
20
10
0
Total activity (nkatal.mg -1 FW)
GSTOT
NAD-GDHTOT
NADP-GDHTOT
AATTOT
ALA-TTOT
0
1
2
3
4
5
Development stage

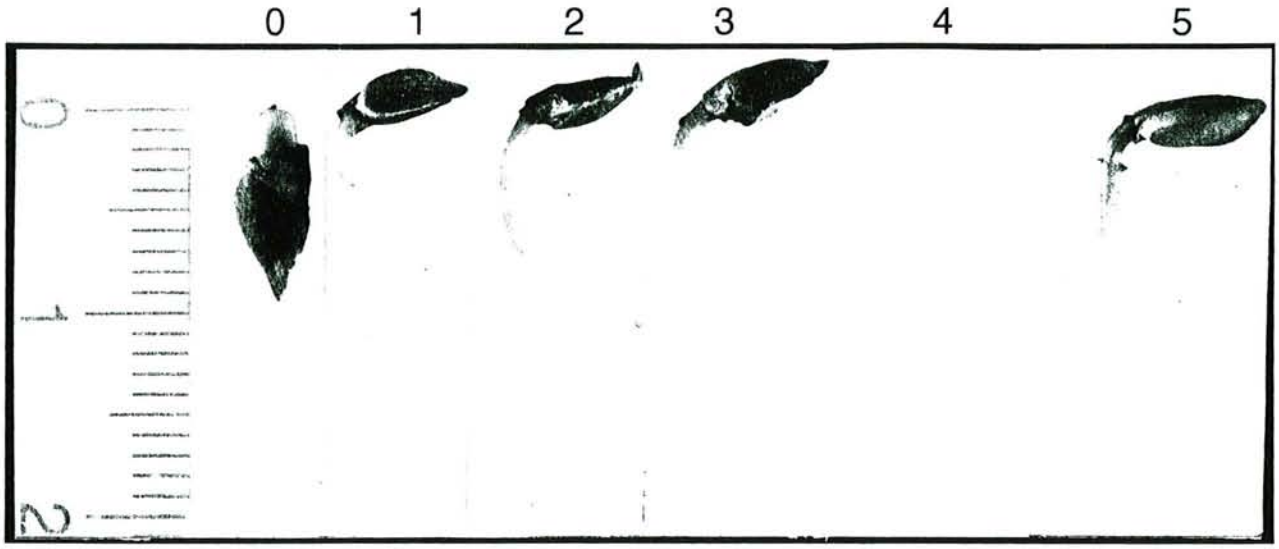

150
100
50
0
AAT specific activity (nkatal.mg-1 protein)
EmbryonAAT
EndospermAAT
TegumentAAT
0
1
2
3
4
5
Development stage

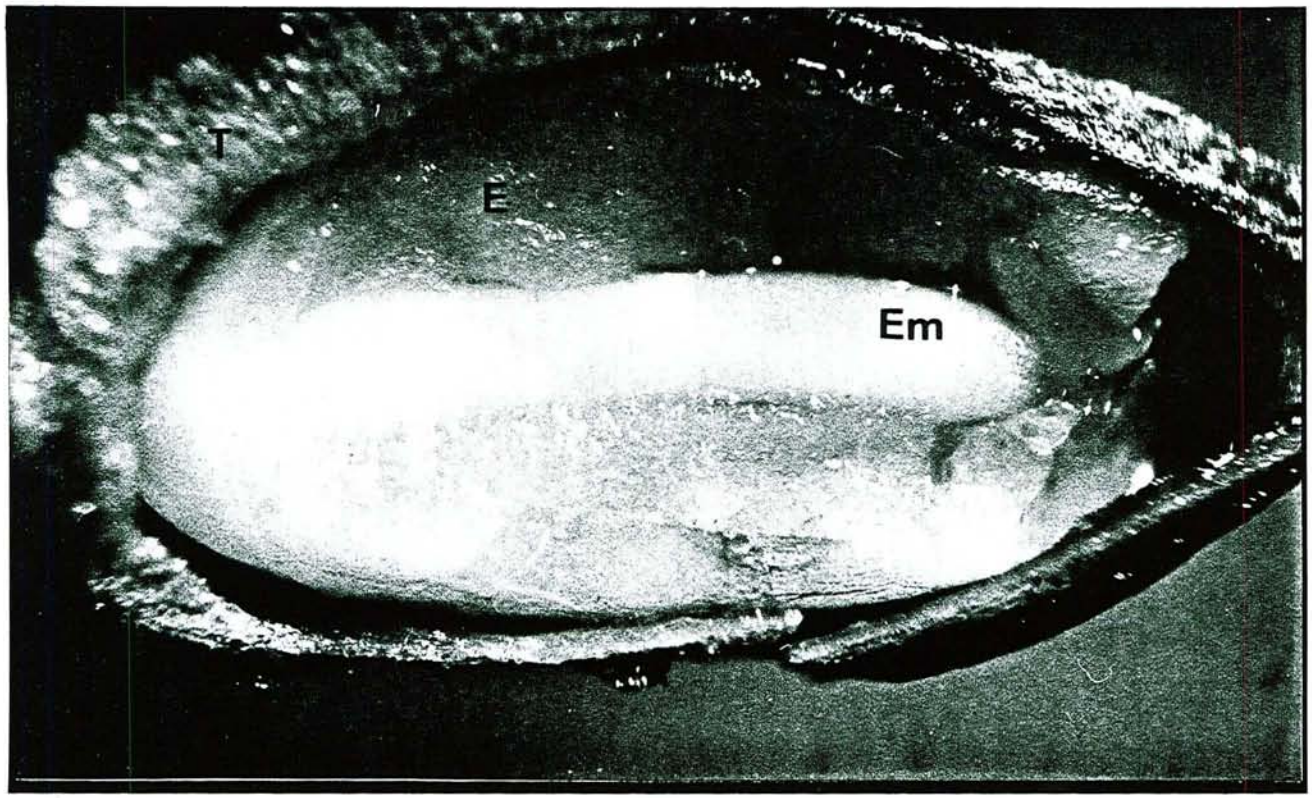

30
20
10
0
GS specific activity (nkatal.mg-1 protein)
EmbryonGS
EndospermGS
TegumentGS
0
1
2
3
4
5
Development stage

S.C.D. - U.H.P.

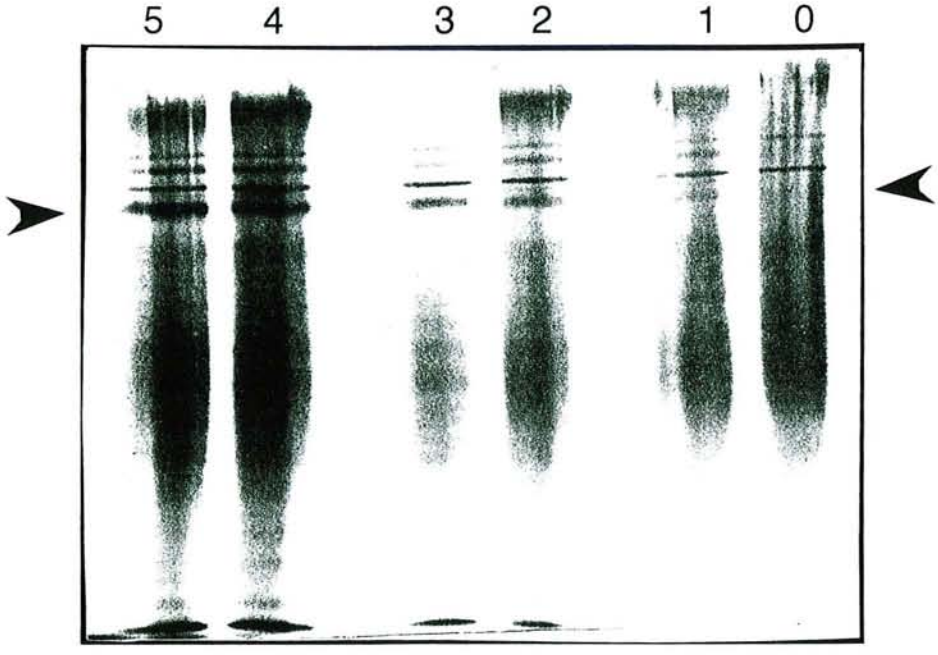

120
100
80
60
40
20
0
% of GS activity
0
2
4
6
8
10
Concentration (mM)
%NH4+
%NO3-

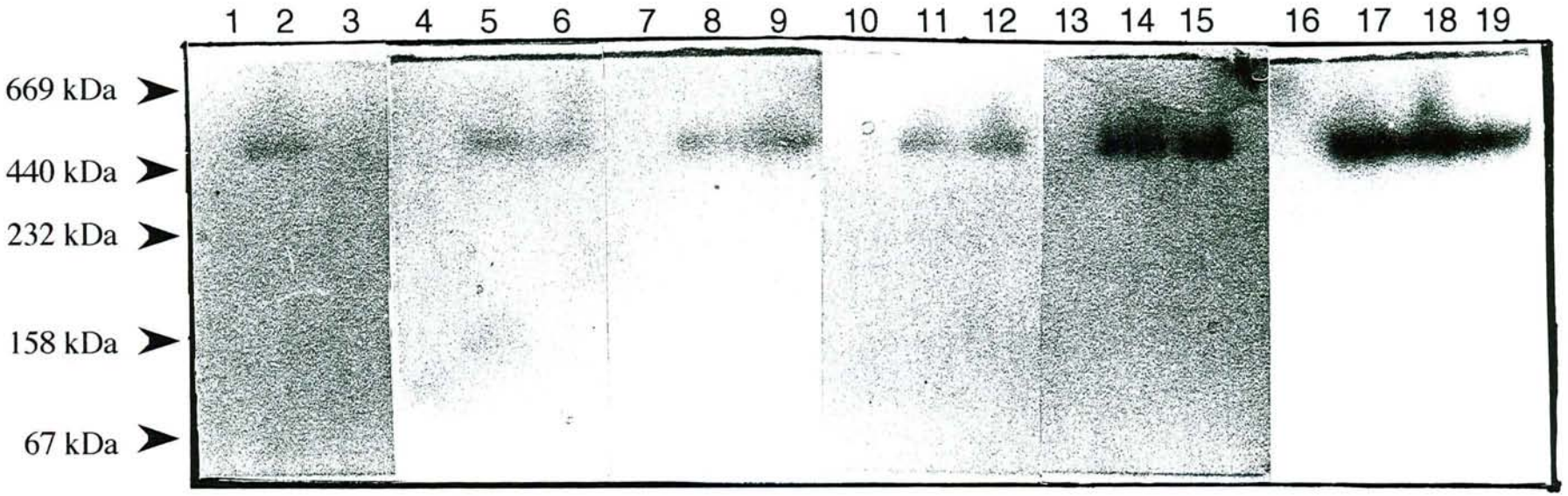

120
100
80
60
40
20
0
% of GS activity
0
2
4
6
8
10
Concentration (mM)
%NH4+
%NO3-


0
1
2
3
4
5


T
E
Em

S.C.D
BIBLIOTHÈQUE




1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
669 kDa
440 kDa
232 kDa
158 kDa
67 kDa

3.4. Effets de la source d'azote sur la croissance et l'activité de quelques enzymes du métabolisme azoté du Douglas.

Résumé

La croissance du Douglas est influencée par la présence ou non d'azote. L'ammonium donne la meilleure croissance avec le meilleur taux de croissance relative (RGR). Les traitements, nitrate seul ou en présence d'ammonium, expriment la même croissance. Comme il fallait s'y attendre, l'absence d'une source d'azote n'est pas favorable au développement de la plante. Les enzymes du métabolisme azoté, et en particulier la glutamine synthétase (GS, EC 6.3.1.2), ont été étudiées durant le développement du Douglas sur différentes sources d'azote. L'activité GS racinaire est affectée par la présence d'ammonium dans la solution nutritive. La glutamate déshydrogénase à NAD (NAD-GDH, EC 1.4.1.2) est aussi influencée par l'azote. L'aspartate aminotransférase (AAT, EC 2.6.1.1) semble ne pas être une bonne enzyme pour étudier les variations d'activité selon des sources d'azote différentes. La distribution de l'activité GS le long du système racinaire a aussi été entreprise. La GS et la NAD-GDH du Douglas semble être régulée par l'azote extérieure.

Mots clés : activité enzymatique; ammonium; aspartate amino transférase; croissance; Douglas; glutamate déshydrogénase; glutamine synthétase; métabolisme de l'azote; nitrate; *Pseudotsuga menziesii*.

Effects of nitrogen source on growth and activity of some enzymes of nitrogen metabolism in Douglas fir.

Bedell J.P., Chalot M. and Botton B.

Laboratoire de Biologie Forestière, associé INRA.Faculté des Sciences,

Université Henri Poincaré, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy CEDEX, FRANCE.

[A] author for correspondence, email: bedell@scbiol.u-nancy.fr

Running title: GS of Douglas fir on differents nitrogen sources

Abstract.

The growth of Douglas fir was influenced by the presence or not of nitrogen. Ammonium treatement gave the best growth with the higher relative growth rate (RGR). Nitrate and both nitrate and ammonium presented the same growth. As expected, the absence of any nitrogen source was not favorable for the development of the plant. Enzymes of nitrogen metabolism, particularly glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2), were studied during the development of Douglas fir on differents nitrogen sources. GS activity in roots was affected by the presence of ammonium in nutritive solution. NAD-glutamate dehydrogenase activity (NAD-GDH, EC 1.4.1.2) was also influenced by nitrogen. Aspartate aminotransferase (AAT, EC 2.6.1.1.) seems not to be a good enzyme for study the variation of activity according to the differents nitrogen sources. Distribution of GS activity along the root system was investigated too . GS and NAD-GDH from Douglas fir seems to be regulated by external nitrogen.

Key words: ammonium; aspartate aminotransferase; Douglas fir; enzyme activity; growth; glutamate dehydrogenase; glutamine synthetase; nitrate; nitrogen metabolism;*Pseudotsuga menziesii.*

Abbreviations: AAT, aspartate aminotransferase; GDH, glutamate dehydrogenase; GOGAT, glutamate synthase; GS, glutamine synthetase; RGR, relative growth rate.

Introduction

The root system anchors the tree in the soil, absorbs water and minerals, and serves as a store for carbohydrates. Knowledge of the structure and development of root systems is essential for full understanding of the ecological requirements of each forest tree. The structure that a natural root system will ultimately possess is determined in large part by the environment in wich early stages of root development occur (Preston, 1972; Eis, 1974).

Thus, in acidic forest soils free ammonium ions are at a relatively high concentration (Berg, 1986) and conifers usually grow well in these such soils. The ammonium ion has to be assimilated into organic molecules because small increases in its concentration can easily result in physiological and metabolic disorders (Miflin and Lea, 1980). It is well established that the cycle glutamine synthetase (GS) (E.C. 6.3.1.2)/glutamate synthase (GOGAT, EC 1.4.7.1) is responsible for primary assimilation of ammonium (Miflin and Lea, 1980; Lea et al., 1992). This enzyme catalyzes the biosynthesis of glutamine from ammonia and glutamate using ATP as an energy source. Although extensive studies have already been performed on pine (Ingestad, 1979; Gezelius, 1986; Canton et al. 1993; Casals et al., 1995) there is little information available concerning the regulation of GS enzymes in woody species on different nitrogen source. The incorporation of ammonium involves too the glutamate dehydrogenase (NAD-GDH, EC 1.4.1.2). GDH functions in nitrogen assimilation only in the presence of GS, when NH_4^+ concentrations are high and under stress (Oaks and Hirel, 1985; Miflin and Lea, 1976; Rhodes et al., 1976; Joy, 1988). Aspartate aminotransferase (AAT, EC 2.6.1.1.) is a key enzyme that transfers the amino group to aspartate from glutamate and oxaloacetate. Transaminations reactions have been found to play an important role in the metabolism of amino acids (Wightman and Forest, 1978). The ammonium initially assimilated into glutamine and glutamate could be allocated to many other compounds by the action of aminotransferases. AAT has been well characterized in various plant tissues and shown to participate in amino acids metabolism (Bryan, 1976). The participation of a variety of enzymes in the uptake, assimilation, and metabolism of NH_4^+ and NO_3^- is one attribute that may have permitted specialization among species for predominatly NH_4^+ or NO_3^- uptake. In

this study, we determined the growth, and some enzymes activities of nitrogen metabolism, particularly GS activity, in needles, and especialy along the root system, of Douglas fir. We believe that the first step in establishing a link between enzymatic activity and the fertilizer reponse of Douglas fir is to define how this enzyme could respond to different environments.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco) (Office National des Forêts, France, Zone 422, 1990) were obtained from the Laboratory of Forest Microbiology (Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches Forestières, Nancy, France). Seeds were surface sterilised in 30% H_2O_2 for 60 min, washed for 4 h in sterile water, and placed on glucose (1g/l) agar in order to detect contaminations (Duponnois and Garbaye 1991). Contaminated seeds were discarded and germinated seeds were transferred to tanks. The tanks were filled with water soaked perlite. Seedlings were grown in a climate-controlled growth chamber with 23°C and 60% relative humidity during the day, 19°C and 70% relative humidity at night, 15 h photoperiod with 6 $W.m^{-2}$ (Gros-Lux, Sylvania). The nutrient solution contained ($mg.l^{-1}$): Na_2HPO_4 (20), KCl (40), $CaCl_2$ (40), $MgSO_4\ 7(H_2O)$ (20), chelated Fe (5.6), $NaMoO_4\ 7(H_2O)$ (0.001), $CuSO_4\ 7(H_2O)$ (0.006), H_3BO_3 (0.09), $ZnSO_4\ 7(H_2O)$ (0.1) and $MnCl_2\ 4(H_2O)$ (0.7). At this nutrient solution was added the nitrogen source($mg\ l^{-1}$) as $(NH_4)_2SO_4$ (50); KNO_3 (100); NH_4NO_3 (100), or without any nitrogen source. Each nutritive solution were adjusted at pH 4.5.

Growth parameters

The values of growth (lenght, FW, DW) and numbers of lateral roots were measured by the means of three different measures with in each cases, eight differents samples. After weighing, mean relative growth rate (RGR) were calculated as:

$$RGR = (\ln FW_1 - \ln FW_2)/\text{months}$$

where FW_1 is the fresh weight at the beginning of the experiment and FW_2 is the fresh weight at the end (Margolis and Vézina, 1988). Dry weight was measured after separated samples into aerial and root part of plant, and dried at 70°C for 48 h.

At different time during experiment, pH values were determined by measuring the nutritive solution retained in perlite.

Enzyme extraction

Roots and needles were washed with distilled water, blotted on filter paper, weighed, and pulverised at 4°C in a chilled mortar and pestle with 30 volumes of buffer A [50 m*M* Tris-HCl, pH 7.6, 5 m*M* $MgSO_4$, 2 m*M* EDTA, 10 m*M* Glu, 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) PVP-40, 10% (w/w) PVPP, and 14 m*M* 2-mercaptoethanol]. The homogenate was centrifuged and the resulting supernatant fractions were used for enzyme activites and proteins determination.

Enzyme and protein assays

GS activity was determined by a modification of the transferase and the biosynthetic assays as previously described by Bedell et al. (1995). AAT was measured as described by Chalot et al. (1991). GDH activity was measured as described by Brun et al. (1992). Protein contents were determined by the Bradford method (1976) using BSA as a standard. The values of activity and proteins were the means of two differents measures obtained by an extract of at least three samples.

Statistics

Standard errors of the means are the values used for represent significant differences.

RESULTS

Growth

Many of growth characteristics showed significant interactions with nitrogen source. Nevertheless, the nitrogen source, was not effective on the growth before 40 days of treatement (Fig.1). After what, growth of Douglas fir was significatly better in ammonium treatement with the best relative growth rate (RGR) obtained (Figs. 1 and 2, Tabs 1 and 2). As expected, the absence of nitrogen in nutritive solution affected the growth (Fig. 2, Tab. 1 and 2). The presence of only nitrate, or both nitrate and ammonium, in the nutritive solution

gave the same quantity of total biomass and the same RGR (Fig. 1 and 2; Tab. 1). The two treatements presented not difference of growth comportement. Whatever was the treatement, the evolution of biomass in fresh weight was exactly the same with the evolution of dry weight. The growth obtained by the treatements was due to the development of Douglas fir and not by a better or not capacity of water uptake.

Moreover the appariton of aerial sytem (like needles) was not dependent of the nitrogen source. In each treatement, aerial party appeared after 14 days (data not shown). The difference found in total biomass seems to be due to a difference in shoot biomass than a difference in root biomass (Tab. 1). Effectively, there is no significant difference in root biomass for the treatement with ammonium or nitrate as nitrogen source (Tab. 1). But root/shoot ratio was different for the two treatements. According to this ratio in case of nitrogen absence, it was more surprised to found the same as treatement with ammonium, but with a significant difference in growth characteristics (biomass, RGR...).

The appearance of lateral roots was not dependent of the nitrogen source (Tab. 2). Without any statistic significant differences, the fourth treatements have any effect of the number of lateral roots detected excepted for the treatement without any nitrogen sources (Tab. 2). The small difference of number was probably the expression of difference in root development according to the treatement.

Enzymatic activity

As the growth, enzymes activities were affected by nitrogen source. AAT activity was the most higher activity measured in comparison with GS and GDH (Figs. 3, 4, and 5). Most of this enzyme activity was detected in aerial party whatever was the treatement (Fig.3, 4, and 5). Concerning GS, most of its activity was detected in roots excepted when Douglas fir growed without any nitrogen source where most of GS activty was present in aerial part (Fig. 3). NAD-GDH activity was the lowest measured and was not more detected in absence of nitrogen after 35 days of growth (Fig. 4). The GDH activity was distributed in the same amount in all the plant. Only the treatement without any nitrogen source have the same effect on the different enzyme activity, it gave the lowest values.

In all treatements, after 35 days-old, GS activity measured was stable and the less found during each experiments. Most of total GS activity was found in the treatement with ammonium as nitrogen source (Fig. 3). Thus, at 18 days-old, GS activity was the higher value and increased five time than one week before. At this time, needles appears but most of this activity was found in roots . After 29 days-old, GS activity was stable (around 15 nkatal.g^{-1} FW). During all the experiment with ammonium, GS activity was rather detected in roots than in needles.

In presence of only nitrate, until needles appears, GS activity was rather detected in this aerial part of plant (Fig. 3). The higher GS activity was measured at the first stade of development

(12 days-old) when root was developped and before the apparition of needles. After what, total GS activity decrease until to become stable at 29 days-old. Nitrate as nitrogen source seems to stimulate the GS in needles. When both nitrate and ammonium were present as nitrogen source, GS activity was rather measured in aerial part of plant (Fig. 3). At 22 days-old, the higher value of GS was measured, around five time more than at 12 days-old (Fig. 3). Then, the activity decreased until 35 days-old where activity become stable.
Whitout any nitrogen source, GS activity was the less measured. Total GS activity was the higher at 22 days-old, and most of this activity was found in aerial part of plant (Fig. 3). At 29 days-old, GS activity fold to a small amount ($\approx$ 5 nkatal.g^{-1} FW) and for the rest of experiment was only detected in aerial part (Fig. 3).

Variation of NAD-GDH activity according to the nitrogen source was more difficult to interpretate. Nitrate and treatement with both nitrate and ammonium presented the higher NAD-GDH activity measured. During the experiment with ammonium, after higher activity measured at 12 and 18 days-old, NAD-GDH was globally decreased except at 40 days-old where a small increase of activity, particularly in roots, was detected (Fig. 4). At 12 days-old GS activity was expressed in root part and at 18 days-old in aerial part. This part of plant present GS activity until 40 days of treatement after what only a small activity was detected in this part of plant. From this 40th day, enzyme activity measured was in roots of Douglas fir. Ammonium appears to inhibit the GDH enzyme,and particularly in needles at the end of experiment.
With nitrate, from 12 to 22 days-old, NAD-GDH activity measured was stable (around 30 nkatal.g^{-1} FW). But after 18 days-old, enzyme activity was present both in root and aerial part (Fig. 4). Excepted a small increase of GDH activity at 40 days of treatement, until 29 days-old activity was globally stable between 10 and 20 nkatal.g^{-1} FW. Nitrate seems to have a small effect on NAD-GDH activity, it permit to measured a GDH activity in aerial part during all the experiment.
With both ammonium and nitrate, after a small increase, due to the NAD-GDH activty measured in aerial part, the enzyme activity was stable until 40 days of treatement (Fig. 4). After the 40th days, NAD-GDH activity detected in needles decreased strongly to a small amount. After what, enzyme activity was stable. The presence of both ammonium and nitrate appears to have two effects, one at the begin of experiment with the keeping of activity and second at the end with the decrease of activty in aerial part of Douglas fir, like what appears separately in each treatement with only either ammonium or nitrate.
Without any nitrogen source, a small increase with a maximum at 18 days-old of NAD-GDH activity was detected in treatement (Fig. 4). After this date, enzyme activity decreased then was not more detected at 35 days-old (Fig. 4). The absence of nitrogen had a stongly effect of NAD-GDH enzyme with the absence of any activity from 35 days of such treatement.

The AAT activity was more easy to interpretate according to the nitrogen source because variation of this enzyme was the same for all treatements. After an increase with a maximum

at 18 days-old, enzyme activity decrease to 29 days-old, more or less according to the treatement (Fig.5 A,B,C, and D). Most of its increase was due to the appearance of AAT activity in aerial part. After what, enzyme decrease to a stable value from 29 to 40 days-old. Until this date, AAT activity reached a small amount, particularly in experiments with ammonium and without nitrogen where at the last day of experiment, any AAT activity was detected (Fig.5 A and D). Most of AAT activity was measured in experiments with both ammonium and nitrate and without any nitrogen source (Fig.5 A, B, C, and D). The nitrogen source appears to have no significant effect on AAT activity. Such variation in enzyme detection was probably an expression of growth or metabolic status effector.

Distribution along the root system

At 1.5 month, most of half of total GS activity (55%) was measured in the apex part of the root system (Fig. 6). At 6 months-old, the GS activity measured in apex decreased to around 30%, then the amount of activit present in the rest of root system was increased (Fig. 6). GS activity in lateral roots was not so varied during the growth (Fig. 6). In the Douglas fir roots of 6 months-old, AAT activity was also measured in the different parts; apex presented 29.6%, lateral roots, 25.8%, and rest of root system presented around 44.6% of activity (data not shown). AAT exhibited globally the same repartition as GS.

DISCUSSION

N-form effects

Some authors report that Douglas-fir made more growth on nitrate-N sources than ammonium (Radwan et al., 1971; Krajina et al., 1973). But total biomass and RGR had the pattern: $NH_4^+ > NO_3^- = NH_4^+ + NO_3^- >$ No N. The slower growth of Douglas fir seedlings with nitrate as the sole nitrogen source compared with the growth of seedlings supplied with ammonium is consistent with other results (Van den Driessche, 1971;Van den Driessche and Dangerfield, 1975; Ingestad, 1979). But soil NO_3^- is more mobile than NH_4^+ (Kamminga-van Wijk and Prins, 1993). Nitrification may thus lead to more nitrogen being available to the root system. Under dry natural conditions of high nitrogen mobility, such as nutrient solutions, Douglas fir prefers NH_4^+ over NO_3^- (Gijsman, 1990; Kamminga-van Wijk, 1991; Kamminga-van Wijk and Prins, 1993).

Without any nitrogen source the growth was the less found. As expected, nitrogen was a limitant factor of development for Douglas fir. The response to nitrate nitrogen source and to solutions nutrients with both ammonium and nitrate was not different. Thus, the two RGR obtained at the end of experiment was similar. In study on western hemlock, the NO_3^- uptake rates were less than half of the rate of NH_4^+ uptake, and in the $NO_3^- + NH_4^+$ treatement the NO_3^- uptake were slower than with the NO_3^- alone (Knoepp et al., 1993). This suggesting

that NH_4^+ may inhibit NO_3^- uptake. Several authors have indicated that the presence of NH_4^+ affects the uptake of NO_3^- in trees (Ingestad, 1979; Boxman and Roelofs, 1988; Finlay et al., 1989; Marschner et al., 1991) and a such negative effect has been already described for Douglas fir (Kamminga-van Wijk and Prins, 1993).

A possible explication of the differences of growth observed was the variation of pH (Gijsman, 1990; Vollbrecht and Kasemir, 1992). The pH values of the different treatement was in the range of 3.88 to 5.18. Effectively, the pH was initially set at 4.5 and it increased to a maximum of 5.18 by nitrate uptake and it decreased to a miminum of 3.88 by ammonium uptake. Rygiewicz et al. (1984 a, b) showed that the rate of uptake of both NO_3^- and NH_4^+ by Douglas fir was constant over a pH range from 3.0 to 5.5. Such pH variation without any effect on Douglas fir was described by Kamminga-van Wijk and Prins (1993). pH was probably not an effector of the difference of growth observed.

Enzyme activity and distribution

All experiments with or without nitrogen source have not significant effect on AAT activity (Fig. A,B, C and D). This enzyme seems not to be a good representative enzyme of external factors variation. As expected, the absence of nitrogen affect strongly the detection of enzyme activity. Thus, NAD-GDH activity and GS roots activity could be not more detected (Figs. D and D). Ammonium seems to be more effective on GS roots and inhibit NAD-GDH (Figs. A and A). Nitrate appears to inhibit GS roots and stimulate NAD-GDH in aerial part. The presence of both ammonium and nitrate is effective both as ammonium alone and nitrate alone. GS and NAD-GDH activity were varied as some time like in ammonium and other time as in nitrate treatement.

The pathway of N assimilation is the GS/GOGAT enzyme system (Martin et al., 1986). It has been reported that environmental factors, such as light and nitrogen supply, have a limited role in GS accumulation during the first stade of development in pine (Canovas et al., 1991). In the early development of *Pinus pinaster*, the accumulation of the glutamine synthetase appearance may be underdevelpomental control (Canovas *et al.*, 1991). However, GS activity was not related to N form or uptake rate in both coniferous and herbaceous species (Vollbrecht et al., 1989; Knoepp et al., 1993). But N-regimes influenced the enzymatic activities of red oaks and red ash seedlings, with some differences on the GS (Truax et al., 1994). Shoot GS (particularly the chloroplastic form) represents the photorespiration pathway of NH_3 in plants (Lea et al., 1990), and root GS is associated with the assimilation of NH_4^+ taken up from the soil (Andrews 1986). GS is also involved with incorporating products of NO_3 reduction in leaves and roots. Thus, one explication of lower GS activity measured in aerial part was the possible under-estimation by this extraction buffer of one isoform. Nevertheless, GS activity of needles detected in treatement without nitrogen source corresponded probably to the reassimilation of nitrogen from the photorespiratory. And in

presence of ammonium, increase of GS activity was due to an increase of assimilation in roots of this substrate. Moreover, GS root of Douglas fir exhibited a negative cooperativity for ammonium (Bedell et al., 1995), and so it was one more reason to found this preference for this ion. When nitrate was present in nutritive solution, both reduction of this ion occurs in roots and in needles, and give GS activity in the two part of plant.

Although GS/GOGAT is the major pathway for N assimilation, GDH activity is stimulated when NH_4^+ is added (Rhodes et al., 1976; Oaks and Hirel, 1985;), or not (Tirado et al., 1990). There is some evidence that the main role of GDH is recycling glutamate (Robinson et al., 1991; Fox et al., 1995; Stewart et al., 1995). A such decrease of NAD-GDH activity, particularly in leaves, in presence of ammonium have been described by Tirado et al. (1990), and they described also an increase in presence of nitrate. They explain this augmentation by the fact that when nitrate was reduced, there was an accumulation of organics anions (Chaillou et al., 1986). This accumulation needs the intervention of anaplerotics reactions in order to keep a good fraction of cetonics acids (like α-cetoglutarate). Thus, the desamination of glutamate was operated to give α-cetoglutarate and NADH for the respiratory chain. NAD-GDH activity was also probably increase in our experiment by nitrate in order to recycling glutamate, and it was one explication of the disappearance in experiment whitout nitrogen where no nitrogen was fixed or reduced.

The present study indicates that the tap-root form is basic to Douglas fir during its seedling stage. But during the late seedling stage, as the oblique laterals increase in size, the root systems take on a bell-shaped form. This form was already described for Douglas fir excavated (Eis, 1973). The plant root, as well-organized collection of cells differing in both developmental stage and cell-type, has long been know to exhibit regional differences in nutrient absorption, translocation, and assimilation processes. Thus, cell differentiation is generally accompanied by structural changes and these physical alterations can sometimes be correlated with underlying changes in the activity of one or more enzymes. For example, invertase activity is known to be highest in the region of maximal cell elongation in roots (Robinson and Brown, 1952; Moll, 1971; Lyne and ap Rees, 1971)., and the distribution of this activity was not uniformed according to the different region in *Vicia faba L.* roots (Macleod and Francis, 1977). Decrease of GS activity in apex could be expain by the augmentation of number of lateral roots which were so many news zones of assimilation and by the augmentation of the root system whit some increase in the hairoots zone. Nevertheless, the apex was a rich zone in GS activity and the enzyme because there was around 30% of GS activity for around 4% of total protein (data not shown). GS distribution along root system seems to be influence by other factors as development of root system, or for example lignification of some parts of this root system.

It is interesting to note that the majority of the data concerning N-form preferences support ammonium N-nutrition for conifers (Plassard 1983; Gijsman, 1991). This particularity is linked with specific soil conditions (low nitrification and principally NH_4 availability) wher

conifers generally grow (Carlyle and malcom, 1986). The aim of this study was to link enzymatic activity with response of fertilizer. here we find that AAT activity was not an enzyme which have different response to nitrogen sources. But GS and NAD-GDH activites seems to be affected by environmental nitrogen. Particularly, GS isoforms expression were influenced according to the treatement. Thus, GS root activity was stimulated by the presence of ammonium in nutritive solution. nevertheless, GS distribution along the roots system seems to be more dependant of the development of roots than nitrogen sources.

Figure 1: Evolution of fresh weight (FW) and dry weight (DW) of Douglas fir fertilized with either NH_4^+, NO_3^-, both NH_4^+ and NO_3^-, or without any nitrogen source. *, not significant different.

Figure 2: Representation of Douglas fir growth at 48 days-old. Douglas fir 1, is growth on ammonium; 2, on nitrate; 3, without any nitrogen sources; and 4, with both ammonium and nitrate in nutritive solution.

Figure 3: GS activity (nkatal.g^{-1} FW) of Douglas fir fertilized with either NH_4^+ (A), NO_3^- (B), both NH_4^+ and NO_3^- (C), or without any nitrogen source (D). Verticals bar, when they are presents, indicate SE significately different for the values ($P<0.05$). RP, root part; AP, aerial part; WP, whole plant. Be carefull of the difference of scale between the graphic A and B,C, D.

Figure 4: NAD-GDH activity (nkatal.g^{-1} FW) of Douglas fir fertilized with either NH_4^+ (A), NO_3^- (B), both NH_4^+ and NO_3^- (C), or without any nitrogen source (D). Verticals bar, when they are presents, indicate SE significately different for the values ($P<0.05$). RP, root part; AP, aerial part, WP; whole plant.

Figure 5: AAT activity (nkatal.g^{-1} FW) of Douglas fir fertilized with either NH_4^+ (A), NO_3^- (B), both NH_4^+ and NO_3^- (C), or without any nitrogen source (D). Verticals bar, when they are presents, indicate SE significately different for the values ($P<0.05$). RP, root part; AP, aerial part; WP, whole plant.

Figure 6: Distribution of GS activity (%) in the root system of Douglas fir at 1.5 and 6 months-old.



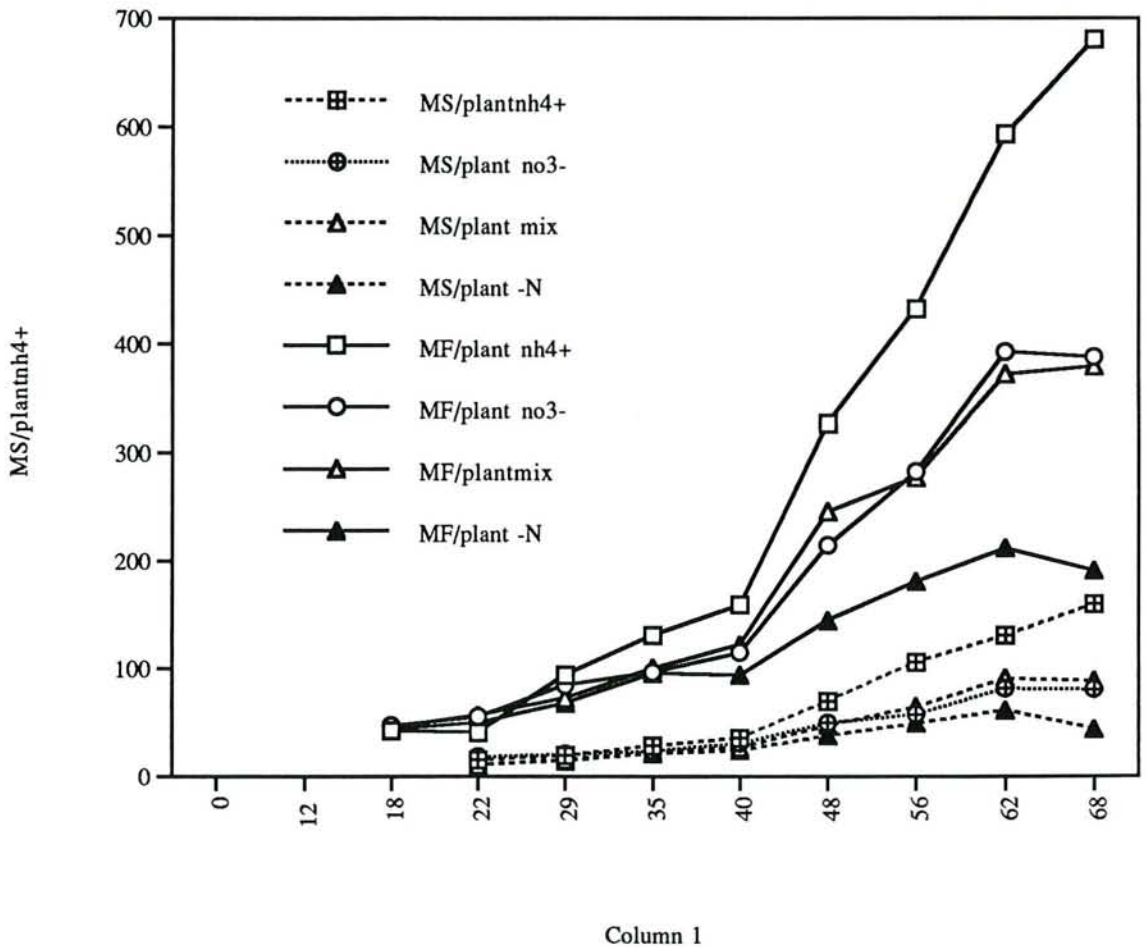


S.C.D. - U.H.P.
BIBLIOTHÈQUE

Table 1: Growth characteristics of Douglas fir seedlings grown with NH_4^+, NO_3^-, both or whitout a nitrogen source. Values are the means (± SE) of three different measures with eight differents samp for each treatement. Within the same row, values with different letters are significantly different at 0.05. (RGR= relative growth rate).

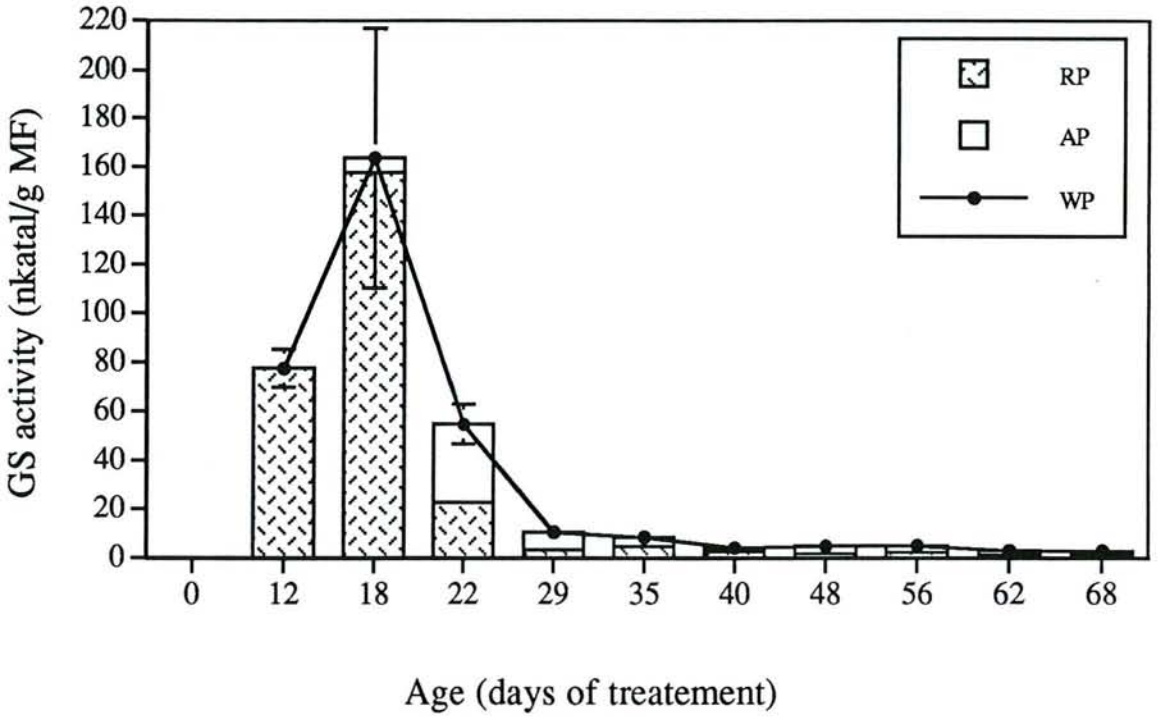
Parameter	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+/NO_3^-	-N
Total biomass (mg of FW/plant)	680.71 ± 98 a	386.98 ± 86 b	378.5 ± 94 b	190.53 ± 84
Root biomass (mg of FW/plant)	276.93 ± 48 a	172.48 ± 65 ab	139.95 ± 51 b	75.4 ± 39 c
Shoot biomass (mg of FW/plant)	403.78 ± 35 a	214.5 ± 28 b	238.55 ± 54 b	115.13 ± 10
Root/shoot ratio	0.68 ± 0.04 a	0.59 ± 0.03 b	0.59 ± 0.02 b	0.65 ± 0.02 a
RGR ($g\ g^{-1}\ month^{-1}$)	1.81 ± 0.04 a	1.38 ± 0.03 b	1.38 ± 0.02 b	0.95 ± 0.03

Data mlx nutrif

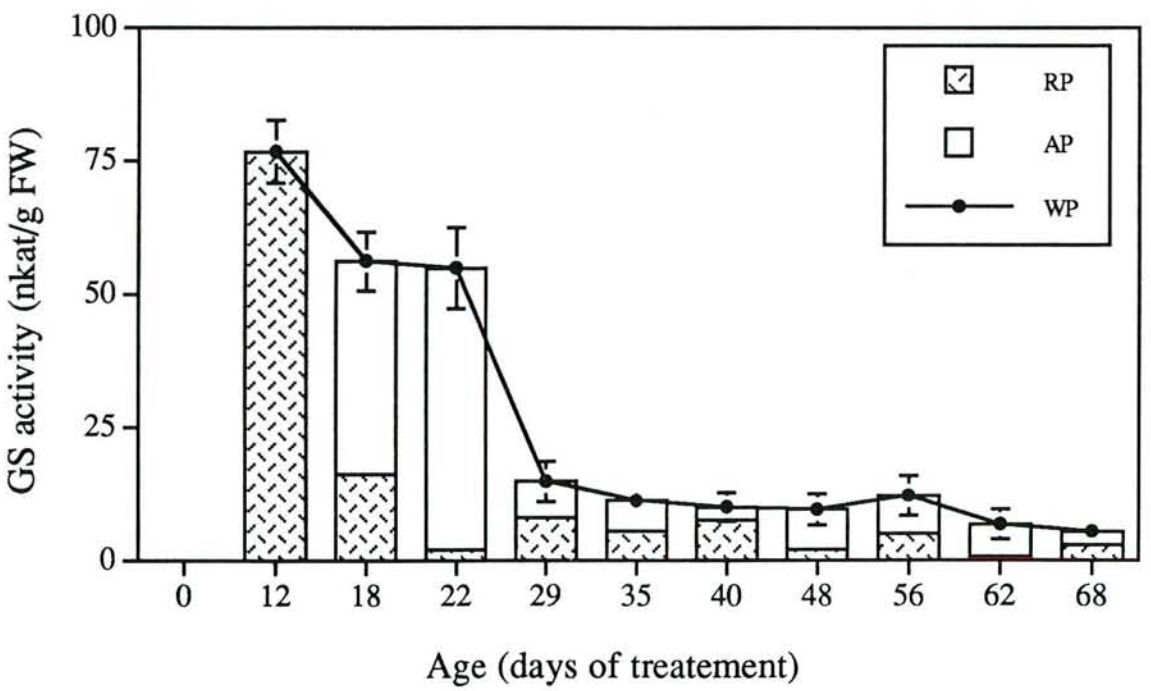


Column 1

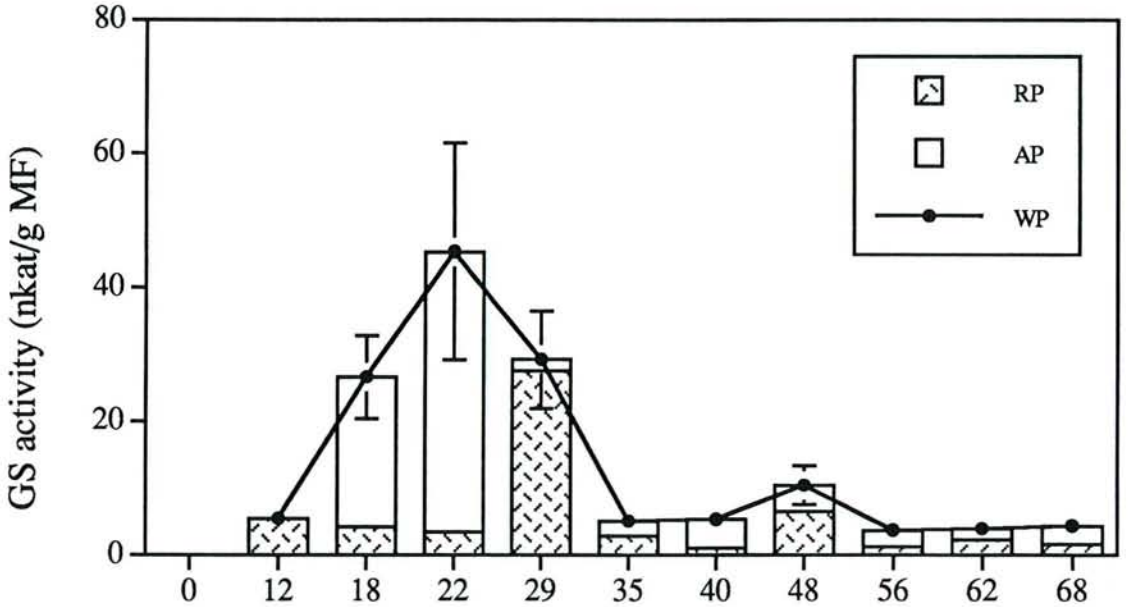
NH4+


GS activity (nkatal/g MF)
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
RP
AP
WP
Age (days of treatement)

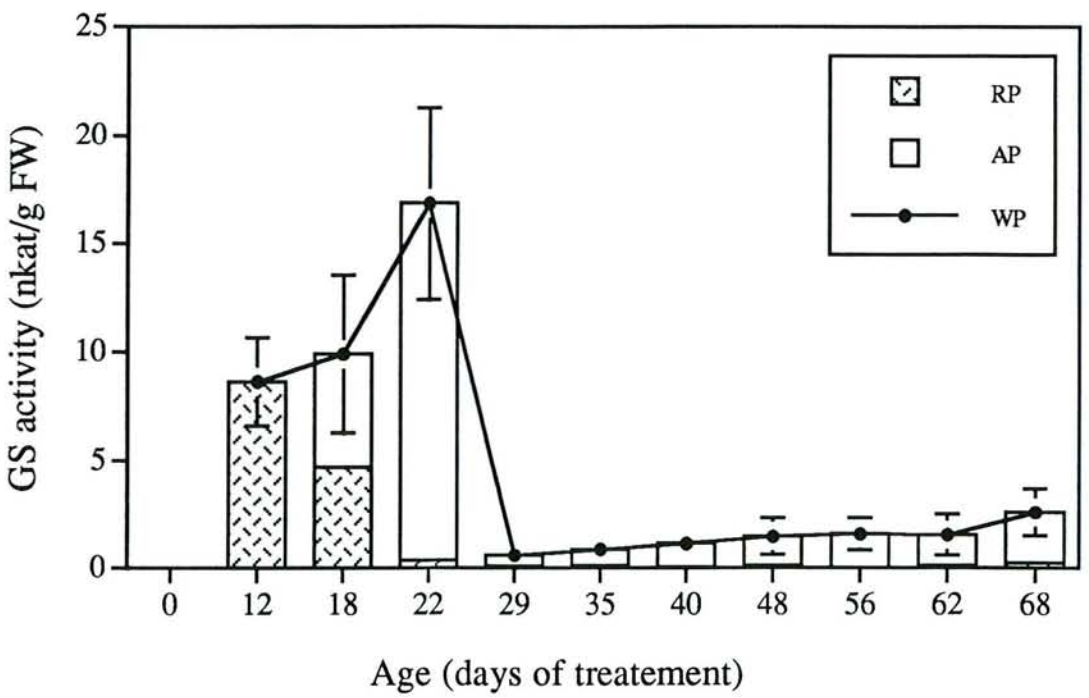
NO3-


GS activity (nkat/g FW)
100
75
50
25
0
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
RP
AP
WP
Age (days of treatement)

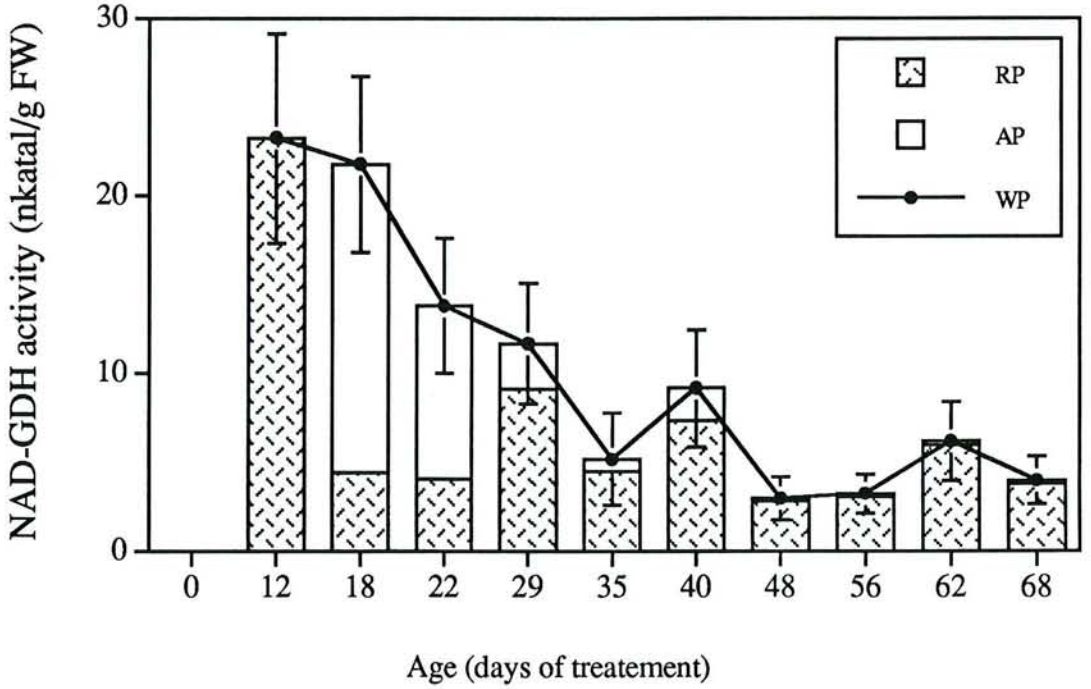
MIX


80
60
40
20
0
GS activity (nkat/g MF)
RP
AP
WP
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
Age (days of treatement)

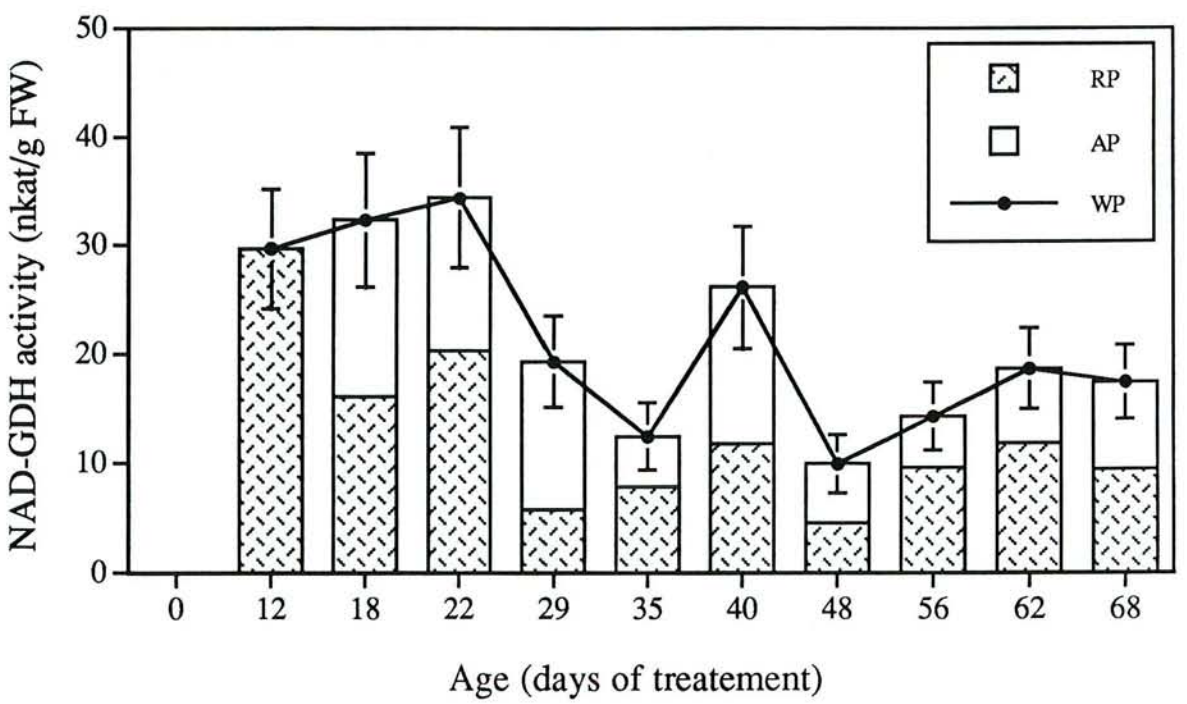
-N

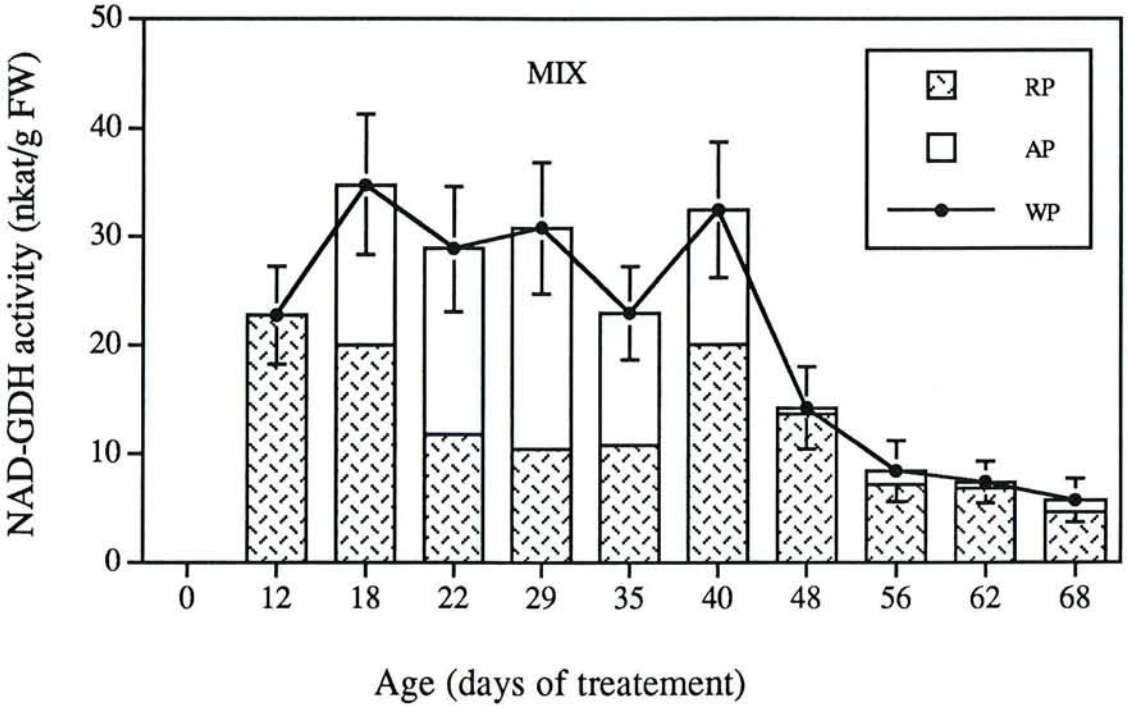

25
20
15
10
5
0
GS activity (nkat/g FW)
RP
AP
WP
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
Age (days of treatement)

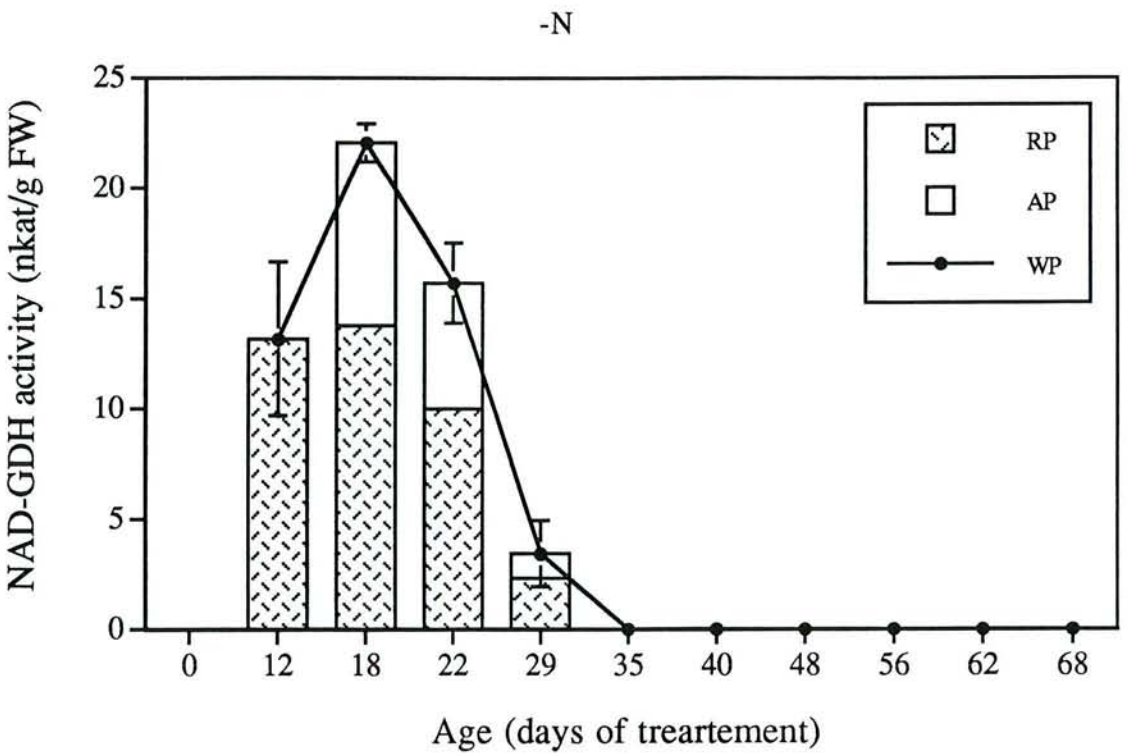
NH4+


NAD-GDH activity (nkatal/g FW)
30
20
10
0
RP
AP
WP
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
Age (days of treatement)

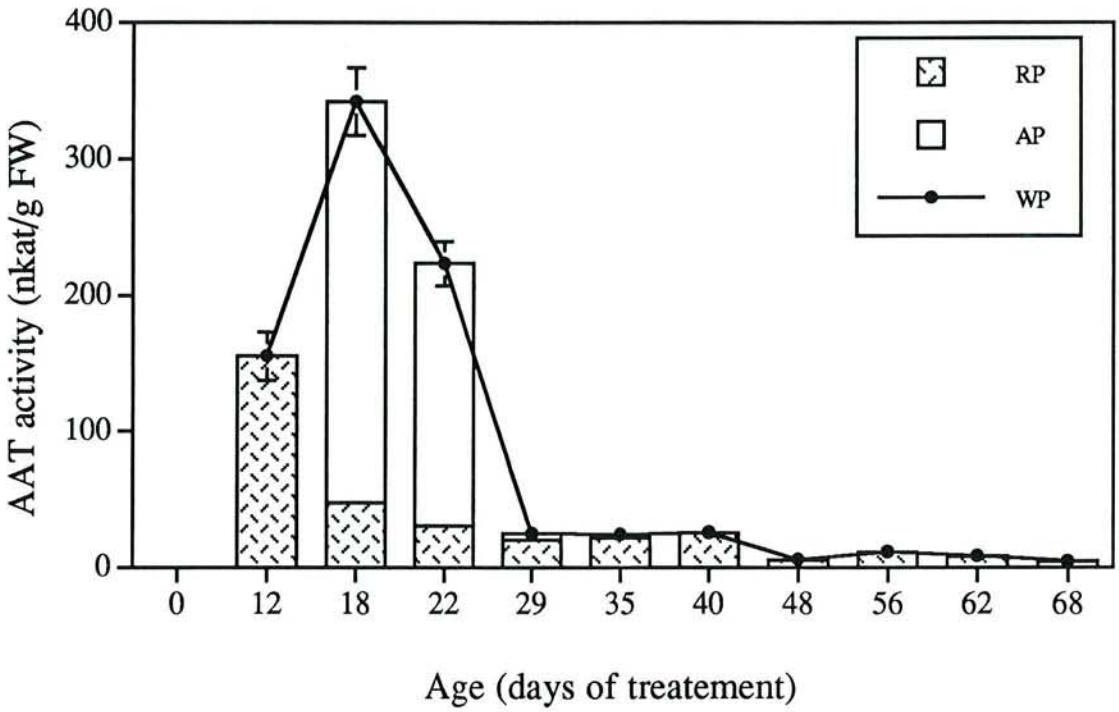
NO3-


NAD-GDH activity (nkat/g FW)
50
40
30
20
10
0
RP
AP
WP
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
Age (days of treatement)

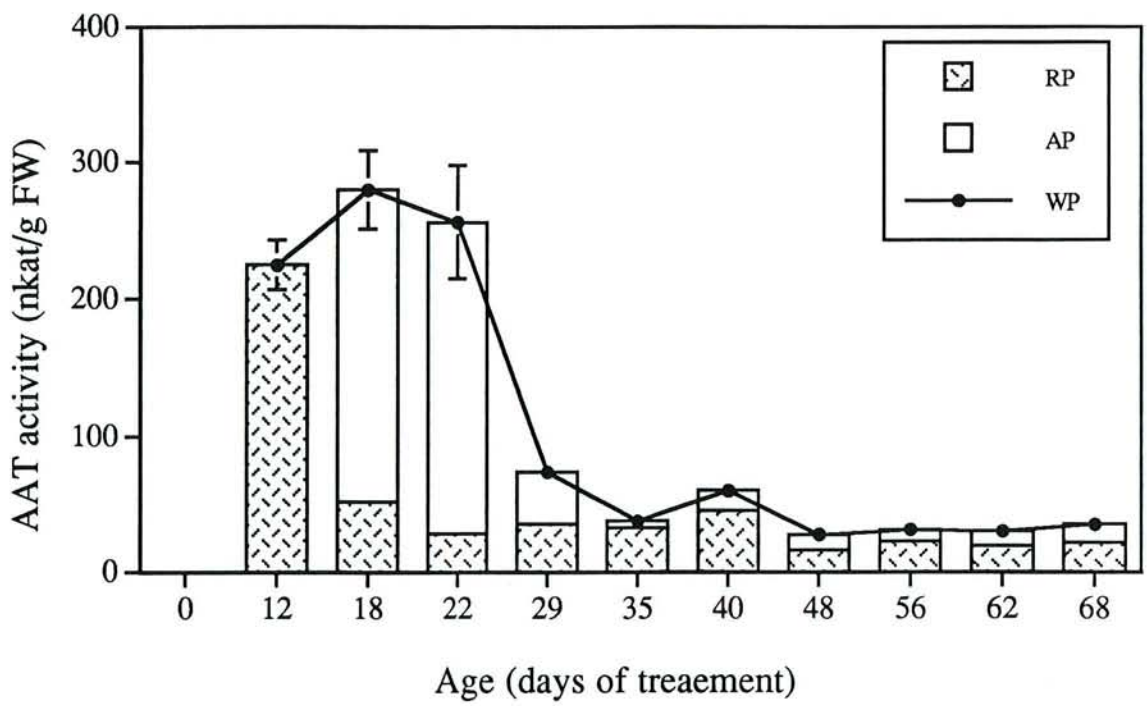

MIX
RP
AP
WP
NAD-GDH activity (nkat/g FW)
50
40
30
20
10
0
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
Age (days of treatement)


-N
RP
AP
WP
NAD-GDH activity (nkat/g FW)
25
20
15
10
5
0
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
Age (days of treartement)

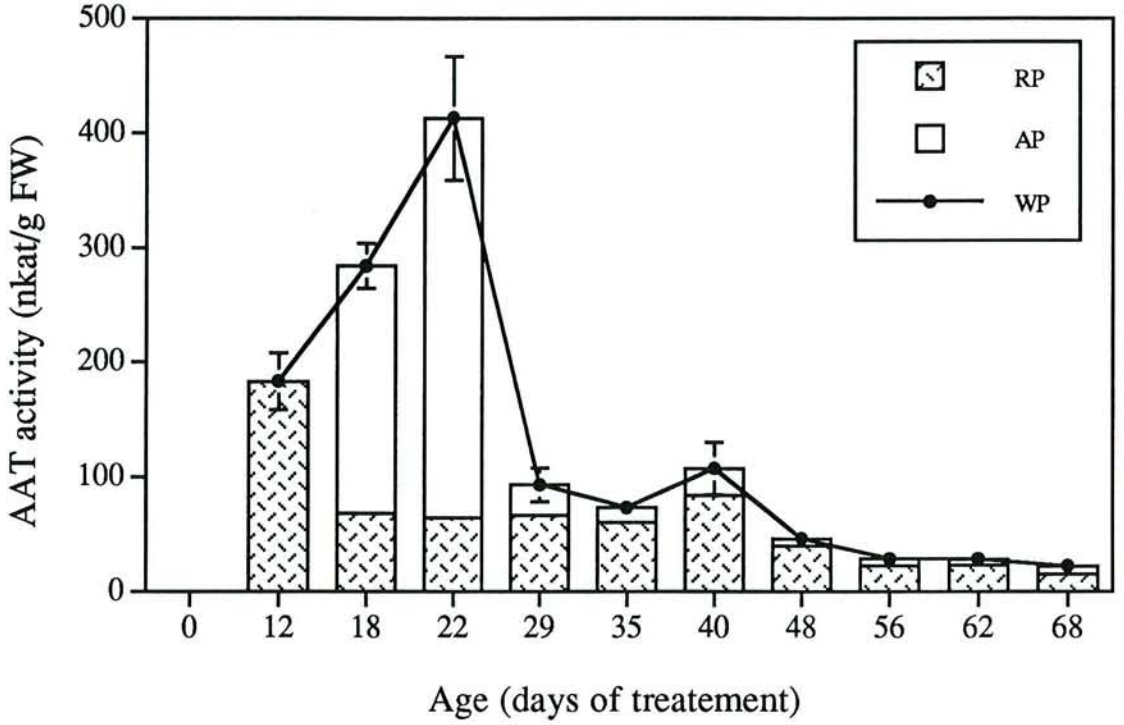
NH4+


400
300
200
100
0
AAT activity (nkat/g FW)
RP
AP
WP
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
Age (days of treatement)

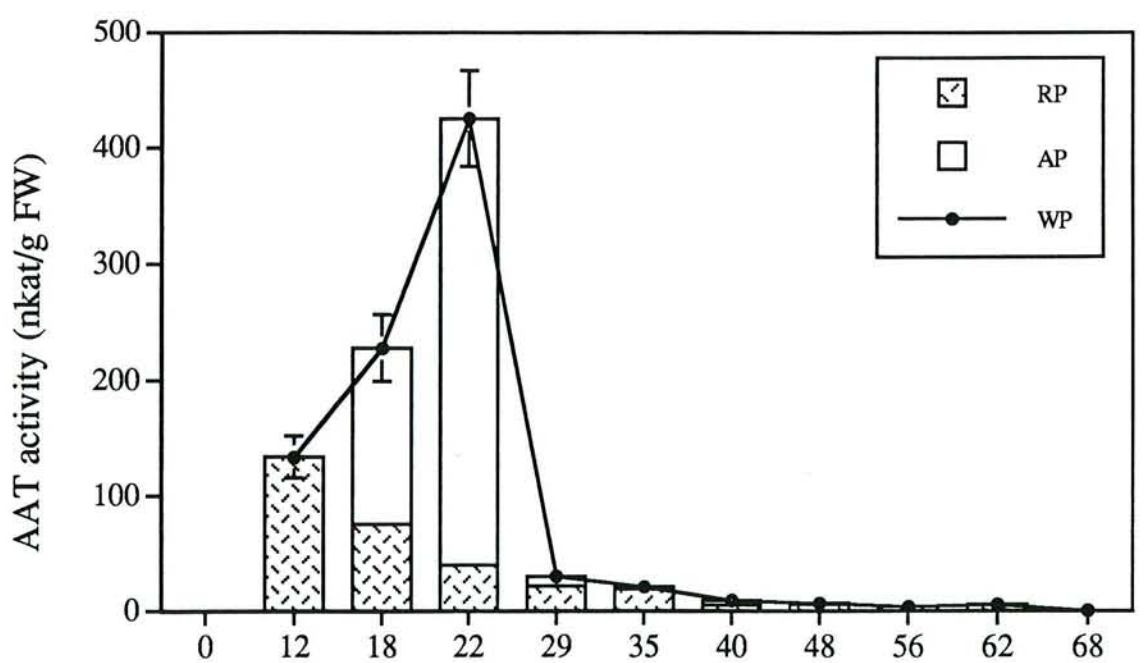
NO3-


400
300
200
100
0
AAT activity (nkat/g FW)
RP
AP
WP
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
Age (days of treaement)

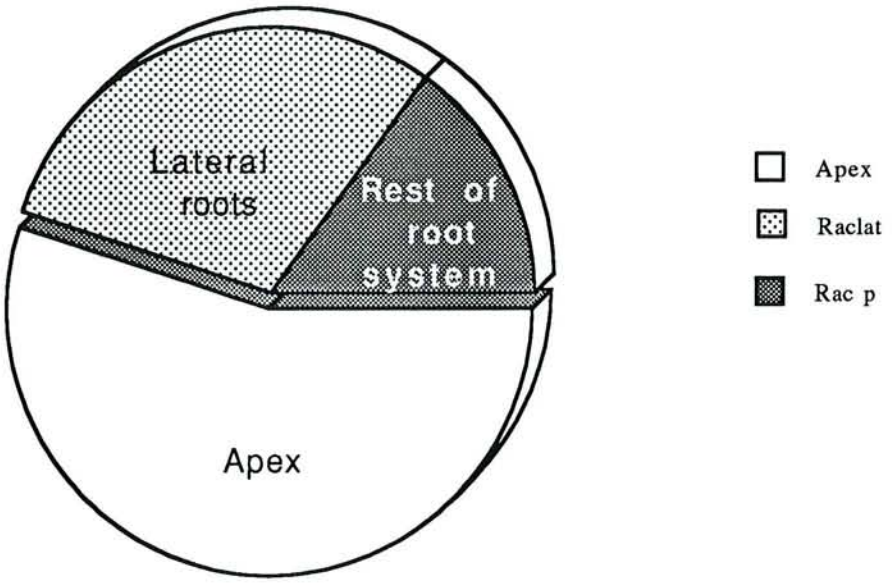
MIX


AAT activity (nkat/g FW)
500
400
300
200
100
0
RP
AP
WP
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68
Age (days of treatement)

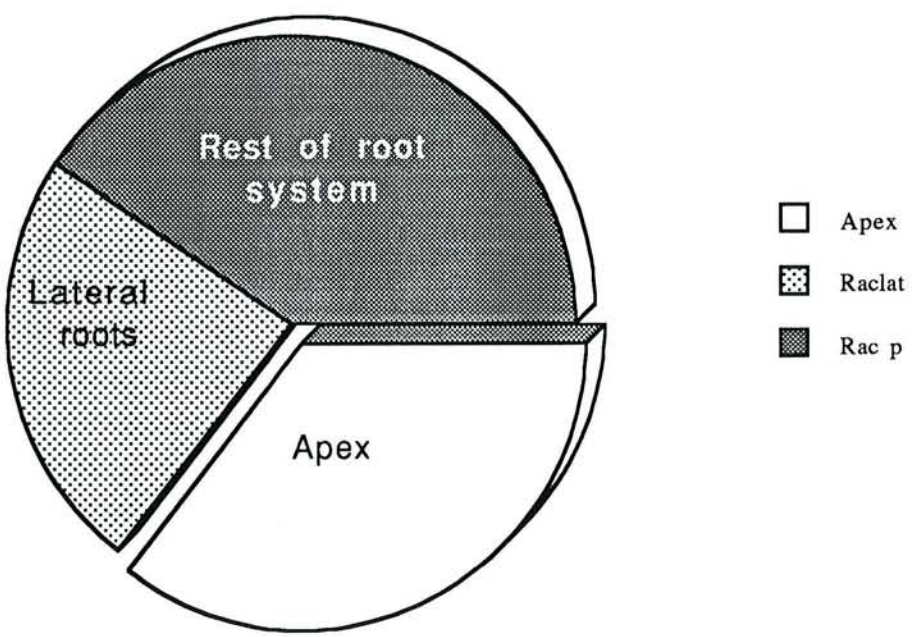
-N


AAT activity (nkat/g FW)
500
400
300
200
100
0
RP
AP
WP
0
12
18
22
29
35
40
48
56
62
68

1,5 mois



6 mois



Chapitre 4 : Discussion générale et conclusions

4.1. DISCUSSION GÉNÉRALE :

Les résultas présentés dans ce mémoire contribuent à la compréhension des mécanismes de régulation des enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote. Notre projet de recherche a surtout été consacré à l'étude de la glutamine synthétase racinaire d'un conifère, le Douglas.
Le choix du Douglas est justifié par son intérêt pour la sylviculture. C'est l'arbre à feuilles persistantes le plus répandu en Amérique du Nord (Canada, U.S.A). Actuellement, cet arbre représente au plan national 25 % des reboisements, voire jusqu'à 60 % dans certaines régions comme le Limousin (De Champs, 1990). Cette essence paraît forte intéressante pour l'exploitation forestière car elle possède de nombreuses qualités, comme son rendement exceptionnel: 15 m^3/ha/an minimum (Lanier, 1986). C'est un arbre qui est très adapté à un climat tempéré, à des altitudes moyennes et à des sols profonds et modérément acides. Il possède une croissance rapide pouvant atteindre une hauteur maximale de 90 à 100 m dans son pays d'origine. Sa longévité est supérieure à tous les autres résineux et il résiste bien aux gelées et aux parasites. Le Douglas possède un enracinement peu tenace en sol lourd car celui-ci est oblique, ample et à deux niveaux; en conditions défavorables, il est plus ou moins profond ou superficiel. Ce succès de l'espèce, quant au reboisement des forêts, ne semble pas être appelé à décroître au vu de ses qualités, supérieures à celles de beaucoup de résineux indigènes (Mélèze du Japon, *Abies grandis*), voire d'espèces autochtones (Pin sylvestre, Epicéa commun).

Pour notre étude de la GS racinaire du Douglas nous avons donc :

⇒ caractérisé la glutamine synthétase racinaire du Douglas, et

⇒ regardé l'influence de l'azote du milieu extérieur sur le métabolisme azoté de ce végétal, et

⇒ abordé la distribution des enzymes du métabolisme azoté lors de sa mycorhization.

La première partie de cette discussion rappelle les résultats obtenus au cours de l'étude des propriétés physicochimiques de la GSr du Douglas. Une approche de la caractérisation de l'enzyme à l'aide des anticorps anti-GS racinaire obtenus sera décrite. Les principales propriétés de l'enzyme seront discutées. Dans une deuxième partie, la distribution de l'activité GS ainsi que l'influence de la source azotée seront également discutées. Bien que les travaux présentés dans ce

Tableau 4.1 : Principales propriétés physico-chimiques des glutamines synthétases de quelques conifères.

Espèces	Type de GS	Propriétés					
		MM (kDa)		pH opt.	Km		
		Enz. native	sous-unité		NH_4^+ (μM)	Glu (mM)	ATP (mM)
Pin	GS_r	336*	40-44	6,1-6,4	19,2	1,85	2,3
	GS_2	336*	40-44	6,2-6,5	33,1	1,14	2,9
Douglas	GS_r	460	64-54	7,6	11-75 (-)	2,6	0,5

(* = valeur estimée; (-) signifie qu'il existe une coopérativité négative)

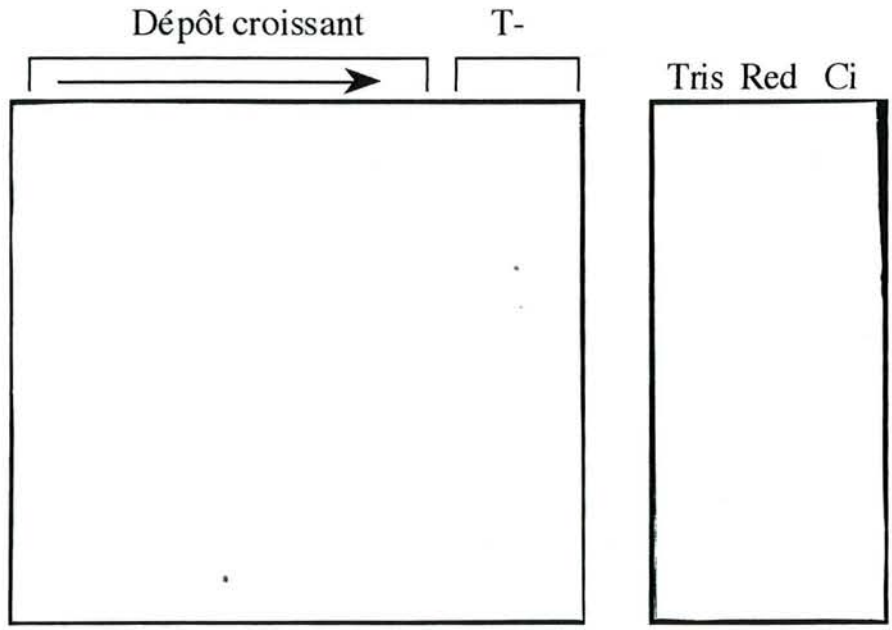


Figure 4.1 : Empreintes immunologiques de la GS racinaire du Douglas après dénaturation des protéines et électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes.

Les notations suivantes signifient : dépôt croissant, des quantités de plus en plus importantes en protéines d'un extrait semi-purifié de GS ont été déposées dans les différents puits; T-, des témoins contenant uniquement du tampon de Laemmli ont été déposés dans ces puits; Tris, un extrait issu d'une DEAE-Trisacryl a été déposé dans ce puits; Red, un extrait issu de la Red A a été déposé ici; Ci, un extrait issu de la colonne d'immunoabsorption a été déposé dans ce puits.

mémoire portent principalement sur l'étude de la GS chez le partenaire végétal seul, nous évoquerons quelques données obtenues sur la régulation d'enzymes du métabolisme azoté lors de la mycorhization du Douglas par *Laccaria bicolor* S238N

4.1.1. Caractérisation de la glutamine synthétase racinaire.

La purification de la GS racinaire du Douglas a fait appel à différentes techniques de chromatographie qui se sont avérées efficaces pour l'obtention d'enzyme pure (Hirel et Gadal, 1980; Vézina et Margolis, 1990; Brun *et al.*, 1992). Cette purification avait notamment pour but avoué l'obtention d'anticorps anti-GS racinaire.

La GS du Pin a été purifiée et étudiée tant au niveau biochimique que moléculaire (Vézina et Margolis, 1990; Canton *et al.*, 1993). Les propriétés physico-chimiques de la GSr du Douglas sont quelques peu différentes du Pin (Tableau 4.1). Chez le Pin , aucune coopérativité n'a été mise en évidence pour l'ammonium mais la constante d'affinité déterminée pour ce substrat est aussi de l'ordre du micromolaire (Tableau 4.1). Le pH optimum déterminé est légèrement plus faible pour le Pin que pour le Douglas. Que ce soit pour la GS racinaire du Pin ou du Douglas, l'ion magnésium et plus généralement les cations divalents, semblent être des effecteurs potentiels de l'activité glutamine synthétase des conifères. Si l'alanine semble peu influencer la GS racinaire du Douglas, il n'en est pas de même de la glycine qui peut inhiber cette enzyme jusqu'à près de 60%. Chez *Lemna minor* , Stewart et Rhodes (1977) ont mesuré une baisse de l'activité GS en présence de glycine et d'alanine. Et chez les nodules racinaires du Soja, on a pu également mettre en évidence un effet inhibiteur de l'ADP, et de l'AMP-5' (McParland *et al.*, 1976).
La masse moléculaire de la GS des deux conifères diffère peu de celle trouvée pour les Angiospermes (cf chap.1). La masse moléculaire de l'enzyme native du Douglas est supérieure à celle du Pin (Tableau 4.1). Deux sous-unités de masse moléculaire différente ont été mises en évidence à la fois chez la glutamine synthétase racinaire de *Pseudotsuga menziesii* et de *Pinus banksiana* (Vézina et Margolis, 1990). Cependant une seule sous-unité de 43 kDa est identifiée dans les racines de *Pinus pinaster*, mais cette identification s'est faite à l'aide d'anticorps anti-GS chloroplastique de feuilles de tabac (Cánovas *et al.*, 1991). Au cours de cette expérience sur le Pin, Cánovas *et al.* (1991) ont également montré la révélation par western-blot d'un deuxième polypeptide moins important de 38 kDa qui disparaissait dans les stades de croissance plus avancés.

L'emploi des anticorps obtenus pour la GS racinaire du Douglas a mis en évidence une bande d'intensité très marquée à 54 kDa qui augmente en intensité lorsque l'on augmente la quantité de protéines déposées et une plus faible à 64 kDa qui varie peu en fonction de la quantité déposée (Figure 4.1). Des essais réalisés avec des témoins en présence ou non de 2-mercaptoéthanol dans le tampon de Laemmli ont montré la révélation d'un artéfact au même Rf que le polypeptide à 64 kDa. L'obtention d'enzyme pure grâce à une chromatographie d'immunoabsorption a permis de

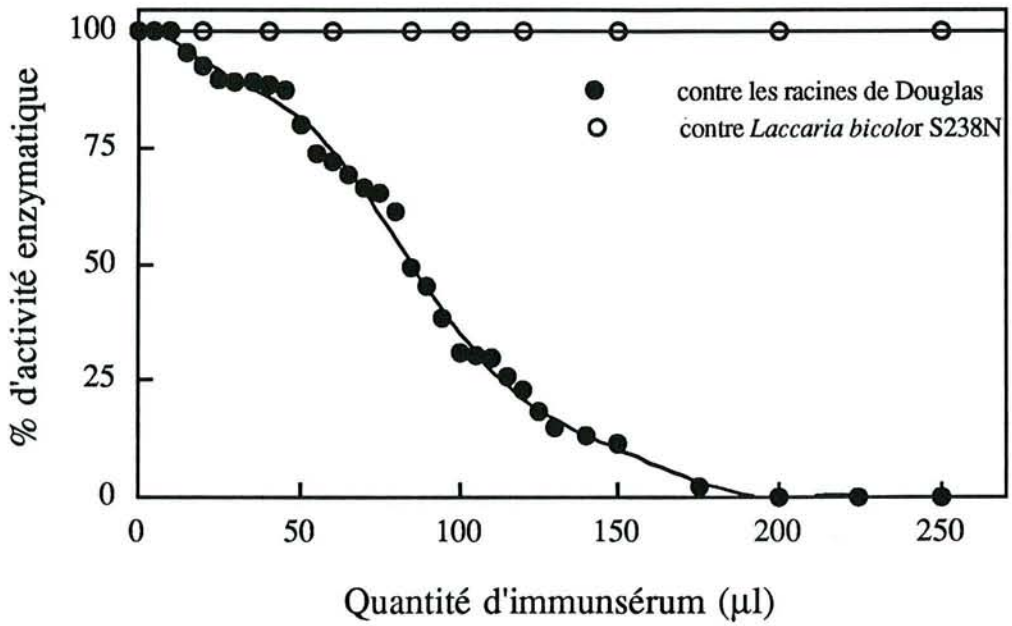


Figure 4.2 : Courbes d'immunoprécipitation de la GS par l'immunsérum anti-GS des racines de Douglas

Tableau 4.2 : Effet de l'ammonium et du nitrate sur l'activité de la glutamine synthétase.

Espèces	NH_4^+	NO_3^-
Pisum sativum L. [a]	=	+
Sinapis alba L. [b]	—	+
Pinus pinaster [c]	=	=
Pseudotsuga menziesii	+	—

[a], Vézina and Langlois (1989); [b], Schmidt and Mohr (1989); [c], Cánovas et al. (1991). Le signe (=) signifie qu'il n'y pas d'effet de la source azotée sur la GS, le signe (+) une stimulation de son activité, et le signe (-) une diminution.

réaliser des westerns-blot où on retrouvait également les deux bandes distinctes. Il semblerait qu'il y a effectivement un artéfact dû au 2-mercaptoéhanol qui cache ou se superpose à la première bande de faible intensité. Il serait intéressant de voir si cette première faible bande varie ou non selon des conditions extérieures de croissance. L'immunoprécipitation quantitative de la GS racinaire du Douglas a donné la courbe représentée dans la figure (4.2). L'activité GS du surnageant diminue décroît progressivement puis s'annule lorsque les quantités d'immunsérum anti-GS ajoutées, augmentent. Aucune activité GS n'est mesurée dans le surnageant lorsque l'on a ajouté des volumes d'immunsérum supérieur à 200 µl. Des témoins réalisés avec *Lac. bicolor* ont montré qu'il n'y avait pas de reconnaissance entre les anticorps dirigés contre la GS du champignon et ceux dirigés contre la GS de la plante.

4.1.2. Influence de l'azote et distribution de la glutamine synthétase.

La distribution des différentes isoformes de la GS a été très bien développée ces dernières années (Lea *et al.*, 1992). Les isoformes de la GS sont importants pour les différents aspects du métabolisme de l'ammonium. L'isoforme racinaire paraît avoir surtout un rôle dans l'assimilation primaire de l'ammonium. La GS cytosolique joue un rôle dans la translocation et la mobilisation des réserves de la graine lors de la germination (Ta, 1991). Et l'isoforme chloroplastique a surtout une fonction dans la réassimilation de l'ammonium issu de la photorespiration ou de la réduction du nitrate (Redinbaugh et Campbell, 1993). La GS apparaît dès la germination des graines de Douglas, et son évolution lors du développement du végétal est semblabe à celle décrite pour le Pin, du moins aux stades précoces (Cánovas *et al.*, 1991). De part sa localisation dans le sol et son affinité pour l'ammonium, il était intéressant de regarder l'influence de l'azote sur cette enzyme. Cependant, les constantes d'affinité sont déterminées *in vitro* à partir d'extraits purifiés. Ces valeurs ne reflètent pas toujours ce qui se passe *in vivo*. Mais des concentrations cellulaires en ammonium comprises entre 0,5 et 1,7 mM ont été mesurées chez un autre conifère, l'Épicéa (Chalot *et al.*, 1991b). En supposant que l'on trouve la même échelle de valeurs en ammonium chez le Douglas, on peut penser que la GS racinaire opère*in vivo* avec son affinité élevée.

L'ammonium et le nitrate sont les sources d'azote inorganiques rencontrées dans les sols forestiers. Afin d'apprécier le comportement de la GS face à ce facteur nutritionnel, la croissance du Douglas, et la GS, ont été étudiés en présence de ces deux formes d'azote inorganique. Ainsi, la GS du Douglas est légèrement affectée par la source d'azote présente lors de ses stades jeunes de croissance. Un effet possible de l'azote a été mis en évidence chez le Pois, et chez la Moutarde où une faible stimulation de l'activité GS par le nitrate a été observée (Tableau 4.2). Mais à des stades de croissances similaires chez le Pin, aucune influence de l'ammonium ou du nitrate n'a été mise en évidence (Tableau 4.2). Cependant, la source d'azote a un effet tant sur la croissance (Ingestadt, 1979) que sur l'activité de la glutamine synthétase des conifères (Margolis *et al.*,

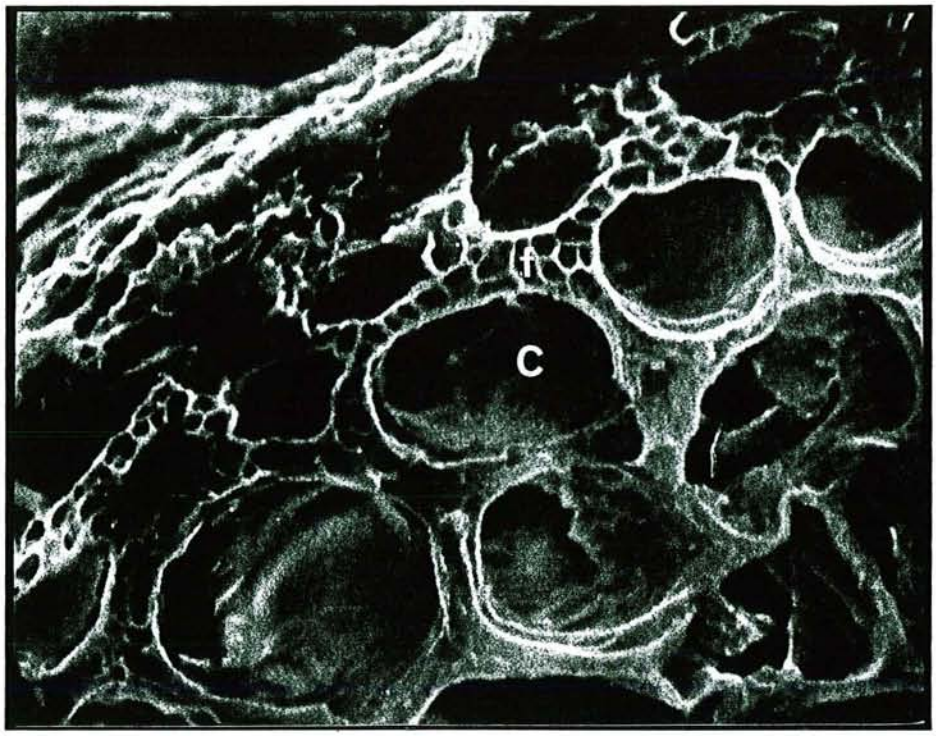


Figure 4.3 : Photographie d'une coupe de mycorhize de Douglas/*Laccaria bicolor* en microscopie électronique à balayage. Les cellules corticales (C) apparaissent entourées de cellules fongiques (f).

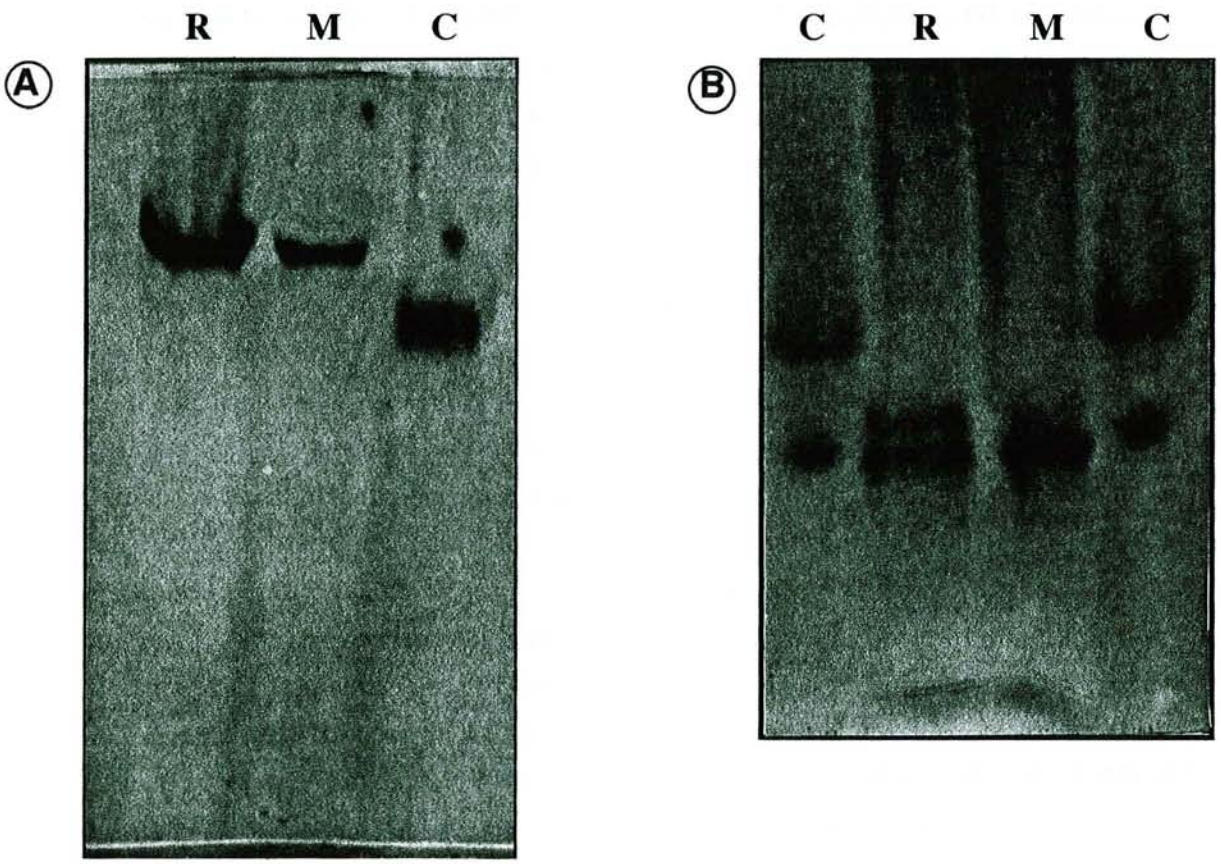


Figure 4.4 : Révélation des activités GDH à NAD (A) et AAT (B). Les extraits déposés dans les puits sont : R, racine de Douglas; M, mycorhizes de Douglas/*Lac. bicolor*; C, champignon en culture pure de *Lac. bicolor*.

1988). A des stades de croissance plus tardifs, la GS est effectivement plus ou moins sensible à la source d'azote présente dans le milieu extérieur. La présence d'ions ammonium stimule la croissance du Douglas et l'activité GS racinaire. Une telle préférence pour l'ammonium a déjà été décrite pour la croissance de nombreux arbres et conifères (Van den Driessche et Dangerfield, 1975; Ingestadt, 1979; Peterson *et al.*, 1988; Finlay *et al.*, 1989; Knoepp *et al.*, 1993); et l'activité GS racinaire du Pin était stimulée lors de la présence d'ammonium dans le milieu nutritif (Vézina *et al.*, 1988). La forme d'azote absorbé par la plante influence le pH de la rhizosphère. Le prélèvement de l'ammonium résulte en un efflux d'ions H+ des racines. Ceci entraine une plus grande acidification de la rhizosphère que lors du prélèvement de nitrate (Marschner, 1991). Les conifères sont donc, comme le Douglas, adaptés à ces sols acides où l'ammonium est la source d'azote inorganique la plus présente.

La mesure de l'activité de la glutamine synthétase a été effectuée sur les diverses parties du système racinaire: les racines latérales, l'apex et le reste du système racinaire. La partie terminale, ou apex, est une zone jeune qui apparaît particulièrement active par rapport au reste de la racine plus ou moins brune, plus âgée, qui a subit la lignification de ses parois. La répartition de l'activité au sein du système racinaire montre que c'est l'apex de la racine principale qui contient la plus forte activité GS ainsi qu'une activité spécifique (nkatal/mg de protéines) importante. Chez *Pisum sativum*, l'activité de la glutamine synthétase paraît se situer dans une région à 4-6 cm de l'apex (Vezina *et al.*, 1989). Par contre, chez les racines d'orge, la part d'activité GS la plus importante a été mise en évidence dans l'apex (Fentem *et al.*, 1983). Chez la betterave sucrière, 60 % de l'activité sont retrouvés dans les racines latérales et 40 % dans les racines de réserves (Mäck *et al.*, 1990). L'évolution de l'activité GS en fonction de l'âge des racines peut s'expliquer par le fait que les parties jeunes et actives sont plus nombreuses et que si l'activité diminue, c'est sans doute dû à la lignification de certaines parties du système racinaire qui deviennent plus importantes que les parties juvéniles riches en activité GS.

4.1.3. Influence de la mycorhization du Douglas par *Laccaria bicolor* sur le métabolisme azoté.

Les études poursuivies jusqu'à présent ont montré que le métabolisme azoté des mycorhizes était modifié par rapport à celui des partenaires pris séparément. Ce changement de métabolisme nécessite des modifications dans l'activité et la synthèse des principales enzymes impliquées dans l'assimilation de l'ammonium [glutamate déshydrogénase (GDH), glutamine synthétase (GS) et aspartate aminotransférase (AAT)].

Ainsi, dans le cas des ectomycorhizes de Douglas/*Lac. bicolor* S238N (Figure 4.3), l'AAT fongique semble réprimé, de même que la GDH à NAD (Figure 4.4 A et B). Mes travaux de

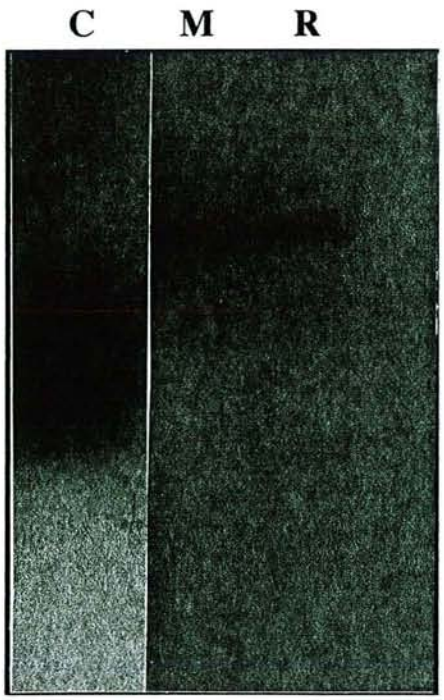


Figure 4.5 : Révélation de l'activité GS transférasique d'extraits racinaires de Douglas (R), de mycorhizes Douglas/*Lac. bicolor* (M) et de *Lac. bicolor* en culture pure (C).

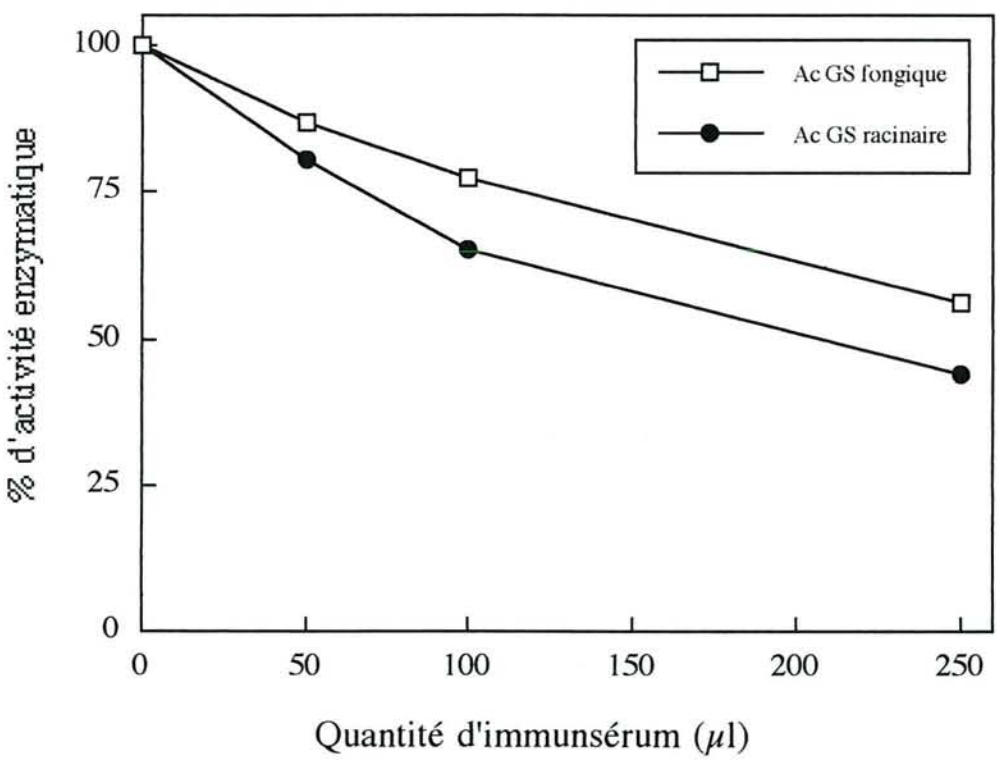


Figure 4.6 : Courbe d'immunoprécipitation de la GS racinaire en présence d'immunsérum anti-GS racinaire et de la GS fongique en présence d'immunsérum anti-GS fongique dans des ectomycorhizes de Douglas/*Lac. bicolor*.

recherche ont porté principalement sur la GS des racines de Douglas. Jusqu'à présent les études réalisées n'ont pas permis de discriminer la GS fongique de la GS racinaire dans les mycorhizes car nous ne disposions que des anticorps anti-GS fongique obtenus à partir de *Laccaria laccata* en culture pure (Brun *et al.*, 1992). C'est pourquoi la purification de l'enzyme a été poursuivie au cours de ce travail.

Au sein de ces mycorhizes, nous avons donc pu mettre en évidence la répression certaines enzymes fongiques du métabolisme azoté dans une telle association (Figure 4.4 A et B). L'étude de la GS a montré que seule l'activité de l'isoforme racinaire était révélée dans des tissus symbiotiques (Fig 4.5).

Cependant, la localisation de la GS fongique a montré la présence de cette protéine dans les cellules fongiques de la symbiose (Brun *et al.*, 1994).De plus, leur affinité respective pour l'ammonium n'apparaît pas comme un facteur potentiel. En effet, les deux partenaires présentent une coopérativité négative pour ce substrat avec des valeurs similaires (µM). Nous avons réaliser l'immunoprécipitation quantitative des GS issues de la plante et du champignon dans les ectomycorhizes de Douglas (Figure 4.6). On a donc pu, ainsi, déterminer la part relative des deux partenaires dans l'assimilation de l'ammonium au sein d'une telle association. On peut supposer au vu des résultats précédents (courbe d'immunoprécipitation) que la GS racinaire et la GS fongique sont complétement précipité en présence de 250 µl des immunsérums respectifs. De plus la réalisation de témoin à permis de montrer qu'il n'existe pas de reconnaissance non-spécifique des anticorps anti-GS fongique pour l'enzyme de la plante et vice-versa (résultat non montré). La proportion relative de la GS racinaire est de l'ordre de 56% et celle de la GS fongique d'environ 44%. La GS fongique n'apparaît donc pas sur les gels où nous révélions l'activité car la quantité de matériel fongique présente par mycorhize est probablement trop faible pour donner une quantité suffisante de GS pour atteindre le seuil de détection.

4.2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :

La glutamine synthétase, du fait de la synthèse de la glutamine, apparaît donc comme une enzyme très importante pour le métabolisme cellulaire. En effet, la glutamine est au centre du métabolisme azoté, elle constitue très souvent le premier produit organique formé. Elle forme avec d'autres acides aminés qui en dérivent, notamment l'asparagine, des formes de transport exportées des racines vers les parties aériennes où elle sera utilisée pour la synthèse protéique ou la synthèse d'autres acides aminés (Haynes, 1986). De plus, elle participe aux voies de biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des uréides et des cofacteurs d'oxydo-réduction (Fig.1.3). En définitif, c'est par elle que la majorité de l'azote minéral entre dans les composés organiques (Stadtman, 1973). Les résultats obtenus au cours de cette étude peuvent être résumés ainsi :

⇒ la purification de la glutamine synthétase racinaire du Douglas a permis l'obtention d'anticorps spécifiques de la GS de la plante

⇒ la caractérisation de cette enzyme a mis en évidence une affinité très élevée pour l'ammonium qui lui confère sans doute un rôle primordial dans l'assimlation de l'azote,

⇒ mais également de nombreux facteurs de régulation de la GS qui interviennent sans doute au niveau post-transcriptionnel et/ou transcriptionnel

⇒ la régulation de l'enzyme, et son évolution, au cours de la croissance du Douglas est influencée par la nature de la source azotée. L'azote du milieu extérieur régule probablement la GS racinaire au niveau post-transcriptionnel et/ou transcriptionnel.

⇒ l'expression de l'activité GS dans les ectomycorhizes de Douglas est dû à la fois à l'activité de l'enzyme fongique et racinaire. Cet exemple d'ectomycorhize (AAT et GDH fongique inhibées; les deux GS fonctionnelles) correspond au modèle d'ectomycorhize de l'Épicéa proposé par Chalot et Botton (1995).

Perspectives

Nous avons donc mis en évidence certains facteurs de régulation de l'enzyme, et notamment la source azotée. Il serait intéressant de poursuivre l'étude de l'effet de l'azote sur la GS et son évolution aux stades précoces de croissance. Le dosage des acides aminés dans les différentes parties de la graine et du végétal lors de sa croissance sur différentes sources d'azote devrait permettre de voir l'évolution des différents pools d'acides aminés et par là même l'influence de l'azote. Dans les graines en germination, il serait intéressant de suivre la néo-synthèse de la GS par l'utilisation de méthionine marquée et d'autoradiogrammes. L'isolation des ARNm et l'évolution de ceux qui codent pour la GS pourront être entreprises si les anticorps les reconnaissent. Il conviendrait égalemment de séquencer l'enzyme purifiée afin d'obtenir une sonde oligonucléotidique qui permettra aussi de localiser le gène. Cette sonde pourra permettre de suivre l'évolution du gène de la GS racinaire lors de la croissance du Douglas sur différentes sources d'azote. La perspective de pouvoir localiser le gène et d'obtenir un ADNc du (ou des) gène(s) codant pour la GS racinaire permettrait de comparer ce gène à d'autres ADN de GS d' Angiospermes ou de Gymnospermes. Bien que l'obtention de plantes transgéniques chez les conifères s'avère plus délicate, il n'en reste pas moins un outil d'avenir très intéressant pour l'étude du métabolisme azoté.

Grâce aux anticorps spécifiques (GS fongique et racinaire) il serait intéressant d'étudier la synthèse et la régulation de ces enzymes lors de la formation de la mycorhize. Pour cela, l'étude passera par la purification des ARNm de ces enzymes et leur traduction *in vitro*. L'emploi d'une sonde oligonucléotidique permettra de repérer les gènes correspondants et de voir l'évolution des deux GS et de leurs gènes lors de l'établissement de la mycorhization. Grâce à ces anticorps, il conviendrait de quantifier par test Élisa la part respective de la GS fongique et de la GS racinaire dans les ectomycorhizes de Douglas.

L'influence de la mycorhization sur les voies d'assimialtion de l'azote devraît être étudiée par le suivi de traceurs isotopiques tels que l'ammonium ^{15}N en présence de différents inhibiteurs d'enzymes (MSX, albizine, AOA) au sein de racines de Douglas non-mycorhizées et mycorhizées. Ces travaux nous permettraient par l'analyse des acides aminés et des acides organiques de déterminer les voies métaboliques d'utilisation de l'azote et du carbone au sein des tissus symbiotiques. Nous pourrions ainsi comparer l'assimilation du carbone et de l'azote chez le partenaire végétal seul et lors de son association avec un partenaire fongique.

Bibliographie

A

ABOU-ZEID AM, JEREBZOFF S and JEREBZOFF-QUINTIN S (1991). Alanine aminotransferase in *Leptospaeria michotii*. Isolation, properties and cyclic variations of its activity in relation to polypeptide level. Physiol. Plant. **82**: 401-408.

AHMAD I, LARHER F, MANN AF, McNALLY SF and STEWART GR (1982). New Phytol. **91**: 585-595.

ALLEN S, RAVEN JA and SPRENT JI (1988). The role of long-distance transport in intracellular pH regulation in Phaseolus vulgaris grown with ammonium or nitrate as nitrogen source, or nodulated. J. Exp Bot. **39**: **513-??.**

ANDERSON MP, VANCE CP, HEICHEL G and MILLER S (1989). Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from Alfalfa root nodules. Plant Physiol. **90**: 351-358.

APP A, SANTIAGO T, DAEZ C, MENGUITO C, VENTURA W, TIROL A, PO J, WATANABE I, DE DATTA SK and ROGER P (1984). Estimation of the nitrogen balance for irrigated rice and the distribution of phototropic nitrogen fixation. Field Crops Res. **9**: 17-27.

APPENROTH KL, MOOTZ M and AUGSTEN H (1986). Effect of light quality on the alanine and aspartate aminotransferases in Wolfia arrhiza L. Dans "Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants" (Ed par LAMBERS J, NEETSON JJ and STULEN I). Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht, Boston, Lancaster, pp 215-218.

ARTUS NN (1988). Mutants of Arabidopsis thaliana that either require or are sensitive to high atmospheric CO_2 concentrations. Thèse de l'Université du Michigan (USA).

ASLAM M, TRAVIS RL AND HUFFAKER RC (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.

AVILA C, BOTELLA JR, CÁNOVAS FM, NÚÑEZ de CASTRO I and VALPUESTA V (1987). Different characteristics of the two glutamate synthases in the green leaves of *Lycopersicon esculentum*. Plant Physiol. **85**: 1036-1039.

AVILA C, MÁRQUEZ AJ, PAJUELO P, CANNELL ME, WALLSGROVE RM and FORDE BG (1993). Cloning and sequence analysis of a cDNA for barley ferredoxin-dependent glutamate synthase and molecular analysis of photorespiratory mutants deficient in the enzyme. Planta **189**: 475-483.

AYLING SM (1993). The effect of ammonium ions on menbrane potential and anion influx of barley and tomato. Plant Cell Env. **16**: 297-303.

B

BAIMA S, HAEGI A, STRØMAN P and CASADORO G (1989). Characterization of a cDNA clone for barley leaf glutamine synthetase. Carlsberg Res. Commun. **54**: 1-9.

BECKER TW, PERROT-RECHENMANN C, SUZUKI A and HIREL B (1993). Subcellular and immunocytochemical localization of the enzymes involved in ammonia assimilation in mesophyll and bundle-sheath cells of Maize leaves. Planta **191**: 129-136.

BEDELL J-P, CHALOT M, BRUN A and BOTTON B (1995). Purification and properties of glutamine synthetase from Douglas fir roots. Physiol. Plant. 94: 597-604.

BEDELL J-P, GARNIER A, PIREAUX J-C, CHALOT M, BRUN A and BOTTON B (1994). Étude de quelques enzymes impliquées dans le métabolisme azoté de l'association ectomycorhizienne Douglas/*Laccaria laccata*. Acta Bot. Gal. **141**: 483-490.

BEEVERS L and HAGEMAN RH (1980). In "The Biochemistry of Plants" (ed MIFLIN BJ) vol **5**, Academic Press, New York, pp 115-168.

BEEVERS L and STOREY R (1976). Glutamate synthase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. Plant Physiol. **57**: 862-866.

BENNETT MJ and CULLIMORE JV (1989). Glutamine synthetase isoenzymes of Phaseolus vulgaris L.: subunit composition in developing root nodules and plumules. Planta **179**: 433-440.

BENNETT MJ, LIGHTFOOT DA and CULLIMORE JV (1989). cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase γ–polypetides of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Mol. Biol. **12**: 553-565.

BERNHARD WR and MATILE P (1994). Differential expression of glutamine synthetase genes during the senescence of *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. Plant Sci. **98**: 7-14.

BIEKMANN S and FEIERABEND J (1982). Subcellular distribution, mutiple forms and development of glutamate-pyruvate (glyoxylate) aminotransferase in plant tissues. Biochem. Biophys. Acta **721**: 268-279.

BIGG WL and DANIEL TW (1978). Effects of nitrate, ammonium and pH on the growth of conifer seedlings and their production of nitrate reductase. Plant Soil **50**: 371-385.

BLACKWELL RD, MURRAY AJS and LEA PJ (1987). The isolation and characterization of photorespiratory mutants of barley and pea. Prog. Photosynth. Res. **3**: 625-628.

BLACKWELL RD, MURRAY AJS and LEA PJ (1988a). Sucrose synthesis and N metabolism in a photorespiratory mutant of barley deficient in both chloroplastic glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase. J. Exp. Bot. **39**: 845-858.

BLACKWELL RD, MURRAY AJS, LEA PJ, KENDALL AC, HALL NP, TURNER JC and WALLSGROVE RM (1988b). The value of mutants unable to carry out photorespiration. Photosynth. Res. **16**: 155-176.

BOLLAND MJ and BENNY AG (1977). Enzymes of nitrogen metabolism in legumes nodules. Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. Eur. J. Biochem. **79**: 355-362.

BOLLARD EG (1957). Translocation of organic nitrogen in the xylem. Aust J Biol Sci **10**: 292-301.

BOTELLA JR, VERBELEN JP and VALPUESTA V (1988). Immunocytolocalization of ferredoxin-GOGAT in the cells of green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentum*. Plant Physiol. **87**: 255-257.

BOTHE H, YATES MG and CANNON FC (1983). Physiology, biochemistry and genetic dinitrogen fixation. Dans"Encyclopedia of plant physiology, New Series" (ed. par LÄUCHI A et BIELESKI RL), VOL. **15A**. Springer-Verlag, Berlin, pp. 241-285.

BOTTON B and MSATEF Y (1983). Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Sphaerostilbe repens*. Physiol. Plant. **59**: 438-444.

BOTTON B and CHALOT M (1991). Techniques for the study of nitrogen metabolism in mycorrhiza. Methods in Microbio. **23**: 203-252.

BOTTON B and CHALOT M (1995). Nitrogen assimilation: Enzymology in ectomycorrhizas. Dans"Mycorrhiza" (ed. par VARMA AH and HOCK B). Heidelberg Springer-Verlag, Berlin, pp. 325-363.

BOTTON B, DELL B (1994). Expression of glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in eucalypt ectomycorrhizas. New Phytol. **126**: 249-257.

BOTTON B, CHCHALOT M, GARNIER A and MARTIN F (1994). L'assimilation de l'azote minéral chez les ectomycorhizes. Acta Bot. Gal. **141**: 469-481.

BOTTON B, EL BADAOUI K and MARTIN F (1986). Induction of extracellular proteases in the ascomycete *Cenococcum geophilum*. Dans "Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proceeding in the 1st European symbiosis of mycorhizae" (ed. par GIANINAZZI-PEARSON V, GIANINAZZI S). INRA, Paris, pp. 403-406.

BOWSHER CG, LONG DM, OAKS A and ROTHSTEIN SJ (1991). Effect of light/dark cycles on expression of nitrate assimilatory genes in maize shoots and roots. Plant Physiol. **95**: 281-285.

BOWSHER CG, BOULTON EL, ROSE J, NAYAGAM S and EMES MJ (1992). Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative penthose phosphate pathway in non photosynthetic root plastids. Plant J **2**: 893-898.

BRUN A (1992). Contribution à l'étude de la glutamine synthétase et de la glutamate déshydrogénase à NADP chez le champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata*. Purification, propriétés physico-chimiques et localisation dans les ectomycorhizes de Douglas. thèse d'État, Université de NAncy I.

BRUN A, CHALOT M, BOTTON B and MARTIN F (1992). Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from ectomycorhizal fungus *Laccaria laccata*. Plant Physiol. **99**: 938-944.

BRUN A, CHALOT M, DUPONNOIS R and BOTTON B (1994). Immunogold localization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase of *Laccaria laccata* in Douglas fir ectomycorrhizas. Mycorrhiza **5**: 139-144.

BRUNNER I and SCHEIDEGGER C (1994). Effects of high nitrogen concentrations on ectomycorrhizal structure and growth of seedlings of *Picea abies* (L.) Karst. New Phytol. **129**: 83-95.

BRYAN JK (1990). Advances in the biochemistry of amino acid biosynthesis. Dans"The biochemistry of plants" (ed par MIFLIN BJ, LEA PJ) Vol 16, Academic Press, New York, pp 161-195.

C

CALLACI JJ and SMARRELLI J Jr (1991). Regulation of the inductible nitrate reductase isoform from soybeans. Biochim Biophys Acta **1088**: 127-130.

CAMMAERTS D and JACOBS M (1985). A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. Planta **163**: 517-526.

CAMMAERTS D and JACOBS M (1983). A study of the polymorphism and the genetic control of glutamate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. Lett. **31**: 65-73.

CAMPBELL WH and REMMLER JL (1986). Plant Physiol. 80: 435-441.

CAMPBELL WH and SMARRELLI JJr (1986). Nitrate reductase biochemistry and regulation. Dans "Biochemical basis of plant breeding"(ed. par NEYRA C). Vol. **2**. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-39.

CÁNOVAS FM, CANTÓN FR, GALLARDO F, GARCÍA-GUTTIÉRREZ A and De VICENTE A (1991). Accumulation of glutamine synthetase during early development of maritime pine (Pinus pinaster) seedlings. Planta **185**: 372-378.

CANTÓN FR, GARCÍA-GUTTIÉRREZ A , GALLARDO F, De VICENTE A and CÁNOVAS FM (1993). Molecular characterization of a cDNA clone encoding glutamine synthetase from a gymnosperm, *Pinus sylvestris*. Plant Mol. Biol. **22**: 819-828.

CAUSIN HF and BARNEIX AJ (1994). The effect of glutamine and asparagine on net NH_4^+ uptake in young wheat plants. Plant and Soil **161**: 257-265.

CHALOT M, BATTUT PM, BOTTON B, LE TACON F and GARBAYE J (1988). Recent advances in physiological and pratical aspects of ectomycorrhizal effects on tree development. Acta Oecol. **9**: 33-351.

CHALOT M, BRUN A and BOTTON B (1989). occurence and distribution of the fungal NADP-dependent glutamate dehydrogenase in spruce and beech ectomycorrhizas. Dans"Fast growing trees and nitrogen fixing trees" (ed. par WERNER D and MÜLLER P). Gustav fisher, New York, pp. 324-327.

CHALOT M, BRUN A, KHALID A, DELL B, ROHR R and BOTTON B (1990). Occurence and distribution of aspartate aminotransferase in spruce and beech ectomycorrhizas. Can. J. Bot. **68**: 1756-1762.

CHALOT M, STEWART GR, BRUN A, MARTIN F and BOTTON B (1991). Ammonium assimilation by spruce-*Hebeloma* sp. ectomycorrhizas. New Phytol. **119**: 541-550.

CHALOT M, BRUN A, FINLAY RD and SÖDERSTRÖM B (1994A). Metabolism of [^{14}C]glutamate and [^{14}C]glutamine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbio. **140**: 1641-1649.

CHALOT M, BRUN A, FINLAY RD and SÖDERSTRÖM B (1994B). Respiration of ^{14}C alanine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbio. Let. **121**: 87-92.

CHALOT M, BRUN A, BOTTON B and SÖDERSTRÖM B (1996). Kinetics,

energetics and specificity of a general amino acid transporter from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Microbiol. **142**: 1749-1756.

CHEN F-L and CULLIMORE JV (1989). Location of two isozymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Planta **179**: 441-447.

CHENG CL, DEWDNEY J, KLEINHOFS A and GOODMAN HM (1986). Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 6825-6828.

CLARKSON DT (1985). Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. Annu. Rev. Plant Physiol. **36**: 77-115.

CLARKSON DT and LÜTTGE U (1991). Mineral nutrition: Inducible and repressive nutrient transport systems. Prog. Bot. **52**: 61-83.

CLARKSON DT, SAKER LR and PURVES JV (1989). Depression of nitrate and ammonium transport in barley plants with diminished sulphate status: Evidence of co-regulation of sulphate and nitrogen intake. J. Exp. Bot. **218**: 953-963.

COOLEY RN and TOMSETT AB (1985). Biochim. Biophys. Acta **831**: 89-93.

CORUZZI GM (1991). Molecular approaches to the study of amino acid biosynthesis in plants. Plant Sci. **74**: 145-155.

CRAWFORD NM, CAMPBELL WH and DAVIS RW (1986). Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. Proc. Natl. acad. Sci. USA **83**: 8073-8076.

CRAWFORD NR, WILKINSON JQ and LABRIE ST (1992). Control of nitrate reductase in plants. Aust. J. Plant Physiol. **36**: 77-115.

CULLIMORE JV and SIMS AP (1981). Occurence of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardii*. Phytochem. **20**: 597-600.

D

DAILEY FA, WARNER RL, SOMERS DA and KLEINHOFS A (1982). Plant Physiol. **69**: 1200-1204.

DALE WJ (1994). Nitrogen cycling. Encycl. Agric. Sci. **3**: 97-104.

DALLING MJ, TOLBERT NE and HAGEMAN RH (1979a). Biochim. Biophys. Acta **283**: 505-512.

DALLING MJ, TOLBERT NE and HAGEMAN RH (1979b). Biochim. Biophys. Acta **283**: 513-519.

DAS R, SHARMA AK and SOPORY SK (1989). Regulation of NADH-glutamate dehydrogenase activity by phytochrome, calcium and calmodulin in *Zea mays*. Plant Cell Physiol. **30**: 317-323.

DAVIDSON EA, HART SC and FIRESTONE MK (1992). Internal cycling of nitrate in soils of a mature coniferous forest. Ecology **73**: 1148-1156.

DAVIES DD (1968). The metabolism of amino acids in plants. In"Recent aspects of nitrogen metabolism in plants" Ed par HEWITT EJ and CUTTING CV. Academic Press, London, pp 125-135.

DELL B, BOTTON B, MARTIN F and LE TACON F (1989). Glutamate dehydrogenase in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). New Phytol. **111**: 683-692.

DENG M, MOUREAUX T, LETDECKER MT and CABOCHE M (1990). Nitrate reductase expression is under the control of a circadian rhythm and its light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. Planta **180**: 257-261.

DENG M, MOUREAUX T, CHEREL I, BOUTIN J-P and CABOCHE M (1991). Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. Plant Physiol Biochem **29**: 239-247.

E

EDWARDS JW and CORUZZI GM (1989). Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. Plant Cell **1**: 241-248.

EDWARDS JW, WALKER EL and CORUZZI GM (1990). Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine

synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 3459-3463.

EHMKE A and HARTMANN T (1976). Properties of glutamate dehydrogenase from *Lemma minor*. Phytochem. **15**: 1611-1617.

EK H, ANDERSON S, ARNEBRANT K and SÖDERSTRÖM B (1994). Growth and assimilation of NH_4^+ and NO_3^- by *Paxillus involutus* in association with *Betula pendula* and *Picea abies* as affected by substrate pH. New Phytol. **128**: 629-637.

EL-BADAOUI K (1988). Contribution à l'étude des protéases d quelques champignons ectomycorhiziens. Thèse d'État, Université Nancy I.

EL-BADAOUI K and BOTTON B (1988). Production and characterization of exocellular proteases in ectomycorrhizal fungi. Ann. Sci. For. **46**: 706-710.

ELMLINGER and MOHR H (1991). Coaction of blue/ultraviolet-A light and light absorbed by phytochrome in controlling the appearance of ferredoxin-dependent glutamate synthase in the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. Planta **183**: 374-380.

ELMLINGER and MOHR H (1992). Glutamine synthetase in Scots pine seedlings and its control by blue light and light absorbed by phytochrome. Planta **188**: 396-402.

ELMLINGER MW, BOLLE C, BATSCHAUER A, OELMÜLLER R and MOHR H (1994). Coaction of blue light and light absorbed by phytochrome in control of glutamine synthetase gene expression in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. Planta **192**: 189-194.

EMES MJ and FOWLER MW (1979). The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. Planta **194**: 249-253.

ETHERTHON B and RUBINSTEIN B (1977). Evidence for amino acid-H^+ cotransport in oat coleoptiles. Plant Physiol. 59: **117** (Resumé).

F

FARNHAM MW, MILLER SS, GRIFFITH SM and VANCE CP (1990). Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules. Plant Physiol. 93: 603-610.

FEDOROVA E, GREENWOOD JS and OAKS A (1994). *In situ* localization of nitrate reductase in maize roots. Planta. sous presse.

FERNANDES MS and ROSSIELLO ROP (1978). Effects of NH_4^+ and a nitrification inhibitor on soil pH and phosphorus uptake by corn (*Zea mays* L.). Cer. Res. Comm. **6**: p. 183.

FERNANDES MS and ROSSIELLO ROP (1995). Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. Crit Rev. Plant Sci.. **14**(2): 111-148.

FERNBACH E and MOHR H (1990). Coaction of blue/ultraviolet-A light and light absorbed by phytochrome in controlling growth of pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. Planta **180**: 212-216.

FIDO RJ and NOTTON BA (1984). Plant Sci. Lett. **37**: 87-91.

FINLAY RD, EK H, ODHAM G and SÖDERSTRÖM B (1988). Mycelium uptake, translocation and assimilation of nitrogen ^{15}N-labelled ammonium by *Pinus sylvestris* plants infected with four different ectomycorrhizal fungi. New Phytol. **110**: 59-66.

FINLAY RD, EK H, ODHAM G and SÖDERSTRÖM B (1989). Uptake, translocation and assimilation of nitrogen ^{15}N-labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of Fagus sylvatica infected with Paxillus involutus. New Phytol. **113**: 47-55.

FINLAY RD, FROSTEGARD A and SONNERFELDT A-M (1992). Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure cultures and in symbiosis with*Pinus contorta Dougl. ex Loud.* New Phytol. **120**: 105-115.

FRANCE RC and REID CPP (1983). Interactions of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizas. Can. J. Bot. **61**: 964-984.

FOX GG, RATCLIFFE RG, ROBINSON SA and STEWART GR (1995). Evidence for deamination by glutamate dhydrogenase in higher plants: commentary. Can. J. Bot. **73**: 1112-1115.

FUKUMORITA T and CHINO M (1992). Sugar, amino acid, and inorganic contents in rice phloem sap. Plant Cell Physiol. **23**: 273-283.

G

GALANGAU F, DANIEL-VEDELE F, MOUREAUX T, DORBE M-F, LEYDECKER M-T and CABOCHE M (1988). Plant Physiol. **88**: 383-388.

GALLARDO F, CANTÓN FR, GARCIA-GUTIÉRREZ A and CÁNOVAS FM (1995). Changes in photorespiratory enzymes and glutamate synthase in ripening tomatoes. Plant Physiol. Biochem. **31**: 189-196.

GALVÁN F, MÁRQUEZ AJ and VEGA JM (1984). Purification and molecular properties of ferredoxin-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardii*. Planta **162**(2): 180-187.

GAO F and WONG PP (1994). Genotypes of the common bean(*Phaseolus vulgaris* L.) lacking the nodule-enhanced isoform of glutamine synthetase. Plant Physiol. **106**: 1389-1394.

GARCIA-GUTIÉRREZ A, CANTÓN FR, GALLARDO F, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F and CÁNOVAS FM (1995). Expression of ferredoxin-dependent glutamate synthase in dark-grown pine seedlings. Plant Mol. Biol. **27**: 115-128.

GEBHARDT C, OLIVER JE, FORDE BG, SAARELAINEN R and MIFLIN BJ (1986). Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*. EMBO J. **5**: 1429-1435.

GEWITZ H-S, PIEFKE J and VENNESLAND B (1981). J. Biol. Chem. **256**: 11527-11531.

GIRI L and RAMADOSS CS (1979). J. Biol. Chem. **254**: 11703-11712.

GIVAN CV, JOY KW and KLECZKOWSKI LA (1988). A decade of phtorespiratory nitrogen cycling. TIBS **13**: 433-437.

GlASS ADM, SCHAFF JE and KOCHIAN LV (1992). Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. Plant Physiol. **99**: 456-463.

GOWRI G and CAMPBELL WH (1989). cDNA clones for corn leaf NADH: Nitrate reductase and chloroplast NAD(P): glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Plant Physiol **90**: 792-798.

GRANSTEDT RC and HUFFAKER RC (1982). Identification of the leaf vacuole as a major nitrate storage pool. Plant Physiol. **70**: 410-413.

GREGERSON RG, MILLER SS, TWARY SN, GANT JS and VANCE CP (1993). Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. Plant Cell **5**: 215-226.

GROAT RG and SCHRADER LE (1982). Plant Physiol. **70**: 1759-1761.

GUERRERO MG, VEGA JM and LOSADA M (1981). The assimilatory reducing system and its regulation. Annu Rev Plant Physiol **32**: 169-204.

H

HARKER AR, NARAYANAN KR, WARNER RL and KLEINHOFS A (1986). NAD(P)H-bispecific nitrate reductase in barley leaves: Partial purification and characterization. Phytochem **25**: 1275-1279.

HARLEY JL (1991). Introduction: the state of the art. Methods in Microbio. **23**: 1-23.

HARLEY JL and SMITH SE (1983). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London.

HARPER JE and GIBSON AH (1984). Differential nodulation tolerance to nitrate among legume species. Crop. Sci. **24**: 797-801.

HART SC and FIRESTONE MK (1989). Evaluation of three *in situ* soil nitrogen availability assays. Can. J. For. Res. **19**: 185-191.

HAUGH I, PRITSCH K and OBERWINKLER F (1992). Der einfluss von düngung auf feinwurzeln und mykorrhizen im kulturversuch und im freiland. Forschungs. Kernforsschungs. Karlsruhe KfK-PEF **97**: 1-159.

HAYAKAWA T, YAMAYA T, KAMACHI K and OJIMA K (1992). Purification, characterization, and immunological properties of NADH-dependent glutamate

synthase from rice cell cultures. Plant Physiol. **98**: 1317-1322.

HAYAKAWA T, YAMAYA T, MAE T and OJIMA K(1993). Changes in the content of two glutalate synthase proteins in spikelets of rice (*Oryza sativa*) plants during ripening.Plant Physiol. **101**: 1257-1262.

HAYAKAWA T, NAKAMURA T, HATTORI F, MAE T, OJIMA K and YAMAYA T (1994). Cellular localization of NADH-dependent glutamate-synthase protein in vascular bundles of unexpanded leaf blades and young grains of rice plants. Plant Physiol. **193**: 455-460.

HAYASHI H and CHINO M (1990). Chemical composition of phloem sap from the uppermost internode of the rice plants. Plant Cell Physiol. **31**: 247-251.

HECHT U, OELMULLER R, SCHMIDT S and MOHR H (1988). Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin-dependent glutamate synthase in the cotyledons of mustard seedlings. Planta **175**: 130-138.

HEDLEY CL and STODDART JL (1972). Patterns of protein biosynthesis in *Lolium temulentum* (L.): 1. Changes occuring during leaf development. J. Exp. Bot. **23**: 490-501.

HENRIKSEN GH, RAMAN DR, WALKER LP and SPANSWICK RM (1992). Measurement of net fluxes of ammonium and nitrate at the surface of barley roots using ion-selective microelectrodes. II. Patterns of uptake along the root axis and evaluation of the microelectrode flux estimation. Plant Physiol. **99**: 734-737.

HIREL B and GADAL P (1980). Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. Plant Physiol. **66**: 619-623.

HIREL B, BOUET C, KING B, LAYZELL D, JACOBS F and VERMA DPS (1987). Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. EMBO J. **6**: 1167-1171.

HIREL B, MARSOLIER MC, HOARAU J, HOARAU J, BRANGEON J, SCHAFER R and VERMA DPS (1992). Forcing expression of a soybean root glutamine synthetase gene in tobacco leaves induces a native gene encoding cytosolic enzyme. Plant Mol. Biol. **20**: 207-218.

HOFF T, STUMMANN BM and HENNINGSEN KW (1992). Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. Physiol Plant **84**: 616-624.

HORNER RD (1983). Biochim. Biophys. Acta **744**: 7-15.

HOWARD WD and SOLOMONSON LP (1981). J Biol Chem **256**: 12725-12730.

HOWARD WD and SOLOMONSON LP (1982). Quaternary structure of assimilatory NADH nitrate reductase from *Chlorella*. J Biol Chem **257**: 10243-10250.

HUDSON RC and DANIEL RM (1993). L-glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. Comp. Biochem. Physiol. **106B**: 767-792.

HUTCHISON LJ and PICHÉ Y (1995). Effects of exogenous glucose on mycorrhizal colonization in vitro by early-stage and last-stage ectomycorrhizal fungi. Can. J. Bot. 73: 898-904.

I

INGESTAD T. (1979). Mineral nutrient requirements of Pinus silvestris and Picea abies seedlings. Physiol. Plant. **45**: 373-380.

INGESTAD T (1980). Growth, nutrition, and nitrogen fixation in grey alder at varied rate of nitrogen addition. Physiol. Plant. **50**: 353-364.

INGESTAD T, AVERTY AS and KÄHR M (1986). The influence of ectomycorhiza on nitrogen nutrition and growth of *Pinus sylvestris* seedlings. Physiol. Plant. **68**: 575-582.

IP S, KERR J and WRAY JL (1987). Abstr Int Symp Nitrate Assimilation-Mol Genet Aspects, 2nd, St Andrews, U.K. B21.

ITAGAKI T, DRY IB and WISKICH JT (1990). Effects of calcium on NAD(H)-glutamate dehydrogenase from turnip (*Brassica rapa* L.) mitochondria. Plant Cell Physiol. **31**: 993-997.

J

JACKSON WA and VOLK RJ (1992). Nitrate and ammonium uptake by maize: adaptation during relief from nitrogen suppression. New Phytol. **122**: 439-446.

JAIN JC and SHARGOOL PD (1987). Plant physiol. **130**: 137-146.

JOHNSEN KH, BONGARTEN BC and BORING LR (1991). Effects of nitrate on in vivo nitrate reductase activity of seedlings from three open-pollinated families of *Robinia pseudoacacia*. tree Physiol. **8**: 381-388.

JOY KW (1973). Control of glutamate dehydrogenase from *Pisum sativum* roots. Phytochem. **12**: 1031-1040.

K

KAISER WM, SPILL D and GLAAB J (1993). Rapid modulation of nitrate reductase in leaves and roots: Indirect evidence for the involvement of protein phosphorylation/dephosphorylation. Physiol. Plant. **89**: 557-562.

KAISER WM and HUBER S (1994a). Modulation of nitrate reductase in vivo and in vitro: Effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors, free Mg^{2+} and 5'-AMP. Planta **193**: 358-364.

KAISER WM and HUBER S (1994b). Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants.. Plant Physiol. **106**: 817-821.

KAMACHI K, AMEMIYA Y, OGURA N and NAKAGAWA H (1987). Immunogold localization of nitrate reductase in spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. Plant Cell Physiol. **28**: 333-338.

KAMMINGA-VAN WIJK C and PRINS HBA (1993). The kinetics of NH_4^+ and NO_3^- uptake by Douglas fir from singleN-solutions and from solutions containing both NH_4^+ and NO_3^-. Plant Soil **151**: 91-96.

KENDALL AC, WALLSGROVE RM, HALL NP, TURNER JC and LEA PJ (1986). Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. Planta **168**: 316-323.

KINDT R, PAHLICH E and RASCHED I (1980). Glutamate dehydrogenase from peas: isolation, quaternary structure and influence of of cations on activity. Eur. J. Biochem. **112**: 533-540.

KING BJ, SIDDIQI MY, RUTH TJ, WARNER RL and GLASS ADM (1993). Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. Plant Physiol **102**: 1279-1286.

KLEINHOFS A and WARNER RL (1990). Advances in nitrate assimilation. In "The Biochemistry of plants" (ed par MIFLIN BJ) Vol **16**, Academic Press, New York, pp 89-120.

KLOBUS G, WARD MR and HUFFAKER RC (1988). Characteristics of injury and recovery of net NO_3^- transport of barley seedlings from treatements of NaCl. Plant Physiol. **87**: 878-882.

KNIGHT TJ and LANGSTON-UNKEFER PJ (1988). Adenine nucleotides as allosteric effectors of pea seed glutamine synthetase. J. Biol. Chem. **263**: 11084-11089.

KRONZUCKER HJ, SIDDIQI MY and GLASS ADM (1995). Compartimentation and flux characteristics of nitrate in spruce. Planta **196**: 674-682.

KRONZUCKER HJ, SIDDIQI MY and GLASS ADM (1995). Compartimentation and flux characteristics of ammonium in spruce. Planta **196**: 691-698.

KROPF DL, KALDWELL JH, GOW NAR and HAROLD FM (1984). Transcellular ion currents in the water mold *Achlya*: Amino acid proton symport as a mechanism of current entry. J. Cell Biol. **99**: 486-496.

KUBIK-DOBOSZ G (1989). The activity of NADH-, NADPH- and Fd-dependent glutamate synthase in the plastids and cytosol of *Pisum arvense* L. root cells. Acta Soc. Bot. Pol. **58**(2): 253-261.

KUO T, SOMERS DA, KLEINHOFS A and WARNER RL (1982). NADH-nitrate reductase in barley leaves. Identification and amino acid composition of subunit protein. Biochim Biophys Acta **708**: 75-81.

L

LAEMMLI UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.

LAHNERS K, KRAMER V, BACK E, PRIVALLE L and ROTHSTEIN S (1988). Plant Physiol **88**: 741-746.

LAM HM, COSCHIGANO K, SCHULTZ C, MELO-OLIVEIRA R, TJADEN G, OLIVEIRA I, NGAI N, HSIEH MH and CORUZZI G (1995). Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. The Plant Cell **7**: 887-898.

LANCASTER JR, VEGA JM, KAMIN H, ORME-JOHNSON NR, ORME-JOHNSON WH, KREUGER RJ and SIEGEL LM (1979). J Biol Chem **254**: 1268-1272.

LARSSON C-M and INGERMARSSON B (1989). Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants. Dans"Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation" (Ed. par WRAY J and KINGHORN J). Oxford Science Publication, Oxford. pp. 3-14.

LAZOF DB, RUFFY TW and REDINBAUGH MG (1992). Localization of nitrate absorption and translocation within morphological regions of the corn root. Plant Physiol **100**: 1251-1258.

LEA PJ and RIDLEY SM (1989). Dans"Herbicides and Plant metabolism" (ed par DODGE AD). Cambridge Univ. Press, London, pp. 137-167.

LEA PJ, ROBINSON SA and STEWART GR (1990). The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagine. Dans : The Biochemistry of Plants (ed par MIFLIN BJ, LEA PJ) Vol 16, Academic Press, New York, pp 121-159.

LEA PJ, BLACKWELL RD and JOY KW (1992). Ammonia assimilation in higher plants. Dans : Nitrogen Metabolism of Plants (ed par MENGEL K, PILBEAM PJ), Clarendon Press, Oxford, pp 153-156.

LEE RB (1980). Sources of reductant for nitrate assimilation in non-photosynthetic tissue: a review. Plant Cell Environ. **3**: 65-90.

LEON E, De La HABA P and MALDONADO JM (1990). Changes in the levels of enzymes involved in ammonia assimilation during the development of *Phaseolus vulgaris* seedlings. Effects of exogenous ammonia. Physiol. Plant. **80**: 20-26.

LE TACON F (1985). Les mycorhizes: une coopération entre plantes et champignons. La Recherche **166**: 624-632

LE TACON F, GARBAYE J, BOUCHARD D, CHEVALIER G, OLIVIER JM, GIMBERTEAU J, POITOU N and FROCHOT H (1988). Fields results from mycorrhizal inoculation in France. Dans"Canadian workshop on mycorrhizae in forestery" (ed. par LALONDE M and PICHÉ M). University of Laval, pp. 51-74.

LE TACON F, ALVAREZ IF, BOUCHARD D, HENRION B, JACKSON RM, LUFF S, PARLADE JI, PERA J, STENSTRÖM E, VILLENEUVE N and WALKER C (19992). Variation in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. Dans"Mycorrhizas in ecosystems" (ed. par READ *et al.*). Wallingford C.A.B. international, pp. 119-134.

LI MG,VILLEMUR R, HUSSEY PJ, SILFLOW CD, GANTT JS and SNUSTAD DP. (1993). Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. Plant Mol. Biol. **23**: 401-407.

LI X-Z and OAKS A (1993). Induction and turnover of maize nitrate reductase. Influence of NO_3^-. Plant Physiol **102**: 1251-1257.

LI X-Z, LARSON DE, GLIBETIK M and OAKS A (1995). Effects of glutamine on the induction of nitrate reductase. Physiol Plant **93**: 740-744.

LILLO C (1984). Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. Physiol. Plant. **61**: 214-218.

LIN Z, MIAO GH and VERMA DPS (1995). A cDNA sequence encoding glutamine synthetase is preferentially expressed in nodules of *Vigna aconitifolia*. plant Physiol. **107**: 279-280.

LONG DM and OAKS A (1990). Stabilization of nitrate reductase in maize roots by chimostatin. plant Physiol **93**: 846-850.

LOULAKAKIS KA and ROUBELAKIS-ANGELAKIS KA (1996). The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and

catabolic activities. Physiol. Plant. **96**: 29-35.

LOULAKAKIS KA and ROUBELAKIS-ANGELAKIS KA (1990). Intracellular localization and properties of NADH-glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L.: purification and characterization of the makor leaf isoenzyme. J. Exp. Bot. **41**: 1223-1230.

LOULAKAKIS KA, ROUBELAKIS-ANGELAKIS KA and KANELLIS AK (1994). Regulation of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in avocado fruit during development and ripening. Plant Physiol. **106**: 217-22.

LOYOLA-VARGAS VM and De JIMENEZ ES (1984). Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. Plant Physiol. **76**: 536-540.

M

MAGALHÄES AMT, NELSON DW and CHALK PM (1987). Nitrogen transformations during hydrolysis and nitrification of urea. I. Effect of soils properties and fertilizer placement. Fer. Res. 11: p. 161.

MARSOLIER MC, DEBROSSE G and HIREL B. (1995). Identification of several soybean cytosolic glutamine synthetase transcript highly or specifically expressed in nodules: expression studies using one of the corresponding genes in transgenic *Lotus corniculatus*. Plant Mol. Biol. **27**: 1-15.

MARTIN F, CHEMARDIN M and GADAL P (1981). Nitrate assimilation and nitrogen circulation in Austrian pine. Physiol Plant **53**: 105-110.

MARTIN F, STEWART GR, GENETET I and LE TACON F (1986). Assimilation of 15NH4+ by beech (*Fagus sylvatica* L.) ectomycorrhizas. New Phytol. **102**: 85-94.

MARTIN F, RAMSTEDT M and SÖDERHÄLL K (1987). Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. Biochimie **69**: 569-581.

MARTIN F, CHALOT M, BRUN A, LORILLOU S, BOTTON B and DELL B (1992) Spacial distri-bution of nitrogen assimilation pathways in ectomycorrhizas. Dans: "Actes du 3ème Congrès Européen sur les Mycorhizes",CABS International, Wallingford, pp. 311-315.

MARTIN F and BOTTON B (1993). Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. Adv.Plant Path. **9**: 83-102.

MARTIN F and PLASSARD C (1996). Assimilation de l'azote par les symbioses ectomycorhiziennes. ???

MARTINOIA E, HECK U and WIENECKEN A (1981). Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. Nature **289**: 292-294.

MATOH T, SUZUKI F and IDA S (1979A). Corn leaf glutamate synthase: purification and properties of the enzyme. Plant Cell Physiol. **20**: 1329-1340.

MATOH T, IDA S and TAKAHASHI E (1980). Isolation and characterization of NADH-glutamate synthase from pea (*Pisum sativum* L.). Plant Cell Physiol. **21**: 1461-1474.

MATOH T, TAKAHASHI E and IDA S (1979b). Glutamate synthase in developing pea cotyledons: occurence of NADH-dependant and ferredoxin-dependent enzymes. Plant Cell Physiol. **20**: 1455-1459.

MATOH T and TAKAHASHI E (1982). Changes in the activity of ferredoxin- and NADH-glutamate synthase during seedling development of peas. Planta **154**(4): 289-294.

MÁRQUEZ AJ, AVILLA C, FORDE BG and WALLSGROVE RM (1988). Ferredoxin-glutamate synthase from barley leaves: Rapid purification and partial characterization. Plant Physiol. Biochem. **26**: 645-651.

MARX DH, HATCH AB and MENDICINO JF (1977). High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of lobolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. Can. J. Bot. **55**: 1569-1574.

McGRATH R and CORUZZI GM (1991). A gene network controlling glutamine and asparagine biosynthesis in plants. Plant J. 1(3): 275-280.

McNALLY SF, HIREL B, GADAL P, MANN AF and STEWART GR. (1983). Glutamine

synthetase of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. Plant Physiol. **72**: 22-25.

McNALLY SF and HIREL B. (1983). Glutamine synthetase isoforms in higher plants. Physiol. Vég. **21**(4): 761-774.

MELZER JM, KLEINHOFS A and WARNER RL (1989). Nitrate reductase regualtion: Effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. Mol Gen Genet **217**: 341-346.

METT V, METT VL and REYNOLDS PH (1994). The aspartate aminotransferase-P_2 gene from *Lupinus angustifolius*. Plant Physiol. **106**: 1683-1684.

MEYER FH (1985). Einfluss des stickstoff-factors auf den mykorrhizabesatz von fichtensämlingen im humus einer waldschadensfläche. Allgemeim. Fortstz. **40**: 208-219.

MINAGAWA N and YOSHIMOTO A (1982). J. Biochem. **91**: 761-774.

MORGAN MA and JACKSON WA (1988). Inward and outward movement of ammonium in root systems: Transient responses during recovery from nitrogen deprivation in presence of ammonium. J. Exp. Bot. **199**: 179-191.

MORGAN MA and JACKSON WA (1989). Reciprocal ammonium transport into and out of plant roots: Modifications by plant nitrogen status and elevated root ammonium concentration. J. Exp. Bot. **211**: 207-214.

MORRIS PF, LAYZELL DB and CANVIN DT (1988). Ammonia production and assimilation in glutamate synthase mutants of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. **87**: 148-154.

MORRIS PF, LAYZELL DB and CANVIN DT (1989). Plant Physiol. **89**: 498-500.

MOUREAUX T, LEYDECKER M-T and MEYER C (1989). Eur. J. Biochem. **179**: 617-620.

MUHITCH MJ, FELKER FC, TALIERCIO EW and CHOUREY PS (1995). Immunolocalization of a unique form of maize kernel glutamine synthetase using a monoclonal antibody. Plant Physiol. **107**: 757-763.

N

NAKAGAWA H, YONEMURA Y, YAMAMOTO H, SATO T, OGURA N and SATO R (1985). Plant Physiol. **77**: 124-128.

NALBANTOGLU B, HIRASAWA M, MOOMAW C, NGUYEN H, KNAFF DB and ALLEN R (1994). Cloning and sequencing of the gene encoding spinach ferredoxin-dependent glutamate synthase. Biochem. Biophys. Acta **1183**: 557-561.

NOGUCHI T and FUJIWARA S (1982). Development of glutamate glyoxylate aminotransferase in the cotyledons of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. Biochem. J. **201**: 209-214.

NOGUCHI T and HAYASHI S (1981). Plant leaf alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase: Peroxisomal localization and identity with glutamate: glyoxylate aminotransferase. Biochem. J. **195**: 235-239.

O

OAKS A (1983). Regualtion of nitrogen metabolism during early seedling growth. In "Mobilization of reserves in germination" (ed par NOZZLILLO C, LEA PJ and LOEWUS FA) Plenum Publishing Corp, New york, pp 53-75.

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

OAKS A and HIREL B (1985). Nitrogen metabolism in roots. Annu. Rev. Plant Physiol. **35**: 345-365.

OAKS A and LONG DM (1992). NO_3^- assimilation in root systems: with special refrence to *Zea mays*. in "Nitrogen Metabolism in Plants" (ed par MENGEL K and PILBEAN DJ), Oxford Scientific Publications, Clarendo Press, Oxford, pp 91-102.

OAKS A, STULEN I, JONES KE, WINSPEAR MJ, MISRA S and BOESEL IL (1980). Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. Planta **148**: 477-484.

OCHS G, SCHOCK G and WILD A (1993). Chloroplastic glutamine synthetase from *Brassica napus*. Plant Physiol. **103**: 303-304.

OCHS G, SCHOCK G and WILD A (1995). Purification and characterization of glutamine synthetase isoenzymes from leaves and roots of *Brassica napus* (L.). J. Plant Physiol. **147**: 1-8.

ÖHLEN E, INGEMARSSON B, CAMPBELL WH and LARSSON CM (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.

OLIVER G, GOSSET G, SANCHEZ-PESCADOR R, LOZOYA E, KU LM, FLORES N, BECERRIL B, VALLE F and BOLIVAR F (1987). Determination of the nucleotide sequence of the glutamate synthase structural genes of *Eschericia Coli* K-12. Gene 60: 1-11.

O'NEAL D and JOY KW (1973). Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization and pH optima. Arch. Biochem. Biophys. **159**: 113-122.

O'NEAL D and JOY KW (1974). Glutamine synthetase of pea leaves. Divalent cation effects, substrate specificity and other properties. Plant Physiol. **54**: 773-779.

OTTER T, PENTHER JM and MOHR H (1992). Control of the appearance of alanine aminotransferase in the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. Planta **188**: 376-383.

P

PAN S-S and NASON A (1978). Biochim. Biophys. Acta **523**: 297-313.

PATE JS (1973). Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. Soil Biol. Biochem. **1**: 109-119.

PATE JS (1980). Transport and partitioning of nitrogen solutes. Annu Rev Plant Physiol **31**: 313-340.

PATE JS, ATKINS CA, WHITE ST, RAINBIRD RM and WOO KC (1980). Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. Plant Physiol. **65**: 961-965.

PENTHER JM (1991). Analysis of alanine and aspartate aminotransferase isoforms in mustard seedlings (*Sinapis alba* L.) cotyledons. J. Chromatogr. **587**: 101-108.

PEREIRA S, PISSARA J, SUNKEL C and SALEMA R (1996). Tissue-specific distribution of glutamine synthetase in Potato tubers. Annals of Bot. **77**: 429-432.

PÉREZ-SOBA M and DE VISSER PHB (1994). Nitrogen metabolism of Douglas fir and Scots pine as affected by optimal nutrition and water supply under conditions of relatively high atmospheric nitrogen deposition. Trees **9**: 19-25.

PETERMAN TK and GOODMAN HM (1991). The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. Mol. Gen. Genet. **230**: 145-154.

PISTORIUS EK, GEWITZ HS, VOSS H and VENNESLAND B (1976). Reversible inactivation of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris in vivo*. Planta **128**: 73-80.

PIZELLE G, BENAMAR S, BOUTEKRABT F AND THIÉRY G (1989). Comparison of the nitrogenase and nitrate reductase activities in two nitrogen-fixing tree species: black alder (*Alnus glutinosa*) and black locust (*Robinia pseudoacacia*). Ann. Sc. Forest. **46**(sup.): 772-776.

PIZELLE G and THIÉRY G (1994). Relationship between nitrite and nitrate reductase activities in leaves of *Alnus glutinosa* and *Robinia pseudoacacia*. Plant Physiol Biochem **32** (6): 869-873.

POUTEAU S, CHÉREL I, VAUCHERET H and CABOCHE M (1989). Nitrate reductase mRNA regulation in *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutants. Plant Cell **1**: 1111-1120.

PRYOR AJ (1990). A maize glutamic dehydrogenase null mutants is cold temperature sensitive. Maydica **35**: 367-372.

PRYOR AJ (1979). Mapping of glutamic dehydrogenase (*Gdh*) on chromosome 1, 20.1 recombination units distal to *Adh* 1. Maize Genet. Coop. Newslett. **53**: 25-26.

Q

R

RAAB TK AND TERRY N (1995). Carbon, nitrogen and nutrient interactions in *Beta vulgaris* l. as influenced by nitrogen source, NO_3^- versus NH_4^+. Plant Physiol. **107**: 575-584.

RABBANI, CHALOT M, BOTTON B and MARTIN F (1992). Utilisation de l'alanine par les plantules d'Eucalyptus associées au champignon mycorhizien *Pisolithus tinctorius*. Bull. Acad. Soc. Lor. Sci. **31**: 131-139.

RADIN JW (1978). A physiological basis for the division of nitrate assimilation between roots and leaves. Plant Sci. Lett. **13**: 21-25.

RAJASEKHAR VK, GOWRI G and CAMPBELL WH (1988). Phytochrome mediated light regulation of nitrate reductase expression in squash cotyledons. Plant Physiol **88**: 242-244.

RASTOGI R, BACK E, SCHNEIDERBAUER A, BOWSHER CG, MOFFATT B and ROTHSTEIN SJ (1993). A 330 bp region of the spinach nitrite reductase gene promoter directs nitrate-inducible tissue-specific expression in transgenic tobacco. Plant J **4**: 317-326.

RAVEN JA and SMITH FA (1976). Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. New Phytol. **76**: 415-431.

REDINBAUGH MG and CAMPBELL WH (1981). Purification and characterization of NAD(P)H nitrate reductase from corn roots. Plant Physiol. **68**: 115-120.

REDINBAUGH MG and CAMPBELL WH (1993). Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the Maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. Evidence for an organ-specific response. Plant Physiol. **101**: 1249-1255.

REMMLER JL and CAMPBELL WH (1986). Plant Physiol. **80**: 442-447.

REYES JC and FLORENCIO FJ (1995). Electron transport controls transcription of the glutamine synthetase gene (*gln*A) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Mol. Biol. **27**: 789-799.

RHODES D, BRUNK DG and MAGALHAES JR (1989). Assimilation of ammonia by glutamate dehydrogenase? In "Plant nitrogen metabolism" (ed par POULTON JE, ROMEO JT and CONN EE) Plenum Press, New York, pp 191-226.

ROBINSON SA, STEWART GR and PHILLIPS R (1992). Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. Plant Physiol. **98**: 1190-1195.

ROBINSON SA, SLADE AP, FOX GG, PHILLIPS R, RATCLIFFE RG and STEWART GR (1991). The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. Plant Physiol. **95**: 509-516.

RUEHLE JL (1980). Ectomycorrhizal colonization of container-grown northem Red Oak as affected by fertility. U.S Dept. of Agriculture. Forest Servive Research Note SE-297.

RYGIEWICZ PT, BLEDSOE CS and ZASOSKI RJ (1984a). Effects of ectomycorrhizae and solution pH on [^{15}N]ammonium uptake by coniferous seedlings. Can. J. For. Res. **14**: 885-892.

RYGIEWICZ PT, BLEDSOE CS and ZASOSKI RJ (1984b). Effects of ectomycorrhizae and solution pH on [^{15}N]nitrate uptake by coniferous seedlings. Can. J. For. Res. **14**: 893-899.

S

SAKAKIBARA H, MATANABE M, HASE T and SUGIYAMA T (1991). Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase in Maize leaf. J. Biol. Chem. **266**: 2028-2035.

SAKAKIBARA H, KAWABATA S, HASE T and SUGIYAMA T (1992). Differential effects of nitrate and light on the expression of glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in Maize. Plant Cell Physiol. **33**(8): 1193-1198.

SANTOS I and SALEMA R (1992). Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchoe lateritia*. Engl. Plant Sci. **84**: 145-152.

SARJALA T., RAITIO H and TURKKI EM (1987). Nitrate metabolism in Scots pine

seedlings during their first growing season. Tree Physiol. **3**: 285-293.

SAUX C, LEMOINE Y, MARION-POLL A, VALADIER MH, DENG M and MOROT-GAUDNY JF (1987). Consequence of absence of nitrate reductase activity of photosynthesis in *Nicotiana plumbaginifolia* plants. Plant Physiol **84**: 67-72.

SCHEROMM P, PLASSARD C and SALSAC L (1990). Nitrate nutrition of maritime pine (*Pinus pinaster* Soland in Ait.) ectomycorrhizal with *Hebeloma cylindrosporum* romagn. New Phytol **114**: 93-98.

SCHMIDT B, STRACK D and WEIDNER M (1991). Nitrate reductase in needles, roots and trunk wood of spruce trees [Picea abies (L.) Karst.]. Trees **5**: 215-226.

SCHOBERT C and KOMOR E (1990). Transfer of amino acids and nitrate from roots into the xylem of *Ricinus communis* seedlings. Planta **181**: 85-90.

SCHOCK G, OCHS G and WILD A (1994). Glutamine synthetase from roots of *Brassica napus*. Plant Physiol. **105**: 757-758.

SECHLEY KA, YAMAYA T and OAKS A (1992). Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. Int. Rev. Cytol. **134**: 85-163.

SHEN TC, FUNKHOUSER EA and GUERRERO MG (1976). Plant Physiol. **58**: 292-294.

SHIRAISHI N, SATO T, OGURA N and NAKAGAWA H (1992). Control by glutamine of the synthesis of nitrate reductase in cultural spinach cells. Plant Cell Physiol **33**: 727-731.

SIDDIQI MY, GLASS ADM, RUTH TJ and RUFFY TW Jr (1990). Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of $^{15}NO_3^-$ influx. Plant Physiol **93**: 1426-1432.

SINGH P and SRIVASTAVA HS (1986). Physiol. Plant. **66**: 169-176.

SINGH RP and SRIVASTAVA HS (1983). Regulation of glutamate dehydrogenase activity by amino acids in maize seedlings. Physiol. plant. **57**: 549-554.

SINGH RP and SRIVASTAVA HS (1982). Glutamate dehydrogenase activity and assimilation of inorganic nitrogen in maize seedlings. Biochem. Physiol. Pflanz. **177**: 633-642.

SIVASANKAR S and OAKS A (1995). Regulation of nitrate reductase during early seedling growth. A role for asparagine and glutamine. Plant Physiol. **107**: 1225-1231.

SMALL IS and GRAY JC (1984). Eur J Biochem **145**: 291-297.

SMIRNOFF N, STEWART GR (1985). Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. Physiol Plant **64**: 133-140.

SOLOMONSON LP and McCREERY MJ (1986). J. Biol. Chem. **261**: 806-810.

SOLOMONSON LP, LORIMER GH, HALL RL, BORCHERS R and BAILEY JL (1975). J. Biol. Chem. **250**: 4120-4127.

SOMERS DA, KUO TM, KLEINHOFS A, WARNER RL and OAKS A (1983). Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. Plant Physiol **72**: 949-952.

SOMERVILLE CR (1984). The analysis of photosynthetic carbon dioxide fixation and photorespiration by mutant selection. Dans: Oxford Survey of Plants Molecular and Cell Biology (ed par MIFLIN BJ), Vol. **1**, Oxford University Press, Oxford, pp. 103-131.

SOMERVILLE CR and OGREN WL (1980). Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking in leaf glutamate synthase activity. Nature **286**: 257-259.

SOMERVILLE CR and OGREN WL (1982). Isolation of photorespiratory mutants in *Arabidopsis thaliana*. Dans: Methods in Chloroplast Molecular Biology (ed par EDELMAN M, HALLICK RB, CHUA NH), Elsevier Biomedical Press, New York, pp 129-138.

SRIVASTAVA HS and SINGH RP (1987). Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. Phytochem. **26**: 597-610.

SRIVASTAVA HS, OAKS A and BAKYTA IL (1976). The effect of nitrate on early seedling growth in *Zea mays*. Can J Bot **54**: 923-929.

STASWICK PE (1989). Developmental regulation and the influence of plant sinks on vegetative storage protein gene expression in soybean leaves. Plant Physiol. **89**: 309-315.

STEINER FX and DOWNEY RJ (1982). Biochim. Biophys. Acta **706**: 203-211.

STEWART GR, SHATILOV VR, TURNBULL MH, ROBINSON SA and GOODALL R (1995). Evidence that glutamate dehydrogenase plays a role in the oxidative deamination of glutamate in seedlings of *Zea mays* L. Aust. J. Plant Physiol. Sous presse.

STEWART GR, MANN AF and FENTEM PA (1980). Enzymes of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. Dans"The biochemestry of plants: a comprehensive treatrise" (ed par MIFLIN BJ), vol. **5**, Academic Press, London, pp. 271-327.

STREIT L, NELSON RS and HARPER JE (1985). Plant Physiol. **78**: 80-84.

STREIT L, MARTIN BA and HARPER JE (1987). Plant Physiol. **84**: 654-657.

STRIBLEY DP and READ DJ (1976). The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. VI. The effects of mycorrhizal infection and concentration of ammonium nitrogen on growth of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) in sand culture. New Phytol. **75**: 119-130.

SUGIHARTO B and SUGIYAMA T (1992). Effects of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recorvery from nitrogen stress. Plant Physiol. **98**: 1403-1408.

SUKALOVIC VHK (1986). Activity and distribution of nitrogen-metabolism enzymes in the developing maize kernel. Physiol. Plant. **67**: 247-252.

SUKANYA R, LI MG and SNUSTAD DP (1994). Root- and shoot-specific responses of individual glutamine synthetase genes of maize to nitrate and ammonium. Plant Mol. Biol. **26**: 1935-1946.

SUZUKI A and GADAL P (1982). Glutamate synthase from rice leaves. Plant Physiol. **69**: 848-852.

SUZUKI A and GADAL P (1984). Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and other organisms. Physiol. Vég. **22**: 471-486.

SUZUKI A, GADAL P and OAKS A (1981). Planta **151**: 457-461.

SUZUKI A, VIDAL J and GADAL P (1982). Glutamate synthase isoforms in rice. Immunological studies of enzyme in green leaf, etiolated leaf and root tissues. Plant Physiol. **70**: 827-832.

SUZUKI A, JACQUOT J-P and GADAL P (1983). Glutamate synthase in rice roots. Studies on the electron donor specificity. Phytochem. **22**: 1543-1546.

SUZUKI A, AUDET C, OAKS A (1987). Influence of light in the ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaves. Plant Physiol. **84**: 578-581.

SUZUKI A, VIDAL J, NGUYEN J and GADAL P (1984). Occurence of ferredoxin-dependent glutamate synthase in plant cell fraction of soybean root nodules (*Glycine max*). FEBS letters **173**(1): 204-208.

SYNTICHAKI KA, LOULAKAKIS KA and ROUBELAKIS-ANGELAKIS KA (1996). The amino acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase to the extremophilic archael enzyme comforms to its stress-related function. Gene (sous presse).

T

TA TC and JOY KW (1986). Metabolism of some amino acids in relation to the photrespiratory nitrogen cycle of pea leaves. Planta **169**: 117-122.

TEMPLE SJ, BAGGA S and SENGUPTA-GOPALAN C (1994). Can glutamine synthetase activity levels be modulated in transgenic plants by the use of recombinant DNA technology? Trans. Plants and Plant Biolchem. **22**: 915-920.

TINGEY SV and CORUZZI GM (1987). Glutamine synthetase of *Nicotiana plumbaginifolia*. Cloning and *in vivo* expression. Plant Physiol. **84**: 366-373.

TINGEY SV, WALKER EL and CORUZZI GM (1987). Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are

differentially expressed in leaves, roots and nodules. EMBO J. **6**: 1-9.

TINGEY SV, TSAI FY, EDWARDS JW, WALKER EL and CORUZZI GM (1988). Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed *in vivo*. J. Biol. Chem. **263**: 9651-9657.

TISCHNER R, PEUKE A, GODBOLD DL, FEIG R, MERG G and HÜTTERMANN A (1988). The effect of NO_2-fumigation on aseptically grown spruce seedlings. J Plant Physiol **133**: 243-246.

TOBIN EM and SILVERTHORNE J (1985). Light regulation of gene expression in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. **36**: 569-593.

TOBIN AK, RIDLEY SM and STEWART GR (1985). Planta **163**: 544-548.

TROELSTRA SR, WAGENAAR R and DE BOER W (1990). Nitrification in Dutch heathland soils. I. General soil characteristics and nitrification in undisturbed soil cores. Plant and Soil **127**: 179-192.

TROELSTRA SR, WAGENAAR R and SMANT W (1995). Nitrogen utilization by plant species from acid heathland soils. I. Comparison between nitrate and ammonium nutrition at constant low pH. J. Exp Bot **46** (290): 1103-1112.

TSAY Y-F, SCHROEDER JI, FELDMANN KA and CRAWFORD NM (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inductible nitrate transporter. Cell **72**: 1-20.

U

V

VAUCHERET H, VINCENTZ M, KRONENBERGER J, CABOCHE M and ROUZÉ P (1989a). Molecular cloning and characterization of the two homologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. Mol Gen Genet **216**: 10-15.

VAUCHERET H, VINCENTZ M, KRONENBERGER J, CABOCHE M and ROUZÉ P (1989b). Complete nucleotide sequence of the two homologous tobacco nitrate reductase genes. Plant Mol Biol **12**: 597-600.

VAUCHERET H, CHABAUD M, KRONENBERGER J and CABOCHE M (1990). Functional complementation of tobacco and *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase deficient mutants by transformation with the wild-type alleles of the tobacco structural genes. Mol Gen Genet **220**: 468-478.

VAUGHN KC and CAMPBELL WH (1988). Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. Plant Physiol. **88**: 1354-1357.

VÊZINA L-P, LAVOIE N, JOY KW and MARGOLIS HA (1992). The fate of newly absorbed ammonium and nitrate ions in roots of Jack pine seedlings. J. Plant Physiol. **141**: 61-67.

VÊZINA L-P and MARGOLIS HA (1990). Purification and properties of glutamine synthetase in leaves and roots of *Pinus banksiana* Lamb. Plant Physiol. **94**: 657-664.

VÊZINA L-P and LANGLOIS JR (1989). Tissue and cellular distribution of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum*) seedlings. Plant Physiol. **90**: 1129-1133.

VÊZINA L-P, MARGOLIS HA and OUIMET R (1988). The activity, charcterization and distribution of the nitrogen assimilation enzyme, glutamine synthetase, in jack pine seedlings. Tree Physiol **4**: 109-118.

VILLENEUVE N, LE TACON F and BOUCHARD D (1991). Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted douglas-fir seedlings. Plant and Soil **135**: 95-107.

VINCENTZ M and CABOCHE M (1991). Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. EMBO J **10**: 1027-1035.

VINCENTZ M, MOUREAUX T, LEYDECKER MT, VAUCHERET H and CABOCHE M (1993). Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. Plant J **3**: 315-324.

VOGEL CS and DAWSON JO (1991). nitrate reductase activity, nitrogenase activity and

photosynthesis of black alder exposed to chilling temperatures. Physiol. Plant. **82**: 551-558.

W

WALKER EL and CORUZZI GM (1989). Developmentally regulated expression of the gene family for cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. Plant Physiol. **91**: 702-708.

WALLSGROVE RM, HARE E, LEA PJ and MIFLIN BJ (1977). Studies on glutamate synthase from the leaves of higher plants. J. Exp. Bot. **28**: 588-596.

WALLSGROVE RM, LEA PJ and MIFLIN BJ (1979). Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. Plant Physiol. **63**: 232-236.

WARD M, TISCHNER R and HUFFAKER RC (1989). Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate-reductase IgG fragments and the identification of plasma menbrane associated nitrate reductase in roots of barley seedlings. Plant Physiol. **88**: 1141-1145.

WARNER RL and KLEINHOFS A (1992). Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. Physiol Plant **85**: 245-252.

WARNER RL, NARAYANAN KR and KLEINHOFS A (1987). Inheritance and expression of NAD(P)H nitrate reductase in barley. Theo Appl Genet 74: 714-717.

WATANABE M, NAKAYAMA H, WATANBE Y and SHIMADA N (1992). Induction of a specific isoenzyme of glutamate dehydrogenase during isolation and the first 48h of culture of *Brassica napus* leaf protoplasts. Physiol. Plant. **86**: 231-235.

WINGSLE G, NÄSHOLM T, LUNDMARK A and ERICSSON T (1987). Induction of nitrate reductase in needles of Scot pine seedlings by NO_x and NO_3^-. Physiol Plant **70**: 399-403.

WINK C and HARTMANN T (1981). Properties and subcellular location of L-alanine: aldehyde aminotransferase: Concept of an ubiquitous plant enzyme involved in secondary metabolism. Z. Naturforsch. **36c**: 625-632.

WINTER HC, POWELL GK and DEKKER EE (1982) Glutamine synthetase of germinating peanuts. Plant Physiol **69**: 41-47

X

Y

YAMAYA T, OAKS A and MATSUMOTO H (1984). Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. Plant Physiol. **76**: 1009-1013.

YAMAYA T and OAKS A (1988). Distribution of two isoforms of glutamine synthetase in bundle sheath and mesophyll cells of corn leaves. Physiol. Plant. **72**: 23-28.

YAMAYA T, HAYAKAWA T, TANASAWA K, KAMACHI K, MAE T and OJIMA K (1992). Tissue distribution of glutamates synthase and glutamine synthetase in rice leaves. Occurrence of NADH-dependent glutamate synthase protein and activity in the unexpanded, nongreen leaf blades. plant Physiol. **100**: 1427-1432.

Z

ZEHNACKER C, BECKER TW, SUZUKI A, CARRAYOL E, CABOCHE M and HIREL B (1992). Purification and properties of tobacco ferredoxin-dependent glutamate synthase, and isolation of corresponding cDNA clones. Light-inducibility and organ-specificity of gene transcription and protein expression. Planta **187**: 266-274.

ZELMER I and GÜNTHER G. (1988). Activities of glutamate dehydrogenase (GDH), glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) in suspension cultures of *Beta vulgaris* (Sugar beet) and *Chenopodium album* (Goosefoot). Biochem. Physiol. Pflanzen **183**: 397-405.

Annexes

Tableau 2.1: Composition du milieu d'extraction de la GS racinaire du Douglas.

Composé	Concentration	
Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM	
Glycérol	10 %	(V / V)
PVP	2 %	(P / V)
PVPP	10 %	(P / P)
Na_2EDTA	2 mM	
$MgSO_4$	5 mM	
Glutamate de sodium	10 mM	
2-mercaptoéthanol	14 mM	

Tableau 2.2: Composition du milieu réactionnel pour la détermination de l'activité GS par le dosag transférasique.

Composés	Concentration	Essai (µl)
L glutamate	800 mM	100
Hydroxylamine	300 mM	100
Na_2EDTA	40 mM	100
$MgSO_4$	200 mM	100
ATP	80 mM	100
Extrait enzymatique		50 à 200
Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM	qsp 1000

Tous les produits sont repris dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,6).
L'hydroxymamine, le magnésium et l'EDTA sont mélangés en une seule solution mère.

Tableau 2.3: Composition du milieu réactionnel pour la détermination de l'activité GS par le dosag transférasique.

Composés	Concentration	Essai (µl)
L glutamine	250 mM	500
Hydroxylamine	300 mM	100
Na_2EDTA	40 mM	100
$MgSO_4$	200 mM	100
Arsenate de K^+	400 mM	50
ADP	10 mM	50
Extrait enzymatique		50 à 200
Tris-HCl (pH 7,2)	50 mM	qsp 1000

Tous les produits sont repris dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,2).
L'hydroxymamine, le magnésium et l'EDTA sont mélangés en une seule solution mère

Tableau 2.4: Composition du milieu réactionnel pour la détermination de l'activité GS, par le dosag spectrophotométrique.

Composés	Concentration	Essai (µl)
L glutamate	800 mM	100
$SO_4(NH_4^+)$	45 mM	100
ATP	80mM	100
$MgSO_4$	200 mM	100
PEP	15 mM	50
$NADH + H^+$	2,4 mM	50
KCl	450 mM	100
Pyruvate kinase	10 unités	
Lactate déshydrogénase	10 unités	
Extrait enzymatique		50 à 200
Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM	qsp 1150

Tous les produits sont en solution dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,6).

Tableau 2.5: Composition du milieu réactionnel pour la détermination de l'activité GDH à NADP.

Composés	Concentration	Essai (µl)
α-cétoglutarate	100 mM	50
$(NH_4)_2SO_4$	1,4 m M	50
NADPH	2,4 mM	50
Extrait enzymatique		25
Tampon phosphate	100 mM (pH=7,2)	825

Tableau 2.6: Composition du milieu réactionnel pour la détermination de l'activité de l'AAT.

Composés	Concentration	Essai (µl)
α-cétoglutarate	100 mM	100
Aspartate	100 mM	200
Pyridoxal 5-phosphate	4,5 mM	20
NADH	2,8 mM	100
MDH	47 UI/ml	20
Extrait enzymatique		100
Tampon Tris-HCl	100 mM (pH=8)	610

Tableau 2.7: Composition du milieu réactionnel pour la détermination de l'activité de l'Ala-T.

Composés	Concentration	Essai (µl)
α-cétoglutarate	100 mM	100
Alanine	100 mM	100
Pyridoxal 5-phosphate	4,5 mM	20
NADH	2,8 mM	100
LDH	50 µg/ml	20
Extrait enzymatique		100
Tampon Tris-HCl	100 mM (pH=8)	710

Tableau 2.8: Composition du tampon d'équilibration et d'élution pour la purification de la GS (Tampon A).

Composés	Concentration
Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM
Glycérol	10 % (v/v)
Na_2EDTA	2 mM
$MgSO_4$	5 mM
Glutamate de sodium	10 mM
2-mercaptoéthanol	14 mM

Tableau 2.9 : Composition du gel de séparation à 6% pour électrophorèse en conditions non dénaturantes (volume final de 5 ml).

Composé	Concentration finale de la solu	Volume
Acrylamide + Bisacrylamide	30 % (p/v) + 0,8 % (p/v)	996 µl
Tris-HCl (pH 8,8)	1 M	1870 µl
Persulfate d'ammonium	1,5 % (p/v)	250 µl
TEMED	-	5 µl
Eau ultrapure	-	1879 µl

Tableau 2.10 : Composition du gel de concentration à 4% pour électrophorèse en conditions non dénaturantes (volume final de 2 ml).

Composé	Concentration finale de la solu	Volume
Acrylamide + Bisacrylamide	10 % (p/v) + 2,5 % (p/v)	600 µl
Tris-HCl (pH 6,8)	1 M	250 µl
Persulfate d'ammonium	1,5 % (p/v)	100 µl
TEMED	-	5 µl
Eau ultrapure	-	1045 µl

Tableau 2.11 : Composition du milieu réactionnel pour la révélation de l'activité glutamine synthétase transférasique sur gel de polyacrylamide (d'après Brun *et al.*, 1992).

Composés	Concentration	Quantité en mg/ml de milieu
L glutamine	125 mM	10,96
NH_2OH	30 mM	2,08
ADP	0,5 mM	0,21
$MgSO_4$, $7H_2O$	20 mM	4,92
Arsenate de K^+	20 mM	3,60
Na_2EDTA	4 mM	1,49

Les produits sont en solution dans du tampon Tris HCl 50 mM (pH 7,2)

Tableau 2.12 : Composition du milieu réactionnel pour la révélation de l'activité glutamine synthétase biosynthétique sur gel de polyacrylamide (d'après Brun *et al.*, 1992)

Composés	Concentration	Quantité en mg/ml de milieu
L glutamine	125 mM	10,96
NH_2OH	30 mM	2,08
ADP	0,5 mM	0,21
$MgSO_4$, $7H_2O$	20 mM	4,92
Arsenate de K^+	20 mM	3,60
Na_2EDTA	4 mM	1,49

Les produits sont en solution dans du tampon Tris HCl 50 mM (pH 7,6)

Tableau 2.13 : Protocole de révélation des protéines par le nitrate d'argent (modifié, d'après Blum 1986). Les pourcentages sont exprimés en volume par volume sauf si précisé.

Etapes	Solutions	Concentration	Durée
Fixation des protéines	Ethanol	50%	
	Acide acétique	12%	1 heure
	Formaldehyde à 37%	0,5 ml/l	(minimum)
Lavage	Ethanol	50%	3 X 20 mn
Contraste du gel	Thiosulfate de sodium	0,2 g/l	1 mn
Lavage	Eau ultra-pure		3 X 20 s
Imprégnation argentique	Nitrate d'argent	2 g/l	20 mn
	Formaldehyde	0,75 ml/l	
Lavage	Eau ultra-pure		3 X 20 s
	Carbonate de sodium	60 g/l	
Développement	Thiosulfate de sodium	0,004 g/l	20 mn
	Formaldehyde	0,50 ml/l	
Lavage rapide	Eau ultra-pure		20 s
Fixation et conservation	solution de départ		10 mn (minimum)

Tableau 2.14 : Composition du gel de concentration à 5% pour électrophorèse en condition dénaturantes (volume final de 2 ml).

Composé	Concentration finale de la solution	Volume
Acrylamide + Bisacrylamide	10 % (p/v) + 2,5 % (p/v)	600 µl
Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 M	250 µl
Persulfate d'ammonium	1,5 % (p/v)	100 µl
SDS	20 % (p/v)	20 µl
TEMED	-	5 µl
Eau ultrapure	-	1025 µl

Tableau 2.15 : Composition du gel de concentration à 15% pour électrophorèse en condition dénaturantes (volume final de 5 ml).

Composé	Concentration finale de la solution	Volume
Acrylamide + Bisacrylamide	30 % (p/v) + 0,8 % (p/v)	2490 µl
Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 M	1870 µl
Persulfate d'ammonium	1,5 % (p/v)	250 µl
SDS	20 % (p/v)	50 µl
TEMED	-	5 µl
Eau ultrapure	-	335 µl

Tableau 2.16 : Composition du tampon de Laemmli pour la solubilisation des protéines pou électrophorèse en conditions dénaturantes

Composé	Concentration	volume
Tris-HCl (pH 8,8)	0,5 M	1,0 ml
Glycérol	concentré	0,8 ml
SDS	20 % (p/v)	0,8 ml
2-mercaptoéthanol	concentré	0,4 ml
Bleu de bromophénol	0,05 % (p/v)	0,2 ml
Eau ultrapure	-	4,8 ml

Tableau 2.17 : Composition du gel à 4% pour gradipore en conditions non dénaturantes (volum final de 4,5 ml).

Composé	Concentration	Volume
Acrylamide + Bisacrylamide	30% (p/v) + 0,8% (p/v)	1990 µl
Tris-HCl (pH 6,8)	1 M	1683 µl
Persulfate d'ammonium	1,5 % (p/v)	225 µl
TEMED	-	5 µl
Eau ultrapure	-	1990 µl

Tableau 2.18 : Composition du gel à 25% pour gradipore en conditions non dénaturantes (volum final de 4,5 ml).

Composé	Concentration	Volume
Acrylamide + Bisacrylamide	60 % (p/v) + 1,6 % (p/v)	1875 µl
Tris-HCl (pH 8,8)	1 M	1683 µl
Persulfate d'ammonium	1,5 % (p/v)	225 µl
TEMED	-	5 µl
Eau ultrapure	-	712 µl

Résumé

La glutamine synthétase des racines du Douglas a été purifié à homogénéité électrophorètique. Ses principales propriétés physico-chimiques ont été analysées. Ainsi, cette enzyme présente une masse moléculaire d'environ 460 kDa et est constituée de deux sous-unités de 64 et 54 kDa. De plus, elle possède une très forte affinité pour l'ion ammonium. L'étude de la GS aux stades précoces de développement du Douglas a montré l'existence d'une seule isoforme de masse moléculaire identique à celle de la GS racinaire, et qui n'est que faiblement affectée par la source d'azote disponible. Cependant à des stades de croissance plus avancés, l'absence d'azote et la source d'azote présente affecte non seulement la croissance du végétal mais aussi la répartition de l'activité GS au sein de la plante. Lors de la mycorhization du Douglas par *Lac. bicolor* S238N, les GS fongiques et racinaires restent fonctionnelles en proportion égale.

Mots clés : Ammonium; assimilation de l'azote; croissance; Douglas; glutamine synthétase; mycorhization; *Pseudotsuga menziesii*; régulation.