

Jean-François Morot-Gaudry, éd.

assimilation de l'azote chez les plantes

aspects physiologique,
biochimique et moléculaire

MIEUX COMPRENDRE

 **INRA**
EDITIONS

assimilation de l'azote chez les plantes

aspects physiologique,
biochimique et moléculaire

assimilation de l'azote chez les plantes

aspects physiologique,
biochimique et moléculaire

Jean-François Morot-Gaudry, éd.

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
147, rue de l'Université - 75338 Paris Cedex 07

MIEUX COMPRENDRE

Ouvrages parus dans la même collection :

L'eau dans l'espace rural

RIOU C., BONHOMME R., CHASSIN P.,
NEVEU A., PAPY F., éd.
1997, sous presse.

La pomme de terre

P. ROUSSELLE, Y. ROBERT,
Y.-C. CROSNIER, éd.
1996, 620 p.

**Vie microbienne du sol et production
végétale**

Pierre DAVET
1996, 380 p.

**Nutrition des ruminants
domestiques**

R. JARRIGE, Y. RUCKEBUSH
C. DEMARQUILLY, M.-H. FARCE,
M. JOURNET
1995, 921 p.

**Sols caillouteux et production
végétale**

Raymond GRAS
1994, 178 p.

Biologie de la lactation

Jack MARTINET, Louis-Marie HOUEBINE
1993, 587 p.

**Amélioration des espèces végétales
cultivées.**

Objectifs et critères de sélection

André GALLAIS, Hubert BANNEROT
1992, 768 p.

**La régression non linéaire :
méthodes et applications en biologie**

Sylvie HUET, Emmanuel JOLIVET,
Antoine MESSÉAN
1992, 250 p.

**L'épidémiologie en pathologie végétale :
mycoses aériennes**

Franzt RAPILLY
1991, 318 p.

**Principes d'amélioration génétique des
animaux domestiques**

Francis MINVIELLE
1990, 211 p.

Cytogénétique des mammifères d'élevage

Paul C. POPESCU
1989, 114 p.

**Les oligo-éléments en agriculture
et élevage.**

Yves COÏC, Marcel COPPENET
1989, 114 p.

Éléments de virologie végétale (épuisé)

Pierre CORNUET
1987, 208 p.

© INRA, Paris 1997

ISBN : 2-7380-0716-3

ISSN : 1144-7605

Le code de la propriété intellectuelle du 1^{er} juillet 1992 interdit la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Le non respect de cette disposition met en danger l'édition, notamment scientifique. Toute reproduction, partielle ou totale, du présent ouvrage est interdite sans autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC), 3 rue Haute-feuille, Paris 6^e.

Avant-propos

Pour construire leur machinerie cellulaire, en particulier leurs protéines, les plantes prélèvent directement l'azote minéral dans le sol, sous forme de nitrate et d'ammonium, et éventuellement fixent l'azote moléculaire de l'air (cas des légumineuses). L'azote minéral du sol est fourni généralement sous forme d'engrais nitriques ou ammonitriques. Si les engrais azotés ont permis depuis une quarantaine d'années d'augmenter beaucoup les rendements des cultures, les nitrates non assimilés, entraînés par les eaux de lessivage des sols, sont responsables de la pollution des nappes phréatiques. De plus, les nitrates qui peuvent s'accumuler dans les organes végétaux récoltables (feuilles de laitue, d'épinard, de tabac, tubercules de pommes de terre et racines tubérisées de carotte) sont considérés comme un danger potentiel pour la santé humaine. Désormais l'agriculture doit concilier le maintien des rendements agricoles élevés et le respect de la qualité de l'environnement. Un des moyens pour atteindre ces objectifs est d'augmenter l'efficacité d'assimilation et de gestion de l'azote par les plantes. La sélection classique de nouvelles variétés plus performantes a sans doute atteint ses limites. Il est nécessaire maintenant de comprendre les mécanismes physiologiques, biochimiques, moléculaires, impliqués dans les voies d'assimilation de l'azote, afin de les modifier et améliorer ainsi les performances des plantes vis-à-vis de l'azote durant leur croissance et leur développement.

Cet ouvrage publie les principales connaissances, acquises ces vingt dernières années sur le métabolisme azoté, qui permettent d'envisager de nouvelles stratégies d'amélioration des espèces et de nouveaux itinéraires techniques de cultures de plantes d'intérêt agronomique.

Après un bref rappel du cycle de l'azote, il est décrit comment le nitrate et l'ammonium sont prélevés et assimilés par les plantes. Les mécanismes d'absorption, de transport, de stockage et de métabolisation de ces éléments azotés minéraux sont présentés en détails.

Il s'ensuit une description de la structure et de la fonction des quatre principales enzymes impliquées dans la réduction des nitrates et l'assimilation de l'ammonium. Une attention particulière a été portée à la description des mécanismes moléculaires qui gèrent la régulation de l'expression des gènes codant ces enzymes, dans des compartiments tissulaires, cellulaires ou infracellulaires donnés.

Les types d'assimilation de l'azote, qui font intervenir des associations bactéries, champignons, plantes, c'est-à-dire l'assimilation symbiotique et l'assimilation mycorhizienne

font l'objet des chapitres suivants. Dans ces chapitres, les aspects moléculaires et génétiques ont été très développés ainsi que la description des mécanismes de reconnaissance entre micro-organismes et plante hôte (signaux symbiotiques).

La synthèse des acides aminés, les relations entre métabolisme azoté, respiration et photosynthèse, l'effet de l'azote sur l'orientation des flux de carbone sont présentés et examinés à la lumière des données récentes de la biologie.

Après un rappel de la méthodologie, ^{15}N , isotope stable de l'azote, largement utilisé pour suivre le devenir de cet élément chez les végétaux, il est décrit comment l'azote est géré au cours de la croissance et du développement des céréales, des plantes fourragères et ligneuses (arbres fruitiers). Les mécanismes de mise en réserve de l'azote dans les graines de céréales font l'objet d'une attention particulière. Les mécanismes de protéolyse sont évoqués sous un aspect nouveau et original.

La dernière partie est dédiée aux aspects agronomiques et écophysiologiques, sans oublier le problème de la pollution.

Cet ouvrage s'adresse aux étudiants de 2^e et 3^e cycles universitaires et des écoles d'agronomie et d'agriculture. Il pourra être très utile également aux professeurs de ces établissements et à toutes les personnes qui doivent acquérir rapidement un minimum de connaissance dans le domaine de l'assimilation de l'azote chez les plantes supérieures d'intérêt agronomique.

Étant donné la complexité de l'ouvrage, n'est présenté que le métabolisme primaire de l'azote. La synthèse des métabolites secondaires (alcaloïdes... par exemple) et des acides nucléiques n'est pas abordée.

Ce livre a demandé la participation de nombreux auteurs. Pour des raisons de commodité, de taille et de coût, les chercheurs travaillant sur l'azote n'ont pas tous été consultés, qu'ils veuillent bien m'en excuser. J'ai sélectionné les équipes qui, par l'avancement de leurs travaux, pouvaient faire facilement le point sur un chapitre donné. De plus l'intérêt agronomique porté par les chercheurs a souvent guidé mon choix.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance à tous les auteurs de cet ouvrage qui ont accepté, malgré leur emploi du temps très chargé, d'écrire un chapitre. Je remercie également tous mes collègues qui m'ont encouragé dans cette opération, qui m'ont conseillé et ont accepté de relire les épreuves, en particulier S. Chaillou, T. Lamaze, A. Limami, J. Farineau, J.P. Boutin, B. Hirel, M. Cren et mesdames M.L. Touraton, F. Maillier, Y. Roux et G. Cordillot qui m'ont apporté une aide précieuse à la mise en forme de ces articles.

Sommaire

Assimilation des nitrates : aspect historique	13
--	-----------

Assimilation du nitrate et de l'ammonium

1 - Sources et cycle de l'azote	21
Engrais azotés	21
Cycle de l'azote	22
Azote des sols	23
Assimilation de l'azote par les plantes	23
Bibliographie	25
2 - Transport du nitrate par la racine	27
Systèmes de transport et prélèvement du nitrate	28
Couplage énergétique de l'absorption du nitrate par la racine	31
Absorption de NO_3^- et couplage chimiosmotique	35
Devenir du nitrate	36
Régulation de l'absorption	38
Limites de l'absorption du nitrate au champ	39
Bibliographie	41
3 - Assimilation du nitrate : nitrate et nitrite réductases	45
Voie d'assimilation du nitrate chez les plantes supérieures	45
Structure et fonction de la nitrate réductase (NR) et de la nitrite réductase (NiR)	46
Génétique de la NR et de la NiR	51
Régulation de la NR et de la NiR	54
Aspect biotechnologique	62
Conclusion	63
Bibliographie	64
4 - Nutrition ammoniacale des plantes	67
Absorption et transport de NH_4^+	67

Nutrition ammoniacale et physiologie de la plante	74
Bibliographie	82
5 -Assimilation de l'ammonium	85
Assimilation de l'ammonium chez les plantes supérieures	85
La glutamine synthétase (GS)	91
La glutamate synthase (GOGAT)	97
Utilisation de mutants et de plantes transgéniques	100
Bibliographie	106
6 -Intégration de l'absorption du nitrate dans la plante	109
Mise en évidence de la régulation de l'absorption de NO_3^-	110
Signalétique feuille/racine et régulation de l'absorption de NO_3^-	115
Conclusion	125
Bibliographie	127

Assimilation symbiotique de l'azote

7 - Fixation symbiotique de l'azote	133
Organisation structurale et fonctionnelle	
des nodosités de légumineuses	133
Potentiel et limitation de la fixation biologique de l'azote	140
Conclusion	145
Bibliographie	145
8 - Signaux symbiotiques chez Rhizobium	149
Les étapes symbiotiques précoces	149
Les gènes <i>nod</i> contrôlent l'infection, la nodulation et la spécificité	
d'hôte	150
Les gènes <i>nod</i> déterminent la production de signaux extra-cellulaires	
reconnus par la plante	153
Les gènes <i>nod</i> communs et la synthèse du squelette lipo-	
oligosaccharidique	154
La nature des substituants détermine le spectre d'hôte de la souche	155
Sécrétion des facteurs Nod	158
Facteurs Nod et réponses des légumineuses	158
Perception des facteurs Nod par la plante et transduction du signal	159
Les lipo-chitoooligosaccharides : une nouvelle classe	
de régulateurs de croissance ?	161
Bibliographie	161
9 - Nitrogénase : aspects biochimiques, moléculaires et génétiques	163
Symbiose obligatoire et fixation à l'état libre	163
Structure et fonction de la nitrogénase	164

Caractérisation et organisation des gènes impliqués dans la fixation de l'azote symbiotique	167
Gènes de structure et de maturation du complexe nitrogénase (gènes <i>nif</i>)	168
Transfert des électrons sur la nitrogénase (gènes <i>nif</i> et <i>fix</i>)	169
Transcription des opérons <i>nif</i> et <i>fix</i> sous contrôle du gène régulateur <i>nifA</i>	170
Implication de systèmes à deux composants dans la régulation : exemple de NtrBC.	172
Gènes de régulation <i>fixLJK</i> chez <i>R. meliloti</i> : modèle de régulation de la fixation de l'azote pendant la symbiose	174
Régulation de la fixation de l'azote chez d'autres <i>Rhizobiaceae</i>	176
Bibliographie	177
10 - Assimilation de l'azote par les symbioses ectomycorhiziennes	179
Acquisition de l'azote	181
Réduction du nitrate	183
Assimilation de NH_4^+ chez les champignons ectomycorhiziens	185
Assimilation de NH_4^+ dans les ectomycorhizes	188
Conclusion	191
Bibliographie	192

Synthèse, transport des acides aminés et relations C/N

11 - Synthèse des acides aminés	199
Les acides aminés	199
Assimilation de l'ammonium, synthèse de glutamine, de glutamate et d'asparagine	203
Transamination	205
Synthèse des différentes familles d'acides aminés	205
Synthèse des uréides	216
Conclusion	216
Bibliographie	217
12 - Transport des acides aminés dans la plante	221
Acides aminés transportés	221
Transport des acides aminés au niveau cellulaire	225
Transport de composés particuliers	228
Transport à longue distance	229
Conclusion	232
Bibliographie	232

13 - Coordination entre métabolismes azoté, photosynthétique et respiratoire	235
Éclatement des métabolismes azoté et carboné entre	
les différents organites cellulaires	236
Métabolisme azoté et respiration	238
Métabolisme azoté et photosynthèse	239
Fourniture d' α -cétoglutarate, accepteur d'ammonium	240
Azote et métabolisme carboné	241
Modulation de l'activité des enzymes du métabolisme carboné	
par le nitrate et ses dérivés	242
Interactions carbone/azote étudiées à l'aide des plantes transgéniques	244
Bibliographie	246
 14 - Nutrition azotée (NO_3) et distribution du carbone	
dans la plante	249
Action du nitrate sur la croissance et l'expansion foliaire	250
Action du nitrate sur la croissance et la mise en réserve racinaires	254
Conclusion	258
Bibliographie.	258
 <i>Allocation de l'azote au cours de la croissance et du développement de la plante</i>	
15 - Méthodologie ^{15}N	265
La répartition isotopique	265
Méthodes analytiques de marquage isotopique	267
Méthodologie concernant le marquage	
par l'isotope stable de l'azote ^{15}N	268
Imagerie isotopique de l'azote	279
Bibliographie	280
 16 - Mobilisation des réserves azotées chez les plantes herbacées	281
Redistribution de l'azote au cours de la formation	
du grain (blé, maïs)	281
Mobilisation des réserves azotées au cours de la repousse	
des espèces fourragères	286
Conclusion	292
Bibliographie	293
 17 - Gestion de l'azote chez les espèces ligneuses	295
Cycle interne de l'azote	295
Composition des réserves végétatives	297
Localisation	299
Transport de l'azote	299

Allocation du carbone	301
Conclusion	302
Bibliographie	303
18 - Synthèse protéique dans les grains et les graines	307
Biosynthèse des protéines	307
Caractéristiques biochimiques et physiologiques des protéines de réserve	313
Régulation de l'expression des gènes de la biosynthèse des protéines	320
Influence des facteurs agroclimatiques sur la synthèse et l'accumulation des protéines	322
Rôle et intérêt des protéines des grains	323
Bibliographie	324
19 - La protéolyse chez les plantes supérieures : nature, fonction et régulation	327
Classification des protéases	329
Mécanismes de dégradation des protéines	331
Régulation de la protéolyse dans le métabolisme et le développement de la cellule végétale	341
Perspectives	348
Bibliographie	349
 <i>Azote : écophysiologie et agronomie</i> 	
20 - Nutrition azotée et croissance des peuplements végétaux cultivés	355
Accumulation d'azote et productivité d'un peuplement : teneur critique en azote	355
Distribution de l'azote dans le peuplement	358
Nutrition azotée et croissance d'un peuplement : principaux mécanismes	360
Un exemple de variabilité d'efficacité d'utilisation de l'azote	364
Conclusion	365
Bibliographie	366
21 - Azote : production agricole et environnement	369
La gestion de l'azote dans les systèmes de culture aujourd'hui	370
Quelques questions pour l'avenir	372
Conclusion	379
Bibliographie	379
22 - Azote et pollution	381
Principaux flux d'azote à l'origine des pollutions	383

Variabilité des flux polluants et maîtrise par les agriculteurs	385
Vers une agriculture moins polluante	398
Bibliographie	399
Glossaire	403
Index	413
Listes des auteurs	419

Assimilation des nitrates : aspect historique

J.-F. Morot-Gaudry

La nutrition des plantes intéresse l'homme depuis l'antiquité. Aristote suppose que les plantes reçoivent directement du sol une « nourriture élaborée » qui leur permet de croître et de se développer. Au ^{xvi}^e siècle, Palissy semble acquérir une notion assez claire du rôle des « sels » sur la vie des végétaux, mais ses observations et ses remarques de bon sens sont vite oubliées. Au ^{xvii}^e siècle, Malpighi suggère que les feuilles jouent un rôle dans la transformation des substances nutritives reçues des racines. Mariotte postule que « les principes des plantes sont des recombinaisons de principes plus simples tirés du sol » (Carles, 1967).

A la fin du ^{xviii}^e siècle, Hassenfratz, Thaer, émettent la fameuse « théorie de l'humus » selon laquelle les plantes tirent du sol les substances organiques nécessaires à leur croissance. Les éléments minéraux de l'humus ne seraient que des impuretés sans intérêt. Ce n'est qu'en 1840 que von Liebig, utilisant les travaux de de Saussure et de Boussingault, ruine la théorie de l'humus et établit enfin le caractère purement minéral de l'alimentation des plantes. Ces travaux sont confirmés par Raulin, Sachs, Ville, Knop. Entre 1840 et 1870, ces chercheurs réalisent des cultures de plantes sur milieu hydroponique artificiel et montrent le rôle primordial des racines dans l'absorption de l'azote, du phosphore, du potassium et des autres éléments minéraux (Boulaine, 1990). Il faut attendre le début du siècle pour montrer que le nitrate peut être réduit en nitrite et ammonium par les extraits végétaux. En 1924, Anderson observe que la teneur en nitrate des plantes varie en fonction des conditions de croissance. Les extraits de pomme de terre contiendraient un « mécanisme » thermolabile capable de réduire le nitrate en nitrite. La même année, Eckerson observe également que des extraits de tomate sont capables de réduire le nitrate en présence de glucides, aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, mais en absence d'oxygène. En 1937, Nightingale présente une revue très complète sur le métabolisme azoté chez les plantes. Il décrit comment est stocké et réduit le nitrate dans les différents organes végétaux. Il montre comment les facteurs externes (pH du milieu, éclairciment, température, environnement ionique...) et

les facteurs internes (pH cellulaire, teneurs en glucides, état de croissance et de développement...) régulent le métabolisme azoté chez les plantes. Il présente également une excellente analyse de la nutrition nitrique comparée à la nutrition ammoniacale. En 1943, Bårstom complète ces approches en soulignant le rôle essentiel de la lumière dans le mécanisme de réduction du nitrate.

En 1951, Delviche utilise l'isotope lourd ^{15}N de l'azote pour étudier l'assimilation du nitrate par des plants de tabac. C'est à partir de cette époque que sont entrepris les premiers travaux d'extraction, de purification et de caractérisation de la nitrate réductase. Evans et Nason, en 1953, confirment que le nitrite est bien un intermédiaire de la réduction du nitrate et que le processus de réduction est enzymatique, faisant intervenir la nitrate réductase à pyridine nucléotide. Cette enzyme est décrite par Nicholas et Nason en 1955. Entre les années 60-70, de nombreuses approches biochimiques menées par exemple par l'équipe de Hageman (Hageman 1960 ; Schrader *et al.* 1968) et de Losada (Losada 1975) permettent de caractériser biochimiquement l'enzyme et de comprendre sa régulation.

A partir de 1980, les approches immunologiques (Smarelli et Campbell 1981 ; Chérel *et al.* 1985) sont le préalable nécessaire aux études moléculaires qui vont se développer. Les premiers ARN messagers seront isolés par Crawford *et al.* (1986), Cheng *et al.* (1986), Commere *et al.* (1986). Ces travaux permettront une avancée prodigieuse des connaissances sur la structure et la régulation de cette enzyme, présente en très faible quantité dans les tissus végétaux et de surcroît très labile.

Bibliographie

- ANDERSON V.L., 1924 - Some observations on the nitrate-reducing properties of plants. *Ann. Bot.*, **38**, 699-706.
- BOULAIN J., 1990 - Deux siècles de fertilisation minérale. In *Deux siècles de progrès pour l'agriculture et l'alimentation*. Ed. Académie d'Agriculture de France, Technique et Documentation Lavoisier, Paris, **14**, 131-145.
- BÅRSTROM H., 1943 - *Photosynthesis and assimilation of nitrate by wheat leaves*. Ann. Agr. Coll., Sweden, **11**, 1-50.
- CARLES J., 1967 - *La nutrition de la plante*. Que sais-je ? Presses universitaires de France, Paris, 128 p.
- CHENG C.L., DEWDNEY J., KLEINHOF A., GOODMAN H.M., 1986 - Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *P. N. Acad. Sci. USA*, **83**, 6825-6828.
- CHÉREL I., GROSCLAUDE J., ROUZÉ P., 1985 - Monoclonal antibodies identify multiple epitopes on maize leaf nitrate reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 685-691.
- COMMERE B., CHÉREL I., KRONENBERGER J., GALANGAU F., CABOCHE M., 1986 - *n vitro* translation of nitrate reductase messenger RNA from maize and tobacco and detection with an antibody directed against the enzyme of maize. *Plant Science*, **44**, 191-203.
- CRAWFORD N.M., CAMPBELL W.H., DAVIS R.W., 1986 - Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. *P. N. Acad. of Sci., USA*, **83**, 8073-8076.
- DELVICHE C.C., 1951 - The assimilation of ammonia and nitrate ions by tobacco plants. *J. Biol. Chem.*, **189**, 167-175.
- ECKERSON S.H., 1924 - Protein synthesis by plants. I. Nitrate reduction. *Bot. Gaz.*, **77**, 377-390.

- EVANS H.J., NASON A., 1953 - Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.*, **8**, 233-254.
- HAGEMAN R.H., FLESHER D., 1960 - Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiol.*, **35**, 700-708.
- LOSADA M., 1975 - Metalloenzymes of the nitrate-reducing system. *J. Mol. Catal.*, **1**, 245-264.
- NICHOLAS D.J.D., NASON A., 1955 - Role of molybdenum as a constituent of nitrate reductase from soybean leaves. *Plant Physiol.*, **30**, 135-138.
- NIGHTINGALE G.T., 1937 - The nitrogen nutrition of green plants. *Bot. Rev.*, **3**, 86-174.
- SCHRADER L.E., RITENOUR G.L., EILRICH G.L., HAGEMAN R.H., 1968 - Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. *Plant Physiol.*, **43**, 930-940.
- SMARRELLI J., CAMPBELL W.H., 1981 - Immunological approaches to structural comparisons of assimilatory nitrate reductases. *Plant Physiol.*, **68**, 1226-1230.

Assimilation du nitrate et de l'ammonium

