

> Absorption et assimilation de l'azote minéral chez les Végétaux (2 h)

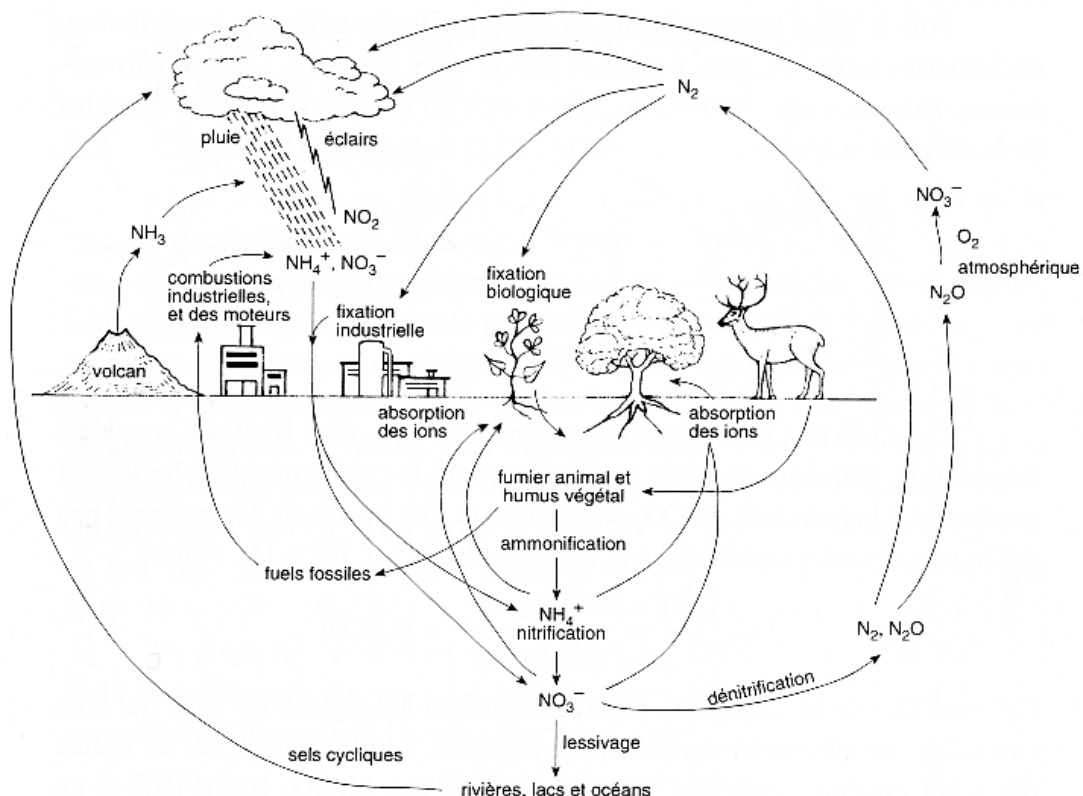
I – CYCLE et DISPONIBILITE POUR LES PLANTES de l'AZOTE (N)

1°) A l'aide de votre cours, sur une page, vous construirez le cycle de l'azote. Vous ferez apparaître :

- Les **molécules azotées** : diazote ( $N_2$ ), nitrates ( $NO_3^-$ ), nitrites ( $NO_2^-$ ), ammonium ( $NH_4^+$ ), ammoniac ( $NH_3$ ), oxydes d'azote gazeux (oxyde nitreux  $N_2O$ , monoxyde d'azote  $NO$ , dioxyde d'azote  $NO_2$ ), composés organiques azotés (aa, protéines, ...), déchets azotés (urée), ...
- Les **étapes** : fixation (biologique, physique, anthropique), assimilation (réduction), ammonification (minéralisation), nitrification (nitratation, nitritation), dénitrification, lessivage, ...
- Les **acteurs** : nodosités et diazotrophes (*Rhizobium*, *Clostridium*, *Cyanophycées*, *Azotobacter*), éclairs/pluie/ $O_2$ , bactéries chimolithotrophes dénitrifiantes (*Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Paracoccus*), bactéries chimolithotrophes nitrifiantes nitreuses (*Nitrobacter*), bactéries chimolithotrophes nitrifiantes nitriques (*Nitrosomonas* et *Nitrospira*), végétaux et microorganismes, animaux, champignons et bactéries décomposeurs, fumées industrielles/feux de forêts/émission volcaniques ...
- Les **outils** : nitrogénase, nitrate réductase, nitrite réductase, GS-GOGAT, protéase, uréase, ...
- Les **compartiments** : atmosphère, sol, végétal, animal, ...
- Les **conditions des étapes** : sol aéré/mal aéré, sol acide/basique, anaérobie stricte ou facultative.

Vous pourrez également indiquer les rendements de fixation, le taux de diazote atmosphérique, ...

Doc A : Cycle de l'azote.

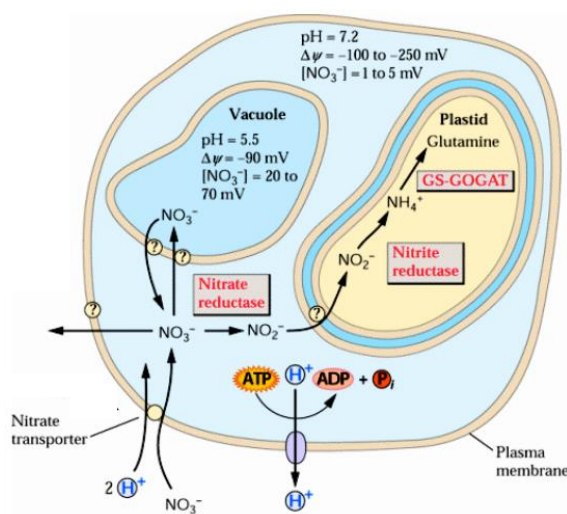


2°) A l'aide de vos connaissances et de la question précédente, vous expliquerez pourquoi l'azote est un nutriment qui limite souvent la croissance de la plante par sa faible disponibilité. Vous distinguerez le cas de l'ammonium de celui des nitrates. Votre réponse comportera le terme « complexe argilo-humique » et n'abordera pas la fixation de l'azote atmosphérique.

## II – ABSORPTION ET ASSIMILATION DU NITRATE CHEZ LES PLANTES

1°) A l'aide d'une *méthode appropriée*, présentez les mécanismes utilisés par les plantes pour absorber et transporter le nitrate.

**Doc B :** Schéma d'assimilation de l'azote chez les plantes : absorption racinaire du nitrate, stockage vacuolaire et réduction en nitrite et ammonium, synthèse des acides aminés et exportation. Sur la membrane plasmique qui entoure la cellule, sont localisés une pompe à protons ( $H^+/ATPase$ ) et un transporteur de nitrate (symport). L'absorption du nitrate représente généralement 25% de la respiration racinaire. *GOGAT = Glutamate synthase ; GS = Glutamine synthase.*



**Doc C :** Les systèmes d'absorption et de transport du nitrate.

La concentration en nitrate des sols peut varier de plusieurs ordres de grandeur, de quelques micromolaires ( $\mu M$ ) à plusieurs millimolaires ( $mM$ ). Les plantes ont ainsi développé des systèmes d'absorption adaptés aux différentes concentrations rencontrées. Les études des cinétiques d'absorption du nitrate marqué ( $^{15}NO_3^-$ ) en fonction de la concentration en nitrate externe ont mis en évidence dans les racines deux systèmes de transport, l'un à haute et l'autre à basse affinité.

### - Un système de transport à haute affinité (HATS ou High Affinity Transport System)

Pour des concentrations inférieures à 0,2-500  $\mu M$  de nitrate extérieur, l'influx de nitrate est essentiellement assuré par un système de transport à haute affinité, saturable au-delà de 200  $mM$ . La particularité de ce système est de présenter deux composantes : l'une constitutive (cHATS) et l'autre inducible (iHATS).

En effet, lorsque les plantes n'ont jamais été cultivées en présence de nitrate, l'activité du HATS est caractérisée par une très forte affinité pour le nitrate ( $K_m$  de 6 à 20  $\mu M$ ), mais une faible capacité de transport ( $V_{max}$  de 0,13 à 1,3  $\mu mol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$  de matière fraîche), il s'agit de la **composante constitutive du HATS**.

Lorsque les plantes sont mises en présence de nitrate, une deuxième composante du transport est induite, la capacité de transport du HATS est alors multipliée par 50. La **composante inducible du HATS** est caractérisée par une affinité pour le nitrate plus faible ( $K_m$  de 13 à 79  $\mu M$ ) mais une capacité de transport supérieure ( $V_{max}$  à 9,41  $\mu mol \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$  de matière fraîche).

**Doc C :** Les systèmes d'absorption et de transport du nitrate (suite)

Il a été proposé que le système constitutif participe au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il permettrait à la concentration de nitrate cytoplasmique, régulée par la concentration de nitrate vacuolaire (rôle tampon de la vacuole), d'atteindre un seuil nécessaire à l'induction du second système de transport, le système inductible (iHATS). Les plantes disposeraient alors, pour de faibles concentrations en nitrate extérieur, d'un système d'absorption avec une forte capacité, donc très efficace.

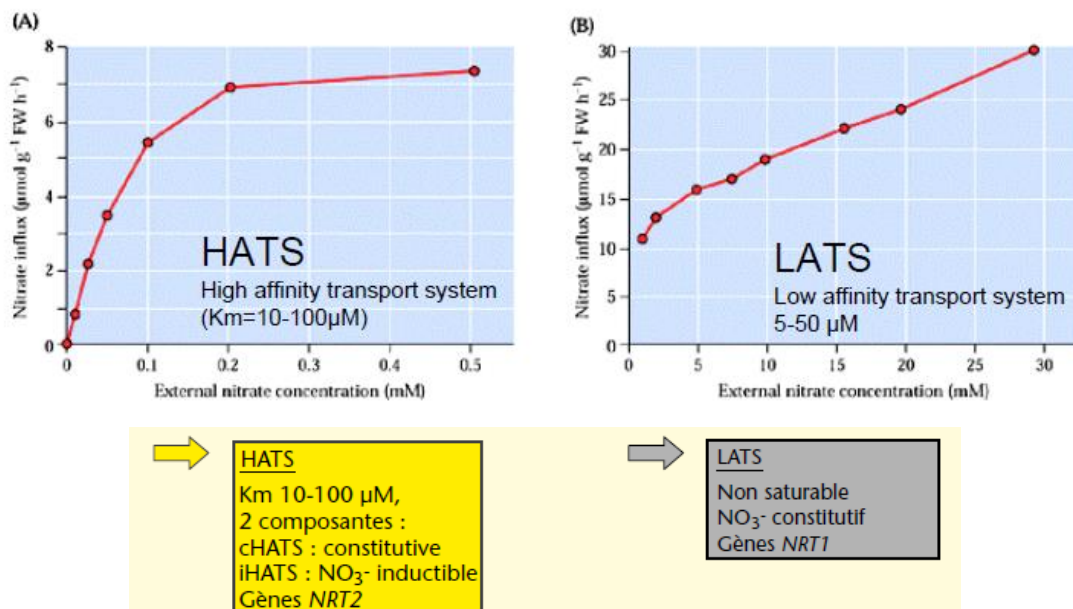
- **Un système de transport à basse affinité (LATS ou Low Affinity Transport System)**

Au-delà de 200-500  $\mu\text{M}$  de nitrate externe, un système de transport à faible affinité entre en jeu. Ce système est non saturable jusqu'à 50 mM de nitrate. Il est quantitativement majoritaire pour l'absorption du nitrate à partir de 1 mM. Il peut être considéré comme non inductible par le nitrate, mais est cependant sujet à certaines régulations.

**Énergétique du transport**

L'utilisation d'inhibiteurs métaboliques a montré que les systèmes de transport du nitrate à haute et basse affinité nécessitent de l'énergie. Le coût énergétique global de l'absorption du nitrate chez l'orge avoisine 1 à 3 moles d'ATP pour une mole de nitrate absorbé, soit 10 % à 20 % du coût énergétique total de l'assimilation du nitrate. Le mécanisme envisagé est un système de transport actif secondaire. L'absorption du nitrate entraîne en général une **alcalinisation du milieu extérieur**, ce qui suggère que des protons pénètrent dans la cellule en même temps que les ions  $\text{NO}_3^-$ , ou bien que ces derniers sont échangés contre des ions  $\text{OH}^-$ , ce qui revient au même. Les études électrophysiologiques ont montré de plus que le transport de nitrate est associé à une **dépolarisation membranaire**, le système est donc électrogène. Il est admis que l'absorption du nitrate est due à un cotransport  $\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  (symport) dont la stœchiométrie serait de  $2(\text{H}^+) : 1\text{NO}_3^-$ .

**Doc D :** Evolution de l'influx de nitrate transmembranaire en fonction de la concentration externe en nitrate pour le ST à forte affinité (gauche) et à faible affinité (droite).



2°) D'après votre cours et les documents ci-dessus, quels sont les facteurs qui régulent l'influx de nitrate au sein de la plante ? Quels mécanismes sont mis-en jeu ?

3°) A partir du **doc B** et du document ci-dessous, vous indiquerez avec un moyen *approprié* la localisation des différentes étapes de l'assimilation de l'azote, à l'échelle de la cellule et de l'organe.

**Doc E** : Répartition de l'activité nitrate réductase chez quelques espèces végétales

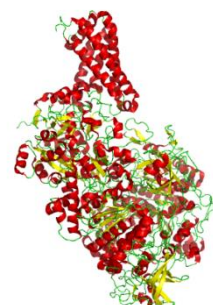
Localisation	Espèces végétales	Références
Préférentiellement dans les racines	<i>Lupinus angustifolius</i>	Harper et Gibson (1984)
	<i>Pinus nigra</i>	Martin <i>et al.</i> (1981)
	<i>Erica tetralix</i>	Troelstra <i>et al.</i> (1995)
À la fois dans les racines et dans les feuilles	<i>Alnus glutinosa</i>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

3°) Après avoir pris connaissance des documents suivants :

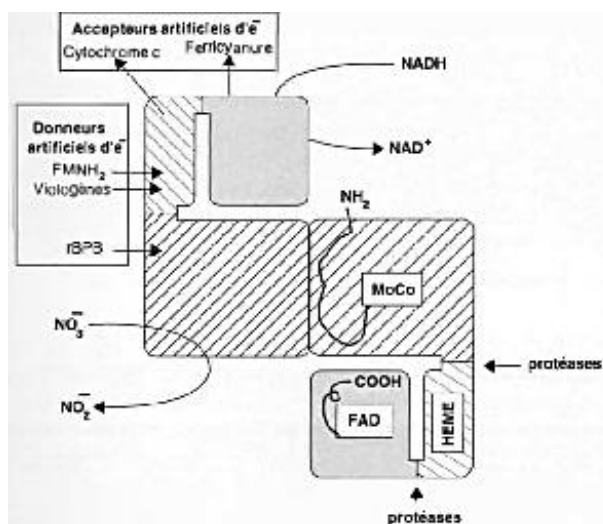
- Vous écrirez les équations des différentes étapes de la réduction du nitrate en ammonium ;
- Vous mettrez en évidence la consommation d'énergie qui en résulte ;
- Vous représenterez la structure des deux enzymes impliquées sous forme de schéma.

**Doc F** : La nitrate réductase (NR).

La NR est une enzyme soluble qui catalyse la réduction du nitrate en nitrite par le transfert de deux électrons du NADH (ou du NADPH) au nitrate. La NR à NADH est une enzyme homodimérique qui peut former des tétramères à haute concentration chez la chlorelle et quelques plantes supérieures. Les monomères de masse moléculaire de 100 à 110 kDa sont liés entre eux par un pont disulfure pouvant être réduit sans perte d'activité. Trois cofacteurs sont liés à chaque monomère : la flavine adénine dinucléotide (FAD), l'hème (cytochrome b557) et le cofacteur à molybdène (Mo-co). Chaque groupement prosthétique définit un domaine fonctionnel. Les trois domaines avec leur groupement prosthétiques, FAD-hème-Mo-co dans l'ordre, permettent le transfert des deux électrons provenant du NADH au nitrate.

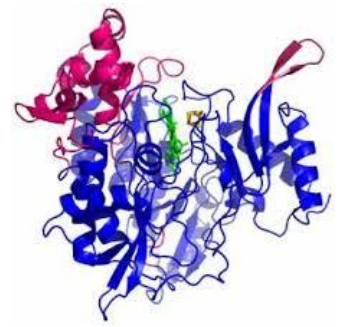


**Doc G** : Modèle structural de la NR des plantes supérieures et activités partielles associées (d'après Caboche et Roazé, 1990). Mo-co : cofacteur à molybdène ; rBPB : bleu de bromophénol réduit ; NH<sub>2</sub> : extrémité protéique N-terminale ; COOH : extrémité protéique C-terminale ; FMNH<sub>2</sub> : flavine mononucléotide.

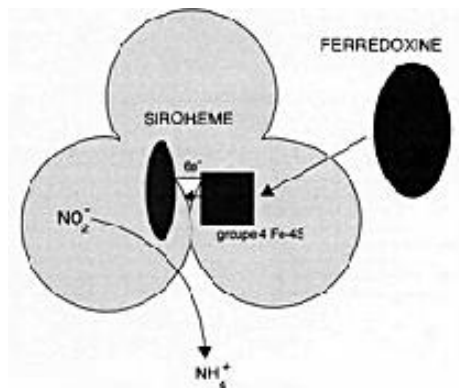


**Doc H : La nitrite réductase (NiR).**

La nitrite réductase catalyse la réduction du nitrite en ammonium avec l'apport de six électrons. L'enzyme est localisée dans les chloroplastes des feuilles vertes et dans les proplastides des racines (Kleinhofs et Warner, 1990). Il s'agit d'une enzyme monomérique d'une masse moléculaire de 60-64 kDa avec un groupement prosthétique de type sirohème et un groupement 4Fe-4S comme centre actif. Le sirohème est une tétrahydroporphyrine à fer ferreux avec 8 chaînes latérales contenant des acides carboxyliques. Le donneur d'électrons physiologique dans les tissus photosynthétiques est la ferrédoxine. Pour les racines, le donneur d'électrons est une protéine de type ferrédoxine qui est réduite par une pyridine nucléotide réductase au moyen d'électrons provenant du cycle des pentoses phosphates.

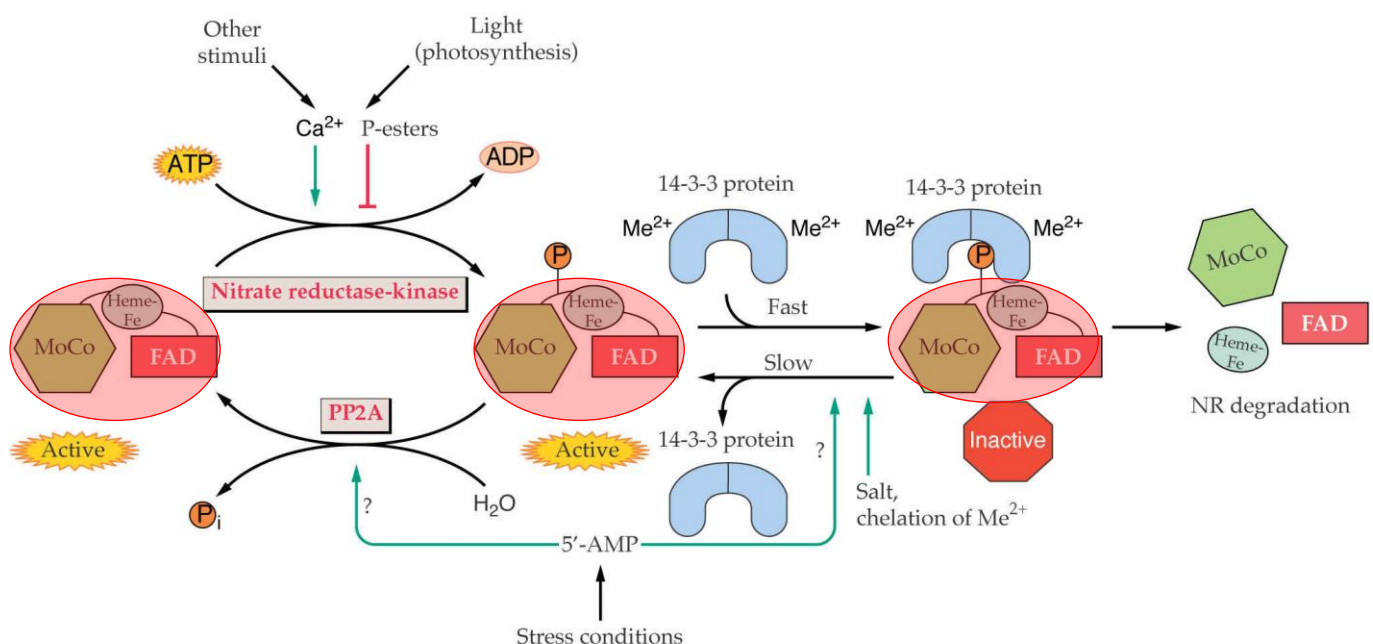


**Doc I : La nitrite réductase (NiR).** Par analogie avec la sulfite réductase, dont la structure est connue, la NiR pourrait avoir une forme trilobée, contenant en son centre les deux groupements prosthétiques de l'enzyme qui assurent le transfert d'électrons de la ferrédoxine vers le nitrite.



5°) A l'aide de votre cours et du document suivant, vous expliquerez quels sont les facteurs régulant l'activité de la NR et de la NiR et quels mécanismes sont utilisés par la plante pour cette régulation.

**Doc I : Mécanisme d'inhibition par phosphorylation/déphosphorylation de la nitrate réductase.** Légende : 14-3-3 protein, inhibiteur de la NR. La NR est entourée en rouge.



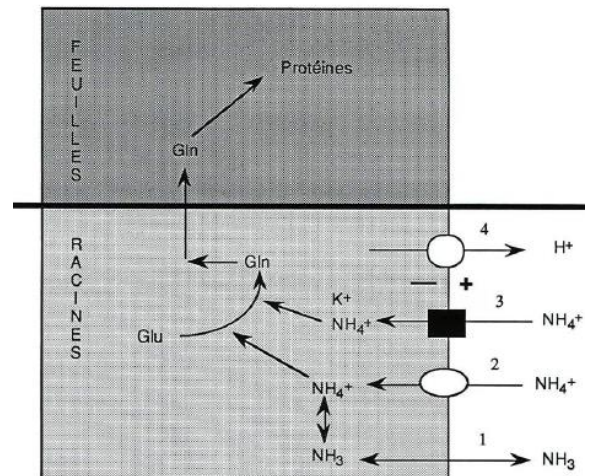
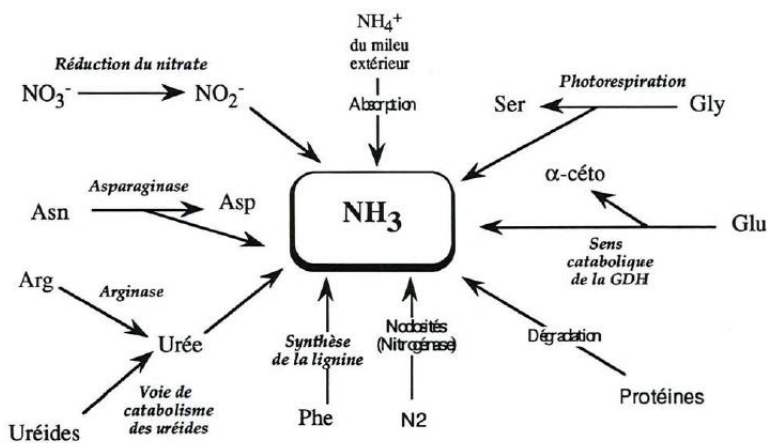
### III – ORIGINE DE L'AMMONIUM DANS LA PLANTE

1°) Pourquoi peut-on affirmer que l'ammonium a de multiples origines dans la plante ?

**Doc J :** Origine de l'ammonium au sein de la plante.

*A gauche :* Représentation schématique des provenances possibles de l'ion ammonium dans une plante.

*A droite :* Mécanismes possibles de l'absorption et d'assimilation de l'ammonium dans les racines (d'après Ninne man *et al.*, 1994). En 1, une diffusion simple ; 2, un uniport spécifique ; 3, un canal à  $K^+$  qui peut permettre l'absorption d'ammonium ; 4,  $H^+$ -ATPase reliée au métabolisme afin de générer un potentiel membranaire qui permet le passage des ions ammonium dans les cellules.

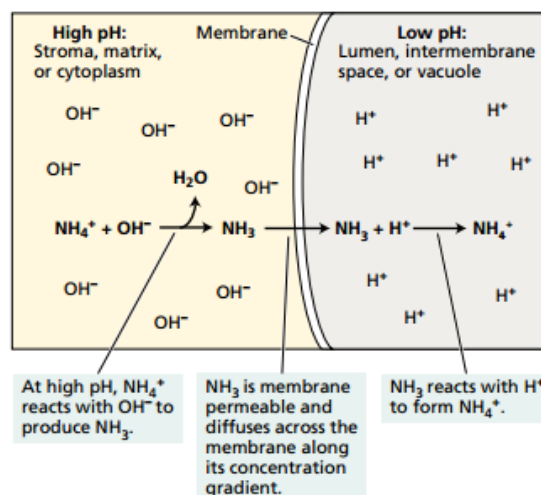


### IV – ASSIMILATION DE L'AMMONIUM : le CYCLE GS-GOGAT

1°) Pourquoi l'ammonium doit-il être rapidement assimilé (ou stocké dans la vacuole) après absorption ?

**Doc K :** La toxicité du  $NH_4^+$  peut dissiper les gradients de pH.

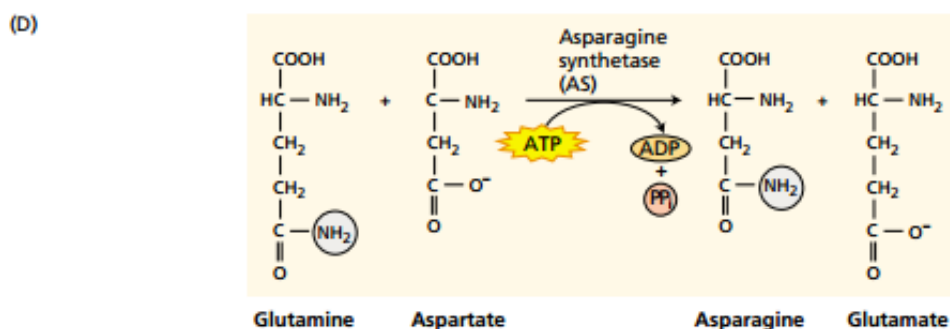
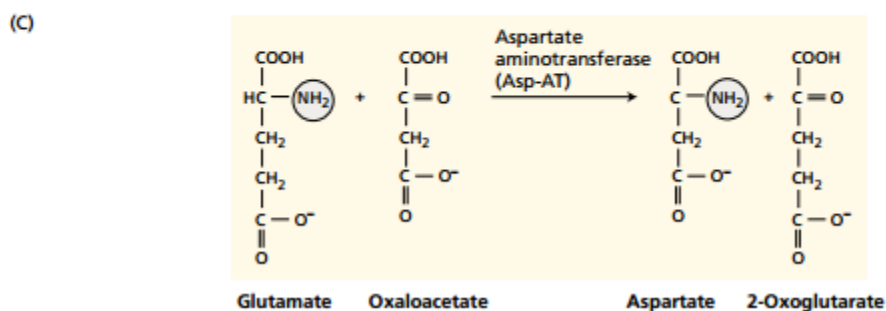
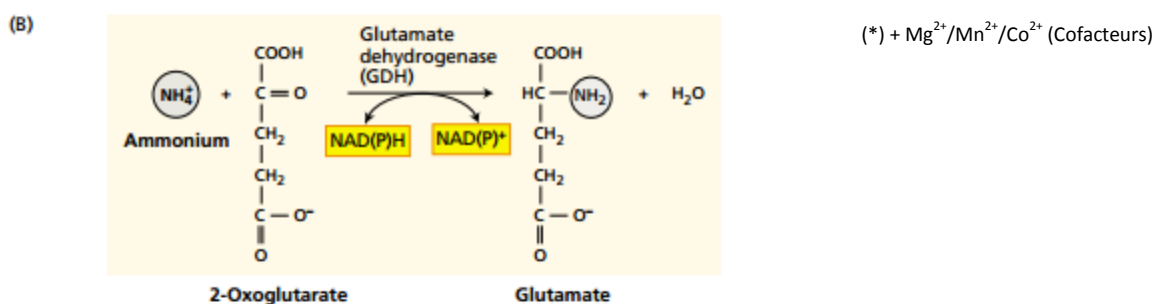
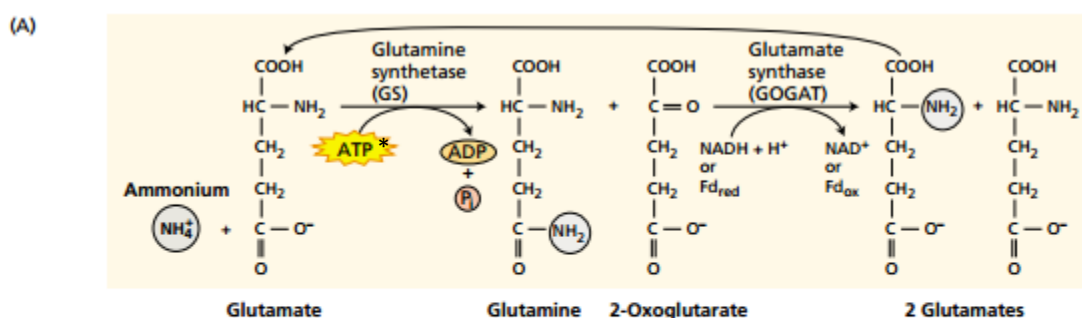
La partie gauche de la figure représente le stroma, la matrice ou le cytoplasme, où le pH est élevé ; la partie droite de la figure représente le lumen, l'espace intermembranaire ou le suc vacuolaire, où le pH est faible ; la membrane représente le thylakoïde, la membrane interne ou le tonoplaste pour un chloroplaste, une mitochondrie ou une cellule racinaire, respectivement. Le résultat net de la réaction illustrée ici est que la concentration en  $OH^-$  de la partie gauche et que la concentration en  $H^+$  de la partie droite ont toutes deux diminué ; ainsi, le gradient de pH a été dissipé (d'après Bloom, 1997).



2°) Ecrivez les équations des réactions schématisées ci-dessous. En vous aidant de votre cours, vous préciserez la localisation de ces réactions. Pourquoi la plante oriente-elle son métabolisme azoté vers la voie GDH (B) plutôt que vers la voie GS-GOGAT (A) quand la concentration en ammonium augmente ?

**Doc L :** Structure et voies métaboliques des composés impliqués dans le métabolisme de l'ammonium.

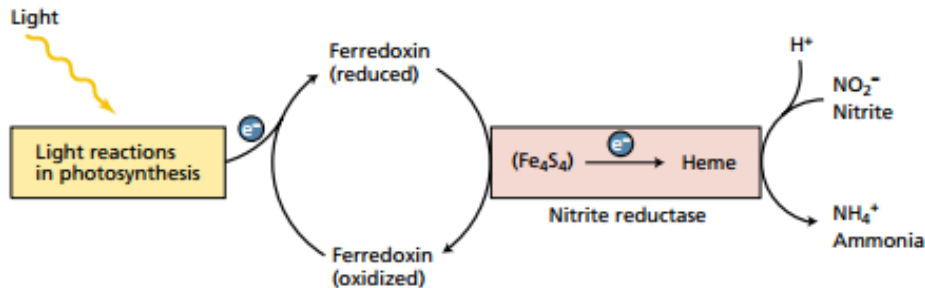
L'ammonium peut être assimilé par un des processus suivants. (A) La voie cyclique GS-GOGAT forme de la glutamine et du glutamate. Un cofacteur réduit est nécessaire pour la réaction : la ferrédoxine pour les feuilles vertes et le NADH dans les dans les tissus non photosynthétiques. (B) La voie GDH forme du glutamate en utilisant du NADH ou du NADPH comme pouvoir réducteur. (C) Transfert du groupe amine du glutamate à l'oxaloacétate pour former l'aspartate (catalysée par l'aspartate aminotransférase). (D) Synthèse de l'asparagine par transfert d'un acide aminé du glutamine à l'aspartate (catalysée par l'asparagine synthase).



## V – BILAN ENERGETIQUE DE LA NUTRITION AZOTEE et COUPLAGE METABOLIQUE

1°) Selon vous, d'où provient le pouvoir réducteur utilisé dans le métabolisme azoté ?

**Doc M :** Modèle du couplage entre flux d'électrons photosynthétique et réduction du nitrite par la nitrite réductase, via la ferrédoxine. L'enzyme contient deux groupements prosthétiques, un centre  $[4Fe, 4S]$  et un hème, qui participent à la réduction du nitrite en ammonium.



2°) Finalement, est-il plus « rentable » pour la plante d'absorber le nitrate ou l'ammonium ? Le métabolisme azoté a-t-il pour principale finalité le stockage d'énergie ?

**Doc N :** Résumé des processus impliqués dans l'assimilation de l'azote minéral dans la feuille.

Le nitrate transloqué depuis les racines à travers le xylème est absorbé par une cellule du mésophylle via un symport  $NO_3^-/H^+$  (NRT). Il est réduit en nitrite dans le cytoplasme grâce à la nitrate réductase (NR). Le nitrite est transporté dans le stroma du chloroplaste avec un proton. Dans le stroma, le nitrite est réduit en ammonium via la nitrite réductase (NiR) et l'ammonium est converti en glutamate via une séquence catalysée par la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT). Une fois dans le cytoplasme, le glutamate est transaminé en aspartate via l'aspartate aminotransférase (Asp-AT). Finalement, l'asparagine synthétase (AS) convertit l'aspartate en asparagine. La consommation énergétique en équivalent ATP est donnée pour chaque réaction (on forme des composés à forte énergie à partir de composés à faible énergie).

