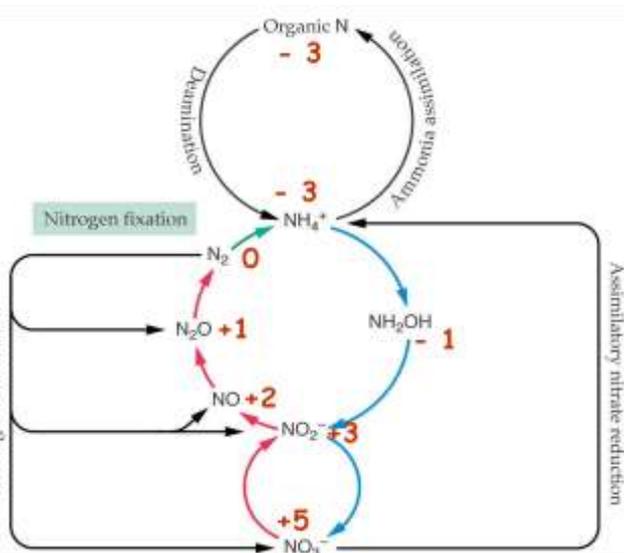


Azote contenu dans

- ADN : la base Adénosine (A) contient 5 N et forme l'ATP → intervention dans l'énergie cellulaire
- protéines : liaison peptidique NH<sub>2</sub>-C=O
- phosphodolcholine
- NAD/NADH → maintien du pouvoir réducteur
- hormones végétales cytokinines (division cellulaire) et auxines (élongation cellulaire)
- chlorophylles : noyau tétrapyrol de 4 azotes qui entourent un Mg, suivi d'une chaîne de carbone.
- Phe → lignine } composants du métabolisme secondaire
- Flavonoïdes }

Une carence en Azote, qui est un des 17 éléments essentiels de la plante, entraîne la récupération d'azote des feuilles âgées jusqu'à ce qu'elle ne puisse plus le faire : c'est la chlorose généralisée avec affaiblissement de la plante et floraison précoce.

## I. Le cycle de l'azote

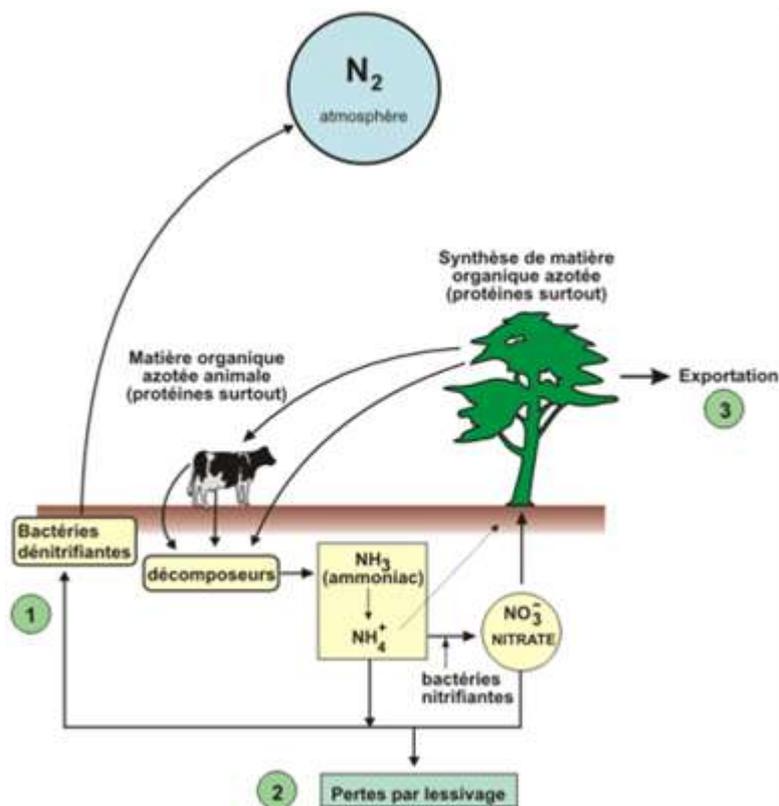


Les plantes ne peuvent pas utiliser l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>). L'azote est assimilé par les racines sous forme de nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou, parfois, d'ions ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Ces ions proviennent de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol.

L'azote ne peut pas se recycler à 100%. Il y a toujours des pertes :

- Bactéries dénitrifiantes (1)

Certaines bactéries du sol, dans certaines conditions, peuvent transformer l'azote minéral des sols (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) inutilisable par les plantes. Ces bactéries sont généralement à *anaérobie facultative*. Leur activité dénitrifiante est inhibée par l'oxygène. Tant que le sol est bien aéré, elles ont peu de chances de se développer. Mais si le sol est inondé (donc privé d'oxygène) il peut alors rapidement perdre ses engrais azotés.



- Lessivage de l'azote minéral (2)

Si le sol retient mal l'eau, l'azote minéral peut être entraîné en profondeur vers les nappes d'eau souterraines ou vers les cours d'eau avoisinants. Car l'ammonium aura tendance à rester dans les sols basiques (car chargé positivement) alors que les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) aura tendance à être éliminé (car chargé négativement).

- Matière végétale ou animale exportée (3)

Toute matière vivante qui est enlevée du milieu ne sera pas recyclée en engrais azoté. C'est le cas en agriculture ou lorsqu'on déboise une forêt.

## 1) La réduction de l'azote

Fixation de l'azote = Transformation de l'azote gazeux ( $\text{N}_2$ ) en azote assimilable par les plantes (ammoniac)

L'apport en azote peut venir de plusieurs sources :

- **Géochimique (10 % de l'azote atmosphérique)**

Les éclairs génèrent du diazote de l'Oxygène radical qui, ensemble, donnent de l'oxyde nitreux, puis du nitrite, par réaction avec l'ozone.

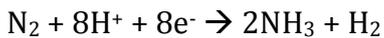
- **Industrielle (30 %) :**

L'engrais peut être synthétisé par le procédé Haber-Bosh :  $\text{N}_2 + 3\text{H}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$  à  $500^\circ\text{C}$  et 300atm. Le dihydrogène est produit à partir de gaz naturel ( $\text{CH}_4$ ).

Le processus nécessite de l'énergie et libère du gaz carbonique.

- **Biologique (60 %)**

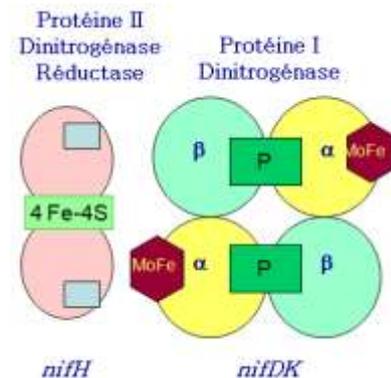
Elle est due aux cyanobactéries/proteobactéries pouvant transformer l'azote atmosphérique en ammoniac. Plusieurs de ces microorganismes vivent à la surface des racines des plantes ou même dans les tissus de certains végétaux. L'ammoniac est rapidement transformé en nitrates par les bactéries du sol.



Cette réaction utilise 16 ATP et se fait par la nitrogénase, un complexe enzymatique en deux parties Dinitrogénase (prot I) et Dinitrogénase réductase (prot II). Seuls les procaryotes sont capables de synthétiser la nitrogénase.

La Dinitrogénase est composée de 4 sous-unités, 2  $\alpha$  et 2  $\beta$ , reliées par un cluster P. Le cœur d' $\alpha$  est un noyau Fer-Molybdène = métal qui peut être à l'état réduit ou oxydé.

La DR récupère des électrons de la Ferrédoxine, et par l'intermédiaire du groupement Fe-S, les donne à la Dinitrogénase, en s'attachant à celle-ci par hydrolyse d'ATP puis elle s'en dissocie une fois les électrons transférés. Il faut faire ce procédé 8 fois pour transformer le  $\text{N}_2$ .

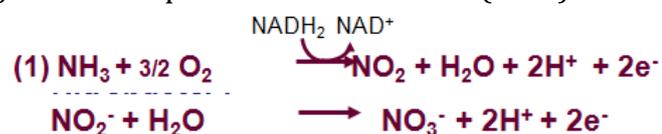


## 1) La Nitrification = oxydation du $\text{NH}_4^+$ et du $\text{NO}_3^-$

Labourage → aération des sols (neutres ou pH un peu élevée) et si la température est suffisante ( $25^\circ\text{C}$ ) alors le  $\text{NH}_3$  peut être oxydé en  $\text{NO}_2^-$

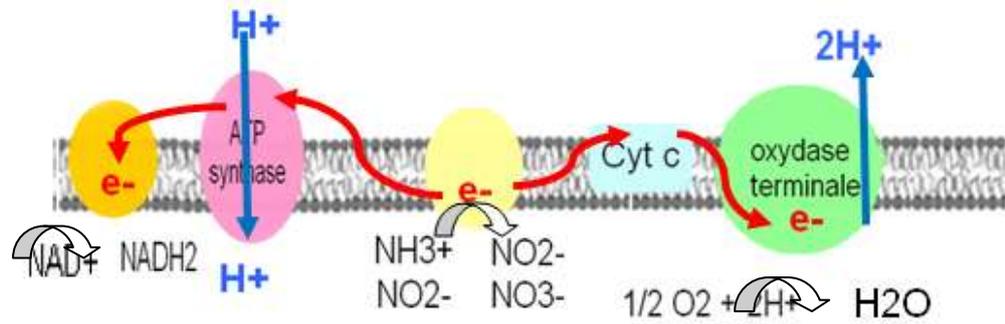
- par les bactéries Nitrosomonas c'est la nitritation (1) :

- par les bactéries Nitrobacter, c'est la nitratisation (2):



Dans ce cas, le nitrate/nitrite donne des électrons à la chaîne respiratoire aérobie  
 →Création d'un gradient de proton.

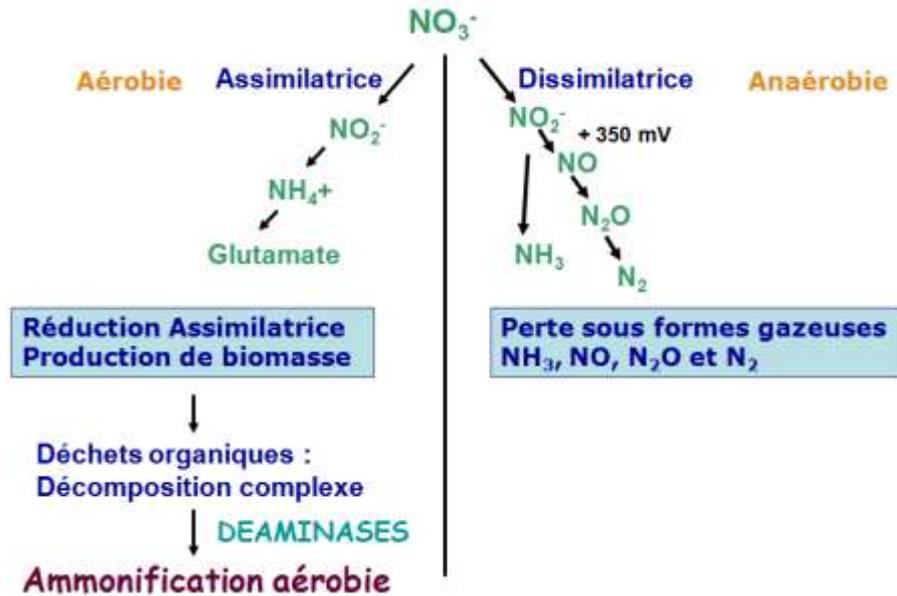
⚠ Le flux d'électrons chez ces bactéries est inversé par rapport aux plantes.



## 2) La dénitrification

### L'ammonification aérobie

Comme les bactéries, les plantes sont capables d'utiliser le nitrate comme source d'azote, en en faisant de l'ammonium, assimilé ensuite sous forme de glutamate : c'est la réduction assimilatrice produisant la biomasse, qui, au bout d'un moment, subira une décomposition (déchets) faite en partie par les champignons, et cette matière va se minéraliser. C'est alors l'ammonification aérobie qui va régénérer le cycle (clivage de l'ammonium par les organismes concernés à la déaminase). Le nitrate qui n'est pas utilisé est lessivé.



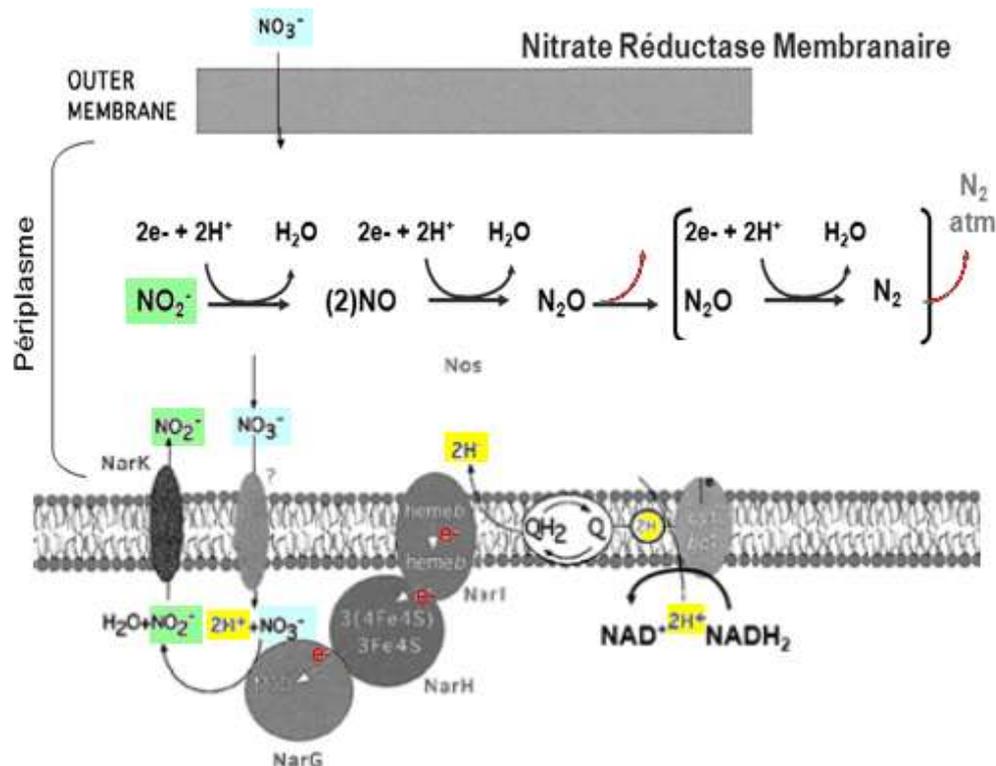
### L'ammonification anaérobie : Réduction du nitrate (NO3-) en nitrite (NO2-)

⚠ CHEZ DES BACTERIES DENITRIFIANTES

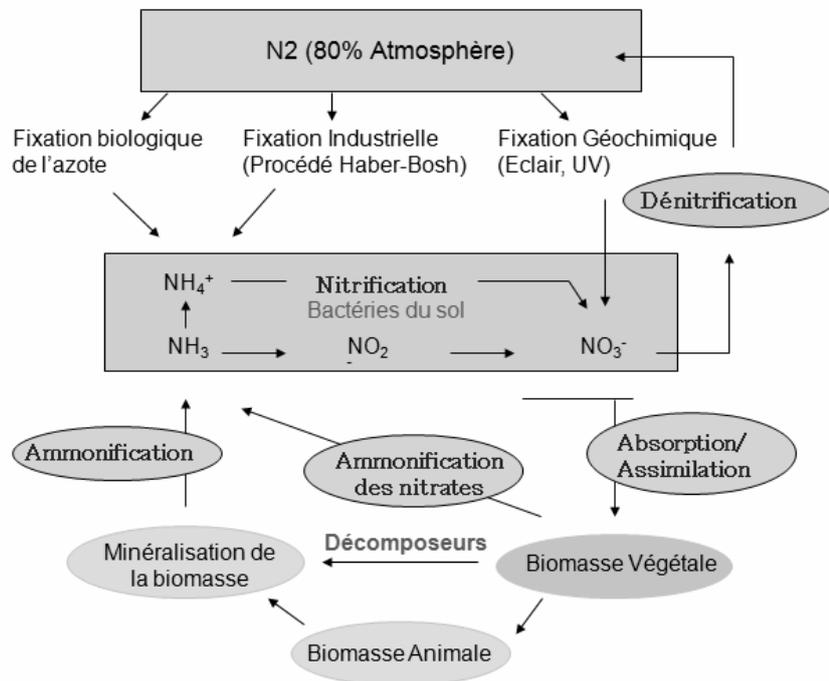
Dans ces conditions d'oxygène limitant, il y a mise en place de chaînes respiratoires alternatives utilisant les NO3- comme accepteur final. Celui-ci passe la membrane externe, puis, empruntant un canal, la membrane interne.

Pendant ce temps, un cytochrome b/c1 récupère les électrons du pouvoir réducteur, et les envoie sur l'ubiquinone, qui les transmet à la Nitrate Réductase, complexe en plusieurs sous-unités :

Afin d'éviter de perdre son gradient de proton et d'utiliser trop d'électrons, la bactérie aura tendance à laisser sortir l'azote sous forme de NO ou N2O, qui diffusent librement (gaz non chargés).

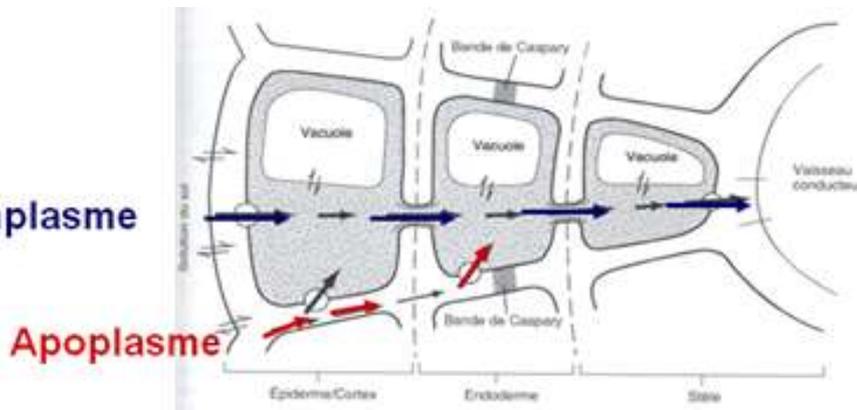


Pour conclure, la nutrition azotée se révèle importante dans la mesure où elle joue un rôle primordial dans la croissance et le développement de la plante. L'azote se trouve pratiquement en grande quantité dans le milieu où vivent les végétaux mais n'est pas pour autant assimilable. Il n'est assimilable que sous forme de sel d'ammonium, de nitrite et plus particulièrement sous forme de nitrate.



## II. Absorption de l'azote minéral chez les végétaux

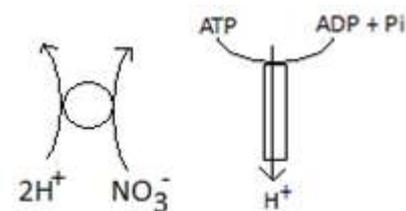
### 1) Rappels



Transport poils absorbants → Cortex racinaire → vaisseaux conducteurs → Transfert vers les parties aériennes.

### 2) Caractérisation physiologique de l'influx de nitrate

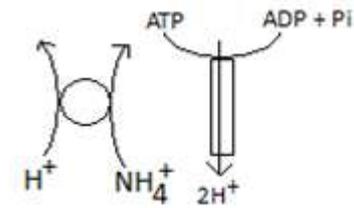
Pour faire rentrer l'azote dans la cellule, la plante possède un système de co-transport contregradient NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> au niveau des poils absorbants. Ce système demande un apport de H<sup>+</sup> en milieu externe, lequel se fait par un canal hydrolysant l'ATP. Ce NO<sub>3</sub><sup>-</sup> est alors soit stocké dans les vacuoles des cellules (et intervient alors dans le contrôle de la pression osmotique), soit transporté vers les parties aériennes par la sève brute (où l'on ne trouve pas d'ammonium).



La plante est capable à la fois de pomper la moindre particule d'azote dans un sol, mais également de pomper en grande quantité dans un sol chargé : elle possède des transporteurs de faible affinité et des transporteurs de forte affinité pour pallier à toute éventualité : NRT1 et NRT2

Le transporteur de faible affinité (NRT1) a été mis en évidence par le remplacement de nitrate par son analogue toxique : le chlorate. Le fortement affiné (NRT2), identifié d'abord chez les champignons, possède la même structure.

Quant à l'ammonium, lui est transporté par des systèmes AMT. Ces systèmes, uniport ou symport, utilisent la force protomotrice et donc acidifient le milieu. Puiser directement du  $\text{NH}_4^+$  demande moins d'énergie à la plante que de puiser du  $\text{NO}_3^-$  puisque ce dernier sera de toute façon transformé en  $\text{NH}_4^+$ . Cela évite donc l'acidification du milieu extérieur la nutrition mixte  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  est optimale.



L'ensemble des perturbations provoquées par les ions  $\text{NH}_4^+$  s'appelle le syndrome ammoniacal :

- Si le pH est élevé l'absorption de  $\text{NH}_4^+$  est favorisée, et donc l'acidification provoque une baisse du pH.

- Lorsque les plantes sont en conditions de nutrition ammoniacale, les ions ammoniums diminuent l'absorption des autres ions tels que  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ . On dit que  $\text{NH}_4^+$  est antagoniste de  $\text{Ca}^{2+}$ , de  $\text{K}^+$  et de  $\text{Mg}^{2+}$ . Il semblerait qu'ils rentrent en compétition pour l'occupation de canaux ioniques.

Pour compenser les charges, pour chaque  $\text{NO}_3^-$  transformé la cellule va synthétiser de l'acide shikimique (chargé -) qui sera ensuite transformé en aa (Trp, Phe, Tyr) pour conserver l'azote.

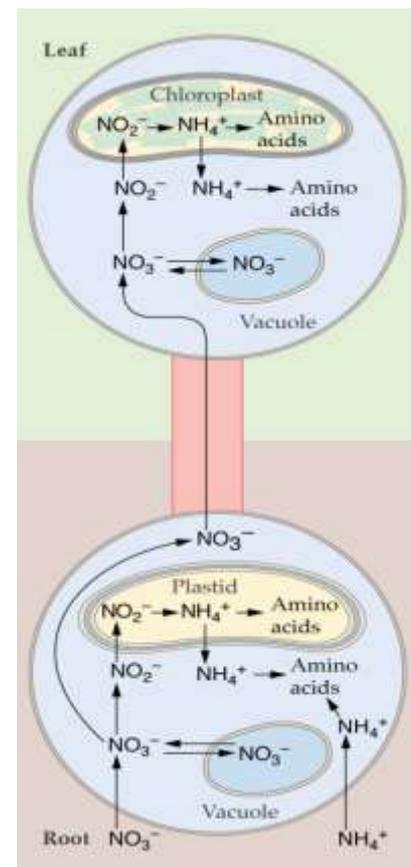
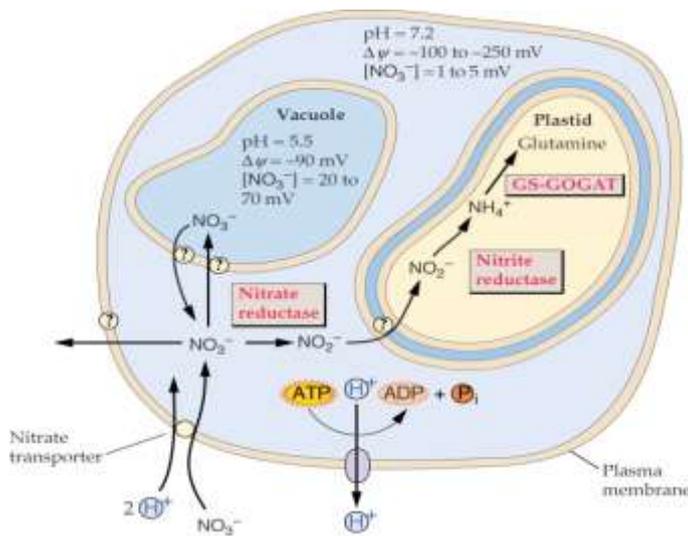
→ Le nitrate permet l'activation d'enzymes du métabolisme carboné comme la PEPc.

### III. Assimilation des nitrates et Réduction en ammoniacales

#### 1) Répartition du nitrate dans la plante

Le transport de l'azote des racines vers les feuilles nécessitent l'intervention de différents transporteurs. Il est absorbé plutôt le matin, d'où une carence en fin d'après-midi.

#### 2) Assimilation par la Nitrate Réductase et Nitrite Réductase



L'assimilation du nitrate au niveau des feuilles se fait en condition d'excès en azote. Par contre, lorsqu'il y a carence, il sera principalement assimilé au niveau des racines. Le nitrate sera ensuite stocké dans la vacuole, et quand la plante en aura besoin elle le transformera en  $\text{NO}_2^-$  et en  $\text{NH}_4^+$ .

Les enzymes qui permettent l'assimilation dépendent de la concentration en azote extérieur mais aussi du type de plante.

## Structure et fonction de la Nitrate Réductase (NR)

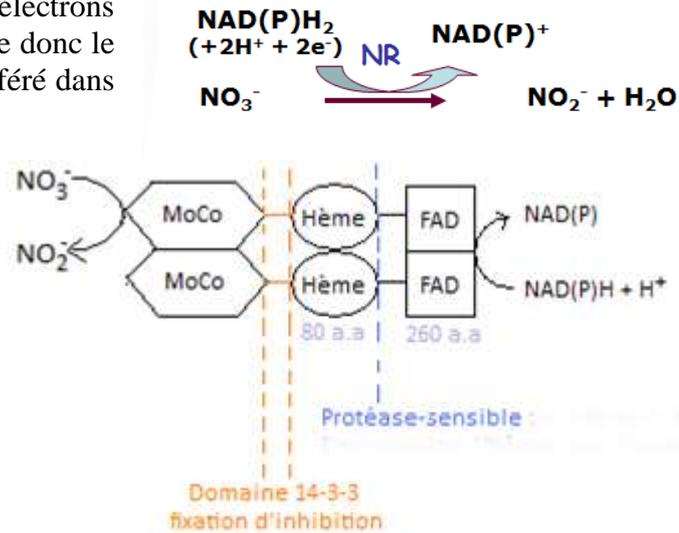
C'est une enzyme soluble et cytosolique ASSIMILIATRICE (⚠ différent chez les bactéries).

Tout d'abord, le nitrate est déstocké de la vacuole. Les deux électrons réduisent le  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$  : réaction cytosolique et exergonique donc le transfert des électrons est spontané. Le  $\text{NO}_2^-$  sera ensuite transféré dans le plaste (racine) ou dans le chloroplaste (feuilles).

Le domaine FAD est une flavine qui n'est fonctionnelle qu'avec le groupement prosthétique. Même séparé du reste de la protéine (par l'action d'une protéase), ce domaine peut, si on lui donne du NADPH, réduire la FCN (ferricyanide).

Le domaine MoCo et l'hème peuvent réduire le  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$  si on leur donne les 2 électrons.

Cette division est possible car ce sont des gènes différents qui ont fusionnés pour ne donner qu'une protéine après la transduction et la traduction.

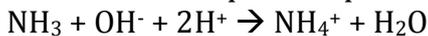


## Structure et fonction de la Nitrite Réductase (NiR)

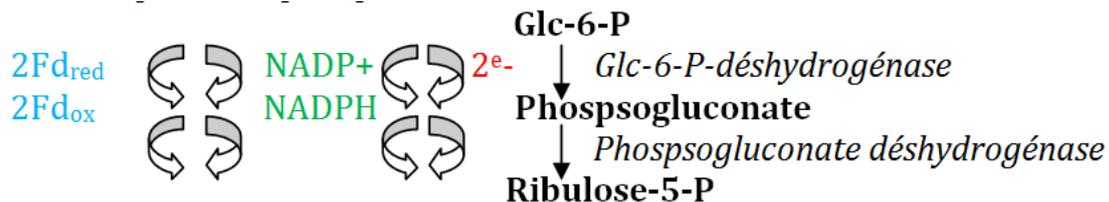
Cette enzyme se trouve dans les plastes.



Ensuite  $\text{NH}_3$  est protoné pour former du  $\text{NH}_4^+$  :

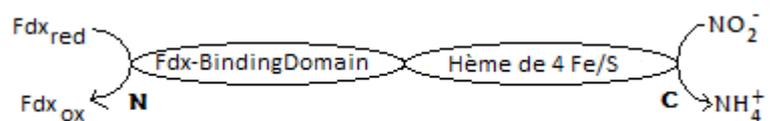


La Ferrédoxine est oxydée dans le PS I lors de la photosynthèse. Mais lorsqu'on est en carence d'azote, le nitrate est assimilé par les racines et donc il n'y a pas de photosynthèse. Pour réduire la Ferrédoxine, la plante utilise alors la voie des pentoses phosphate :



→ Il faut donc 1.5 molécule de Glc-6-P pour avoir 6e- et réduire le nitrite en ammonium.

La NiR est juste formée d'une chaîne contenant 3 domaines : un domaine contient du FMN responsable de la fixation des électrons de la ferrédoxine, le 2e est une protéine Fer - soufre et enfin un hème.

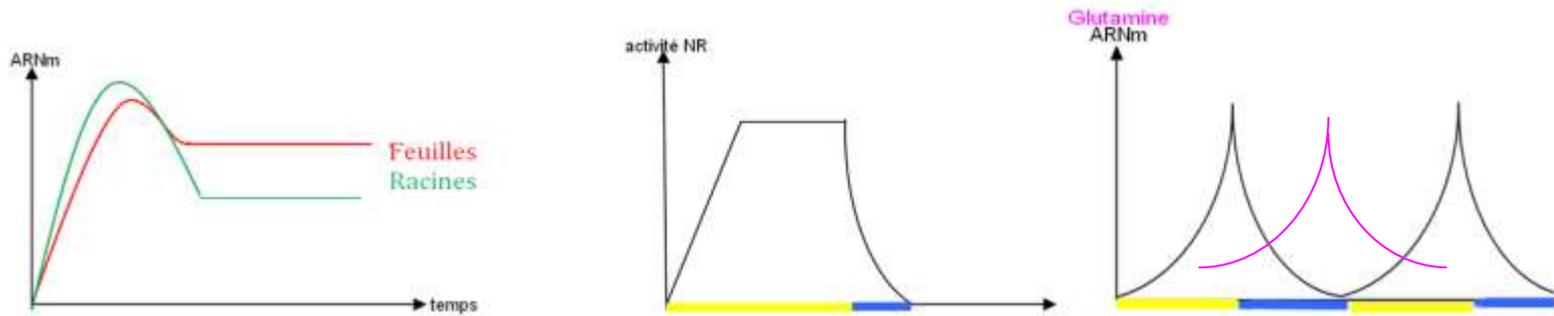


La réduction du  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NH}_4^+$  est donc très coûteuse en énergie mais l'accumulation de nitrites est mauvais pour la plante, il faut donc une régulation très forte de la NR pour ne pas accumuler le  $\text{NO}_2^-$  si la cellule ne dispose pas d'assez de pouvoir réducteur. Ainsi, l'activité de la NiR sera supérieure à celle de la NR.

## Régulation de la NR

Elle peut se faire au niveau de sa synthèse (réponse lente, quelques heures) ou au niveau de son activité (réponse très rapide).

C'est une enzyme inductive, sa synthèse va avoir lieu seulement si la plante est au contact de nitrates. Sa durée de vie n'est que de quelques heures. La synthèse est donc entretenue s'il y a un apport régulier de nitrate à la plante. Pour mettre cette synthèse en évidence, on utilise le Northern blot (utilisation de sonde pour étudier l'ARNm)



Au niveau des feuilles l'ARN est en plus grande quantité car il est plus facile d'avoir du pouvoir réducteur mais uniquement dans le cas où la plante est bien éclairée et en bonne santé. Et pour indiquer que les chloroplastes sont fonctionnels, c'est la présence de saccharose qui indique qu'il y a eu la photosynthèse et donc du pouvoir réducteur.

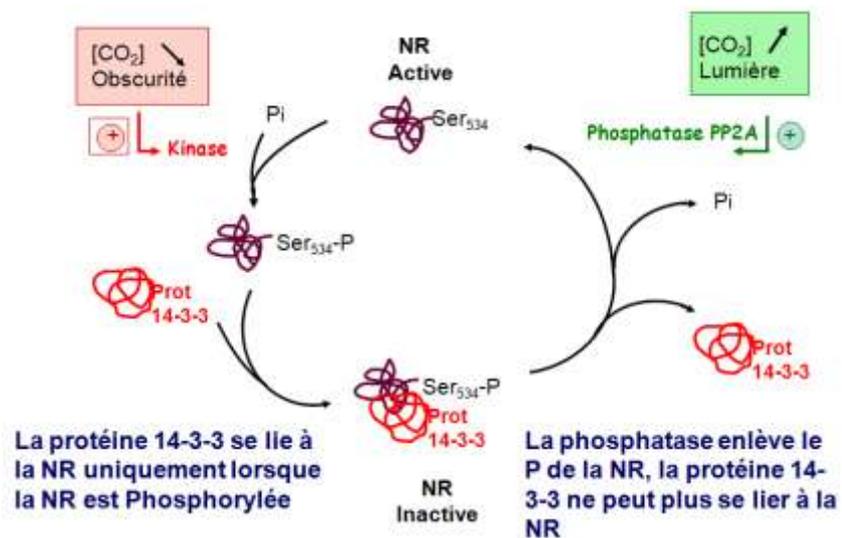
La glutamine et le glutamate régulent la synthèse de NR

De plus, la NR est régulée par une phosphorylation post-traductionnelle.

La phosphorylation est régulée par la lumière et des sucres qui inhibent le processus : l'obscurité active la kinase qui phosphoryle la NR.

La protéine 14-3-3 régule l'activité de plusieurs protéines, notamment une ATPase membranaire et la NR.

Lorsque la  $[CO_2]$  diminue, on déplace l'activité de la Rubisco vers la phosphorespiration → diminution du pouvoir réducteur de la cellule → diminution de la NR.



La réduction des nitrates est donc étroitement liée aux autres métabolismes tels que la respiration, la photosynthèse pour la fourniture de pouvoir réducteur, de chaîne carbonée, d'énergie.

#### IV. Assimilation de l'azote ammoniacal

L'azote primaire déjà fixé au sein des protéines peut être à nouveau mobilisé : assimilation secondaire.

- Organes de réserve : tiges, racines, tubercules qui présentent des protéines de stockage pouvant avoir parfois une activité enzymatique. Ex : la patatine
- 2<sup>ème</sup> lieu de stockage : grande quantité dans les graines, structure compacte où les protéines spécifiques n'ont pas d'activité enzymatique. Au moment de la germination, elles deviennent sensibles aux protéases et la présence de déaminases permet le relargage de  $\text{NH}_4^+$  ce qui constitue une source d'azote secondaire.
- Le  $\text{NH}_4^+$  est produit par les plantes C3 lors de la photorespiration

Rem :  $[\text{NH}_2]$  entre crochet car il ne provient pas d'une assimilation directe du  $\text{NH}_4^+$  mais d'un autre acide aminé : le glutamate ou l'aspartate. On parle de transamination.

D'après le schéma, si 2 molécules de  $\text{O}_2$  sont fixées grâce à la RubisCO, on forme 2 glycines qui par perte d'un  $\text{CO}_2$  et d'un groupe  $\text{NH}_3$  aboutissent à la formation d'une sérine.

**Le  $\text{NH}_3$ , qui provient de la photorespiration, peut être 10 fois supérieur à l'assimilation primaire de l'azote.**

Il existe une relation étroite entre le métabolisme azoté et la photorespiration.

#### 4 acides aminés sont essentiels à l'assimilation de $\text{NH}_4^+$

Ils représentent à eux seuls 80% des acides aminés : glutamate, glutamine, aspartate et asparagine.

Le Glu et Gln dérivent de l'acide  $\alpha$ -cétonique du cycle de Krebs.

- La fonction cétone ( $\text{C}=\text{O}$ ) de l' $\alpha$ -cétooglutarate est remplacée par une fonction amine ( $\text{CH}-\text{NH}_2$ )  $\rightarrow$  Glu

- Apparition d'une fonction amide ( $\text{NH}_2-\text{C}=\text{O}$ ) sur le Glu (amidation)  $\rightarrow$  Gln

L'Asp quant à lui dérive de l'OAA et subit les mêmes modifications.

La Gln est le premier acide aminé formé après assimilation du  $\text{NH}_4$ . Le Glu et Asp sont des donneurs de  $\text{NH}_2$ . L'Asn est un acide aminé de stockage de l'azote. Il est assez inerte c'est à dire qu'en le stockant il ne modifie pas le métabolisme cellulaire. Le Glu est constant au cours du temps tandis que l' $\alpha$ -cétooglutarate fluctue.

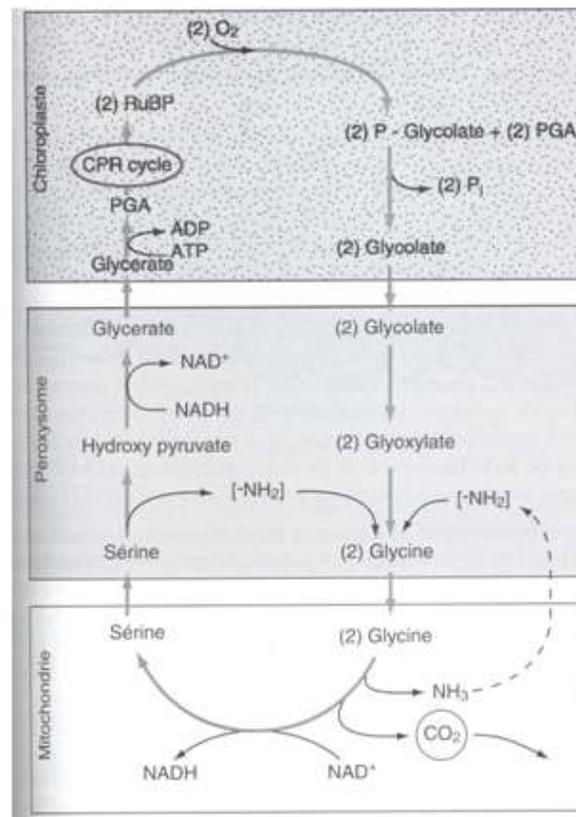
#### 1) Assimilation de $\text{NH}_4^+$ par le système GS/GOGAT

2p2

On a mis en évidence l'assimilation du  $\text{NH}_4^+$  dans les différentes molécules de la plante grâce à l'apport de  $\text{NH}_4^+$  radioactif. La GS permet une amidation du Glu en consommant de l'ATP. Le groupement  $\text{NH}_2$  de la Gln attaque le carbone alpha de l' $\alpha$ -cétooglutarate ce qui forme un Glu et régénère le Glu de départ et ce grâce à la GOGAT (= Glutamate Oxoglutarate Amino Transferase). Il s'agit d'un mécanisme de réduction de la fonction cétone, il faut donc un apport en électrons. Ceux-ci sont apportés par 2 molécules de ferrédoxine consommées par la GOGAT.

90% du  $\text{NH}_4$  sera assimilé par ce système GS/GOGAT.

Inhibiteurs spécifiques :  
- MSO (Méthionine Sulfoximine) pour la GS  
- Azasérine



Tous deux sont des analogues structuraux du substrat qui en fixant sur le site actif de l'enzyme la bloque.

1p3

Il existe 2 types de GS et GOGAT.

La GS est un octamère ; chez la plante on trouve 2 isoformes : GS<sub>1</sub> et GS<sub>2</sub>. Elles ont des propriétés biochimiques très proches, en revanche, elles ne sont pas transcrites aux mêmes endroits, on parle de compartimentalisation sub-cellulaire.

95% de GS<sub>1</sub> se trouve dans les racines. C'est une enzyme cytosolique.

95% de GS<sub>2</sub> se trouve dans les feuilles et plus particulièrement dans les plastides.

La GOGAT NADH dépendante est à 95% dans les racines

La GOGAT Ferrédoxine dépendante est à 95% dans les feuilles.

Quelque soit le type de GOGAT, les deux sont localisées dans les plastides.

2p3

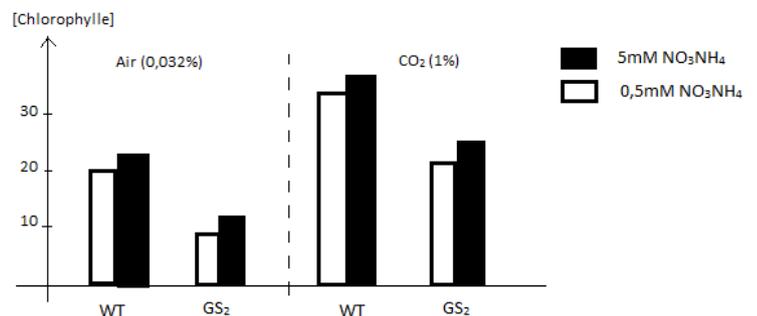
Les isoenzymes ont des rôles différents. Si on bloque par mutagenèse une des deux isoenzymes, il n'y a pas surexpression de l'autre. Lorsque l'on bloque la synthèse de la GS<sub>2</sub> ou de la GOGAT Ferrédoxine dépendante les mutants se portent très mal à l'air : ils deviennent jaunes et tout chlorotique.

Dans l'air on a une concentration en CO<sub>2</sub> de 0,032% tandis que dans les conditions qui ne sont pas à l'air, on est à 1%.

Si on a beaucoup de CO<sub>2</sub>, la RubisCO fixe le CO<sub>2</sub>, on a affaire à une carboxylation. Lorsque à l'air O<sub>2</sub> > CO<sub>2</sub>, la photorespiration est privilégiée entraînant la formation de sérine en perdant du CO<sub>2</sub> et du NH<sub>3</sub>. (Phénomène mauvais pour le rendement photosynthétique).

Si on a absence de la GS<sub>2</sub>, on a pas de ré-assimilation du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cela induit une carence et le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> peut alors devenir toxique pour la plante.

Il suffit une mutation sur l'une des 4 enzymes pour modifier tout le système. Et bien que les propriétés biochimiques des isoenzymes soient proches leur compartimentalisation entraîne un fonctionnement spécifique de chacune d'entre elles.



## 2) Assimilation du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> par le système Glutamate Déshydrogénase (GDH) : une voie alternative.

1p4

Le Km de la GS pour le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> est de 3 à 5 μM tandis que pour la GDH, il est de 50mM. La GS est donc très affine du NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, dès l'état de trace, elle le fixe. La GDH prend le relais de la GS lorsque celle-ci est saturée c'est à dire lorsqu'on est en excès d'azote.

La nuit, la GDH permet la régénération de l'α-cétoglutarate car on a une diminution de photosynthétats carbonés.

## 3) Synthèse des autres acides aminés dans la plante.

2p4 : Transamination

AspAT : Aspartate Aminotransférase

Amidation : asparagine synthétase. Réaction coûteuse en énergie.

## 4) Coordination des métabolismes carbonés et azotés

La nuit, la plante est en vie ralentie. L'Asp est transformé en Asn. En fin de nuit, on observe une diminution du taux d'Asp et une diminution de photosynthétats carbonés c'est pourquoi la GDH entre en jeu et permet la formation d' $\alpha$ -cétoglutarate. La Gln est transformée en Glu par transamination. Le Glu sous l'action de la GDH libère un  $\alpha$ -cétoglutarate et un  $\text{NH}_4^+$ .