

Chapitre 7

Recherche du nitrate réductase

Introduction

Bien que l'azote soit connu comme l'un des biogènes les plus abondants sur Terre, le manque de ce nutriment est un phénomène largement répandu dans de nombreux écosystèmes. C'est l'un des facteurs les plus importants limitant la croissance des plantes.

Cependant, l'azote libre peut être fixé à partir de l'atmosphère par certains organismes procaryotes, à la fois libres et symbiotiques. Cette forme d'azote n'est pas disponible pour les espèces de plantes vasculaires. Il est disponible sous forme de nitrate et/ou d'ammoniac, qui peuvent être absorbés par les tissus à partir du sol ou des retombées atmosphériques.

Le nitrate et l'ammoniac du sol sont considérés comme la source la plus importante de l'azote disponible pour les plantes vasculaires, mais les polluants gazeux tels que les oxydes d'azote, l'ammoniac gazeux, la vapeur d'acide nitrique, ainsi que le nitrate tombant avec la poussière atmosphérique directement absorbé par les feuilles peuvent également influencer le réservoir total d'azote disponible pour les plantes.

La nitrate réductase (NR), l'enzyme qui joue un rôle clé dans la réponse de fixation des nitrates à de nombreux facteurs environnementaux. Outre la présence du substrat (nitrate), l'activité de l'enzyme dépend de nombreux autres facteurs tels que la température, l'état hydrique de la plante, l'intensité de la lumière solaire et d'autres.

En raison de l'intérêt croissant pour la biomonitoring et les études écologiques, il a été nécessaire de développer de nouvelles méthodes de recherche. La recherche présentée a tenté de trouver des conditions optimales pour l'activité cinétique des enzymes avec une expérience menée sur le terrain in situ.

Définition

La nitrate réductase (NR) nomme autrement une flavoprotéine soluble contenant du molybdène. Cette enzyme est essentielle pour la réduction du nitrate en NH_2 dans les plantes, étape essentielle de la production des protéines. La plupart du molybdène (Mo) contenu dans les plantes est associée à cette enzyme. La synthèse de la protéine nitrate réductase est régulée au niveau de l'expression des gènes.

La nitrate réductase est l'enzyme qui catalyse la première étape de la réduction du nitrate N en formes organiques dans la plante, et on pense qu'elle reflète le niveau d'activité de N dans les feuilles.

La nitrate réductase est une protéine à durée de vie exceptionnellement courte. Sa demi-vie n'est que de quelques heures. Le taux de synthèse de novo de cette enzyme est très élevé. Ainsi, en régulant sa synthèse, l'activité de la nitrate réductase dans le tissu peut être modifiée en quelques heures.

Divers facteurs contrôlent la synthèse de l'enzyme au niveau de l'expression des gènes. Les nitrates et la lumière stimulent la synthèse enzymatique. Une partie de l'effet lumineux est causée par les glucides générés par la photosynthèse. La synthèse de la protéine nitrate réductase est stimulée par le glucose et d'autres glucides générés par la photosynthèse, et est inhibée par le NH_4^+ , la glutamine et d'autres acides aminés. Des capteurs semblent être présents dans la cellule qui ajustent via la

régulation de l'expression des gènes la capacité de la nitrate réductase à la fois à la demande en acides aminés et à l'apport de squelettes carbonés issus de l'assimilation du CO₂ pour sa synthèse.

En comparant l'activité de la nitrate réductase foliaire avec la concentration en nitrate du pétiole, il a été découvert que le dosage de la nitrate réductase était un indicateur plus sensible et plus fiable du statut en N des plantes. Cependant, le dosage de la nitrate réductase est trop coûteux et prend trop de temps pour être utilisé en routine pour évaluer les niveaux d'azote du coton cultivé commercialement. Toutefois, les tests NR s'avèrent utiles pour examiner les effets de la limitation en fer sur le métabolisme des nitrates.

L'objectif de cette recherche était :

- de développer une méthode rapide, peu coûteuse et fiable pour évaluer l'activité de la nitrate réductase, comme l'un des facteurs de réponse au stress environnemental.
- de trouver les conditions optimales pour l'enzyme après la collecte du matériel végétal.

La recherche a été menée dans la réserve forestière de Lipówka, dans la partie nord de la forêt de Niepołomice. Ce complexe forestier est situé à l'est de l'agglomération de Cracovie. Depuis de nombreuses décennies, il est exposé à la pollution atmosphérique de Cracovie, en particulier de l'usine sidérurgique (Mittel Steel S.A., anciennement appelée Usine sidérurgique de Nowa Huta).

Matériels et Méthodes

Cinq chênes matures *Quercus sessilis* ont été choisis pour la collecte de feuilles fraîches. Pour éviter le stress hydrique et minimiser les dommages tissulaires immédiatement après la collecte, des cercles de 3 mm de diamètre ont été découpés à l'aide d'une perforatrice et placés dans les tubes à essai.

(Fig. 1). L'activité de la nitrate réductase (NR) est généralement mesurée in vivo en évaluant la production de nitrite dans les tissus qui ont été infiltrés sous vide avec une solution tamponnée de nitrate. Pour cette étude, un test de réductase des nitrates a été adapté à partir de plusieurs études avec nos propres modifications. Parce que dans cette zone, aucune alimentation électrique n'était fournie, nous avons utilisé une pompe à vide manuelle de notre propre conception. (Fig. 2).

L'échantillonnage et les mesures ont été effectués uniquement par temps ensoleillé. Le tissu des feuilles a ensuite été soumis à une infiltration sous vide (avec une pompe à vide manuelle) à 0,33 atm pendant 5 minutes et incubé dans le tampon pendant 2 heures à 20 °C dans l'obscurité. La composition du tampon d'incubation était constituée de 0,1 M KNO₃, 0,1 M K₂HPO₄ et 0,6 % de 1-propanol, et ajustée à pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 et 9,0 respectivement, en utilisant HCl et KOH.

La température d'incubation a été fixée à 10, 20, 25 et 30 °C respectivement. La température a été réglée et contrôlée à l'aide d'eau chaude ou de glaçons en raison des changements. La construction de nos chambres d'incubation permet de corriger rapidement les changements de température si nécessaire. (Fig. 3).

Après incubation, l'activité enzymatique a été terminée par l'ajout de 1% de

sulfanilamide dans 8% de HCl. La concentration de nitrite synthétisé dans le tampon d'incubation a été déterminée colorimétriquement après diazotation et formation de colorant azoïque suite à l'ajout du mélange réactionnel de 0,02% N-(1-naphtyl) dihydrochlorure de diéthylènediamine.

La densité optique a été mesurée colorimétriquement après 10 min à 540 nm à l'aide d'un spectromètre (Shimadzu UV-120). Un mélange de tampon d'incubation avec 1% de sulfanilamide dans 8% de HCl et 0,02% de N-(1-naphtyl)éthylènediamine dihydrochlorure dans la même proportion que celle utilisée pour créer le composé diazo a été utilisé comme blanc. Tous les produits chimiques ont été fournis par Merck. (Germany).

Les échantillons de feuilles ont été retirés des tubes à essai et pesés après séchage au four jusqu'à obtenir un poids constant à 60 °C. L'activité de NR a été calculée sur la base d'une courbe d'étalonnage pour le KNO_2 .

Les résultats ont été exprimés en termes de quantité de nitrite synthétisé en n mol par gramme de poids sec de tissu végétal par heure ($\text{nmol g}^{-1}\text{DWh}^{-1}$).



Fig. 1. Méthode de prélèvement d'échantillons de feuilles. Immédiatement après avoir prélevé l'échantillon de l'arbre, des cercles de feuilles ont été pris. Cela doit être fait aussi vite que possible. Si c'est faisable, le cercle doit être pris sans ramasser les feuilles d'un plan.



Fig. 2. Après échantillonnage, les anneaux de feuilles ont été placés dans des tubes à essai et exposés à un traitement sous basse pression. (0.33 atm.).

Le système manuel à basse pression est construit avec deux vannes, un manomètre et une pompe à piston inversé.



Fig. 3. La température dans la chambre d'incubation est stable, elle est remplie d'eau et permet un ajustement rapide de la température. La température est réglée et ajustée à un niveau constant pendant toute la durée de l'incubation en utilisant des glaçons ou de l'eau chaude.

Résultats et Discussion

Deux facteurs influençant l'activité de la nitrate réductase ont été examinés : le pH du tampon d'incubation (expérience toujours réalisée à 20 °C) et la température du tampon (toujours avec le même pH de tampon, fixé à 7,0).

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence statistique de l'activité de la nitrate réductase avec différentes réactions de tampon (pH) $F = 0,0011$, $p = 0,97$.

Mais il a, ou tend à avoir l'activité la plus élevée entre pH = 7 et pH = 8 (Moy = 314 ; ÉC = 39,6 nmol/g p.s./h) (Fig. 4).

Probablement, aucune différence statistique dans cette étude ne résulte du petit nombre de répliques. Mais de nombreux auteurs indiquent que cette plage de pH constitue un environnement optimal pour l'activité de la nitrate réductase. Par conséquent, les auteurs ont décidé d'utiliser un tampon avec un pH de 7,0 pour l'expérience d'incubation à température. Avec une température allant de 10 à 30 °C (M = 63; ÉT = 22,7; M = 490; ÉT = 283,6 respectivement), une forte corrélation significative s'est produite $r_s = 0,79$, $p = 0,00002$.

(Fig. 5). Mais de nombreux auteurs suggèrent d'utiliser une température d'incubation entre 20 et 25 degrés pour comparer les résultats avec d'autres études.

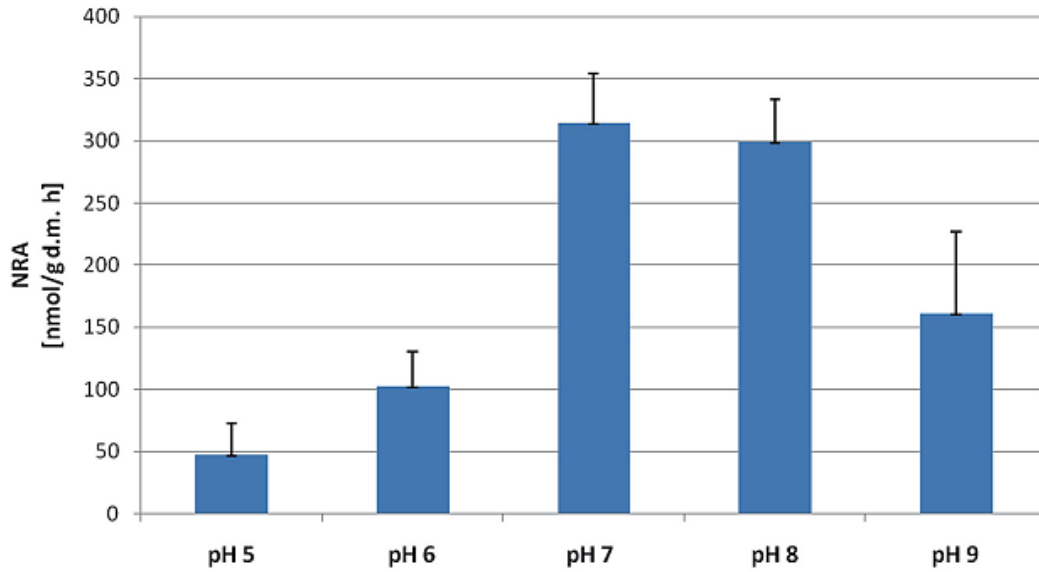


Fig. 4. L'activité de la nitrate réductase est résistante sur une large gamme de pH, mais son optimum se situe entre pH = 7 et pH = 8. Cependant, les différences ici n'étaient pas significatives, la tendance est visible.

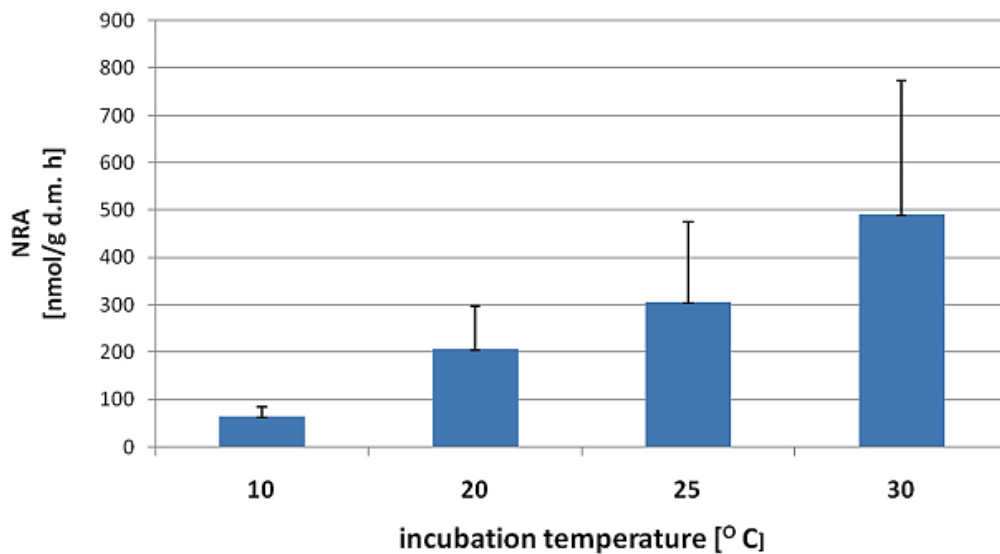


Fig. 5. La température a un fort impact sur l'activité de la nitrate réductase. Il est statistiquement significatif ($r_s = 0,79$, $p = 0,00002$) malgré une forte dispersion des résultats à la température la plus élevée étudiée (30 °C).

Conclusions

1. Cette recherche a démontré que l'activité de la nitrate réductase mesurée dans des conditions de terrain peut être un outil utile pour étudier les conditions des plantes.
2. La nitrate réductase démontre une résistance aux changements de pH de la solution d'incubation.
3. La réductase de nitrate pour l'activité strictement dépend de la température de la solution d'incubation.