

Assimilation de l'azote chez *Acacia albida* Del.

Diégane Diouf,
Physiologiste végétal

Claudine Campa,
Physiologiste-biotechnologue

Ibrahima Ndoye,
Microbiologiste

Bernard Dreyfus,
Microbiologiste

Introduction

Les acacias présentent un intérêt majeur dans les régions semi-arides d'Afrique pour leur production de bois et de fourrage et pour leur contribution au maintien et à la restauration de la fertilité des sols, notamment par leur capacité à fixer l'azote (Duhoux et Dommergues, 1986; Giller et Wilson, 1991). Pour la zone soudano-sahélienne, *Acacia albida* (ou *Faidherbia albida*) est une espèce d'une grande importance. En effet, grâce à son cycle phénologique inversé (feuillaison pendant la saison sèche), cet arbre est souvent utilisé en agroforesterie pour la pratique des cultures intercalaires qu'il semble favoriser (Charreau et Vidal, 1965; Louppe, 1990; Oliver *et al.*, 1996). S'il existe des données sur les capacités d'*A. albida* à pratiquer la symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote et sur son pouvoir fixateur (Dreyfus et Dommergues, 1981; Dupuy et Dreyfus, 1992; Ndoye *et al.*, 1995), il n'existe aucun document faisant état du métabolisme azoté de cet arbre : absorption de l'azote minéral du sol (nitrate ou ammonium), seuils de nitrate inhibant la nodulation, formes de transport dans la plante de l'azote fixé ou non, zones pré-

férentielles d'assimilation de l'azote. Pourtant, ces connaissances sont nécessaires à l'amélioration des capacités de fixation de cette espèce, considérée comme faiblement fixatrice (Ndoye *et al.*, 1995). L'objectif du travail présenté ici est d'apporter une contribution à l'étude de l'assimilation de l'azote chez *A. albida*, en étudiant plus particulièrement le mode de transport, dans la plante, de l'azote fixé, l'importance de l'absorption de l'azote sous forme minérale, ainsi que les zones préférentielles de réduction du nitrate et d'assimilation de l'ammonium par la mesure de l'activité de deux enzymes intervenant dans le métabolisme azoté : la nitrate réductase (NR) et la glutamine synthétase (GS).

Matériels et méthodes

Afin de disposer d'un matériel végétal sain et à fort taux de germination, lors de chaque expérimentation, les graines d'*A. albida* (provenance Pire, localité de la zone soudano-sahélienne du Sénégal) sont prétraitées par trempage de 30 min. dans H_2SO_4 , rincées à l'eau distillée stérile puis mises à germer pendant 48 heures en boîte de Petri (obscurité, 37 °C). Ces jeunes germinations sont alors mises en culture en serre, soit dans du sol stérilisé (gainés contenant un mélange sol/vermiculite : 2/1), soit sur un milieu de Hoagland et Arnon (1950) sans azote pour les cultures hydroponiques. Dans ce dernier cas, une phase intermédiaire de croissance est nécessaire avant le transfert en bac (60 l). Elle est réalisée en tubes Gibson (1963) pendant 3 semaines dans une chambre de culture thermostatée (30 °C). La souche de *Bradyrhizobium* utilisée pour l'inoculation (ORS 188) a été isolée de nodules d'*A. albida*. Conservée en collection au Laboratoire, elle a été sélectionnée pour sa grande efficacité sur cet arbre. Les inoculations sont réalisées à l'aide d'une culture liquide en milieu YM (Vincent, 1970) contenant 10^8 bactéries.ml⁻¹, au moment de la plantation pour les expérimentations en sol, une semaine après le repiquage en tube Gibson pour les cultures hydroponiques.

Après extraction du matériel végétal selon la technique de Van Kessel *et al.* (1988) ou prélèvement de la sève à l'aide d'une chambre à pres-

sion (PMS Instrument Co, Corvallis, USA), les acides aminés, amides, uréides et nitrate sont dosés respectivement selon les méthodes de Rosen (1957), Boddey *et al.* (1987), Young et Conway (1942) et Snell et Snell (1949). L'abondance relative en N dans les différents composés est calculée sachant que les acides aminés, amides, uréides et nitrate contiennent respectivement 1, 2, 4 et 1 N par molécule. L'activité fixatrice d'azote des nodules est évaluée sur plante entière par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) selon la technique de Hardy *et al.* (1973).

L'extraction des protéines solubles des nodules, racines et feuilles est réalisée à 4 °C par broyage dans un mortier en présence de PVP et de sable de Fontainebleau dans le tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8,4 contenant 1 μ M Na_2MoO_4 , 10 μ M FAD, 1 mM Na_2 EDTA, 5 mM cystéine, 1 μ M leupeptine, 11 mM mercaptoethanol et 1 mM DTT. Après centrifugation (15 000 rpm, 20 min., 4 °C), les activités nitrate réductase (NR) et glutamine synthétase (GS) sont mesurées dans le surnageant, respectivement selon les techniques de Wallace (1986) et de O'Neal et Joy (1973).

L'extraction des protéines pour l'isolement des isoformes GS des racines et feuilles est réalisée selon la technique de Miranda-Hann et Loyola-Vargas (1992) modifiée (absence de glutamate dans le tampon d'extraction). L'isolement et la purification partielle sont obtenus par chromatographie échangeuse d'ions de type Sephadex A-50, en présence d'un gradient 0-400 mM en KCl. Pour le marquage immunologique des isoformes GS, les protéines extraites sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10 % acrylamide) en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970) et transférées sur membrane de nitrocellulose, sur laquelle elles sont reconnues par réaction avec des anticorps GS (Hirel *et al.*, 1984).

■ Résultats et discussion

Transport de l'azote fixé

Lorsque l'association symbiotique entre les bactéries fixatrices d'azote et le partenaire plante est fonctionnelle, les bactéroïdes, à

l'intérieur du nodule, transforment l'azote atmosphérique en ammonium directement assimilable par la plante grâce à la nitrogénase bactérienne (Smith et Gallon, 1993). L'ammonium ainsi produit est incorporé dans des molécules organiques qui serviront au transport de l'azote du nodule vers les parties aériennes. Suivant les végétaux, ces molécules appartiennent soit au groupe des amides (asparagine et glutamine) soit au groupe des uréides (allantoïne et acide allantoïque). On distingue principalement deux groupes de plantes symbiotiques : les plantes à amides, regroupant généralement les Légumineuses de régions tempérées, et les plantes à uréides, regroupant essentiellement les légumineuses des régions tropicales (Schubert et Bolland, 1990).

Pour définir le groupe d'appartenance d'*A. albida*, nous avons mesuré les teneurs en amides, acides aminés, uréides et nitrate d'extraits végétaux (feuilles, tiges, racines et nodules) de jeunes plants d'*A. albida* cultivés en serre et inoculés avec une souche bactérienne très efficace, permettant le développement de nodules à forte activité nitrogénase (tabl. 1). Les résultats, présentés en abondance relative en azote dans les différents composés azotés (fig. 1), montrent que, quels que soient l'organe et l'âge des plants, les formes azotées les plus représentées sont les amides et les autres formes d'acides aminés. Les plus fortes teneurs en amides se trouvent surtout dans les nodules et les racines où les taux sont toujours supérieurs à 50 %, sauf après un mois de culture. Pour ces organes, les valeurs maximales sont observées après 7 mois de culture (respectivement 89 et 70 % de l'azote soluble). Les amides sont également fortement représentés dans les tiges. Seules les feuilles sont plus riches en acides aminés qu'en amides (sauf après un mois de culture). Par contre, quel que soit l'organe, l'azote sous forme uréide ne représente qu'un faible pourcentage, la plus forte valeur atteignant 12 % dans les nodules après un mois de culture. Ensuite, les plus forts taux sont rencontrés dans les feuilles, mais les valeurs ne dépassent jamais 8,60 %.

De même, des analyses de sève sur des plants inoculés âgés de 8 mois montrent que seulement 3 % de l'azote est sous forme uréide. Des mesures sur arbre adulte au moment de la fructification, période durant laquelle l'accumulation des uréides est maximale (Thomas et Shrader, 1981), montrent que seulement 0,5 % de

Activité	Âge des plantes (mois)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ARA ⁽¹⁾ ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{plante}^{-1}$)	1,1 ^c	1,4 ^c	2,1 ^c	5,3 ^b	1,3 ^c	2,0 ^{bc}	10,0 ^a	12,1 ^a

(1) ARA : activité réductrice d'acétylène (Hardy *et al.*, 1973)

Tableau 1

Activité nitrogénase des nodules d'*A. albida*.
 Les plantes, cultivées en serre sur sol stérile,
 sont inoculées avec la souche de *Bradyrhizobium*
 ORS 188. Moyennes de deux expérimentations
 comportant 5 plantes chacune. Les lettres différentes
 indiquent des différences significatives
 (test de Fisher pour $p \leq 0.05$).

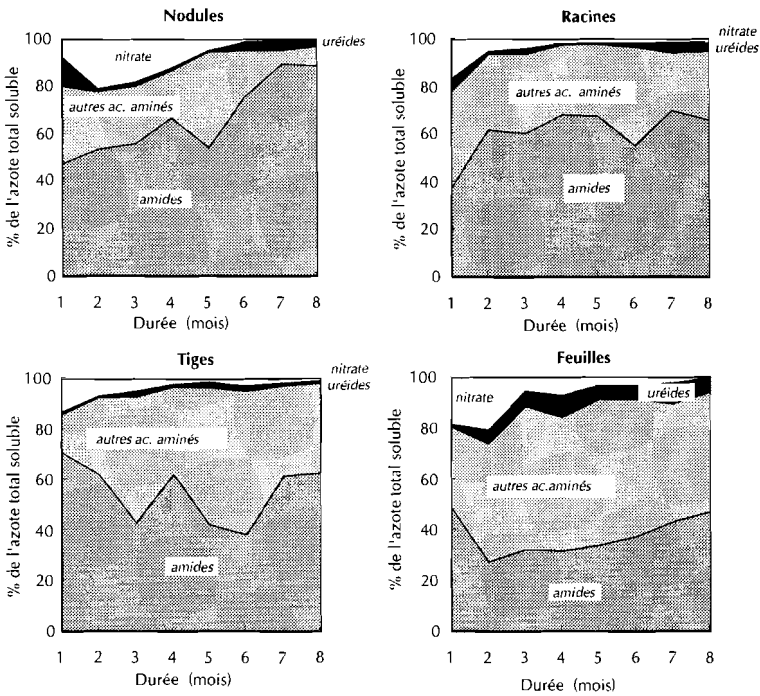


Figure 1

Répartition de l'azote soluble dans les différents organes d'*A. albida* au cours de leur croissance. Les plantes sont cultivées en terre et sont inoculées avec la souche de *Bradyrhizobium* ORS 188. Moyennes de deux expériences comportant 5 plantes chacune.

l'azote est sous forme uréide. *A. albida* semble donc appartenir au groupe des Légumineuses à amides, de même que *Sesbania* spp., *Aeschynomene indica* et *Crotalaria* spp. (Yonoyema et Kondo, 1990) ainsi que quelques acacias australiens (Van Kessel *et al.*, 1988).

Importance relative de la fixation de l'azote et de l'assimilation de l'azote minéral

Chez *A. albida*, les produits de l'assimilation de l'azote atmosphérique et de l'azote combiné sont les mêmes. Les uréides ne peuvent donc pas servir d'indicateur de la fixation biologique de l'azote, comme le proposent Peoples *et al.* (1989). En effet, la production d'uréides chez cette plante semble indépendante de l'activité des nodules, et serait plutôt liée à un processus catabolique, en rapport avec la dégradation des purines (Schubert et Bolland, 1990). Par les techniques de marquage au ^{15}N , Sanginga *et al.* (1990), puis Ndoye *et al.* (1995), ont montré que l'*Acacia albida* est un mauvais fixateur d'azote. Ils attribuent ce faible potentiel fixateur à la grande capacité de cet arbre à absorber le nitrate du sol. Nos résultats vont dans ce sens puisque l'on observe que, malgré une fixation efficace de l'azote atmosphérique, *A. albida* absorbe le nitrate du sol (fig. 1) et l'accumule dans le système racinaire, du moins pendant les 4 premiers mois de croissance. Ainsi, le nitrate représente une bonne part de l'azote des nodules et des racines (12 % dans les nodules âgés de 4 mois et 4 % dans les racines âgées de 3 mois). De plus, le nitrate est présent dans des extraits de tiges et de feuilles (respectivement 2 et 7 %) ainsi que dans la sève de plants nodulés âgés de 8 mois. Cette dernière observation montre que, malgré la présence de nodules efficaces, il existe toujours un transport de nitrate dans les parties aériennes. Elle suggère que l'assimilation du nitrate n'est pas totalement réalisée dans le système racinaire.

Distribution des activités NR et GS dans la plante

Après avoir été absorbé par les racines, le nitrate peut être réduit en nitrite puis en ammonium, qui est à son tour incorporé dans des

molécules organiques pour donner les acides aminés précurseurs des protéines. Les deux étapes de la réduction des nitrates sont assurées par les nitrate et nitrite réductases (NR et NiR). L'incorporation de l'ammonium dans les molécules organiques est essentiellement réalisée par le couple glutamine synthétase/glutamate synthase (GS/GOGAT) (Lea, 1993). Ces différentes enzymes sont présentes dans toutes les parties de la plante, mais le niveau de leur activité varie d'un organe à un autre, définissant ainsi des zones préférentielles de réduction et d'assimilation de l'azote. Ainsi, la réduction des nitrates s'effectue essentiellement dans les racines chez la plupart des arbres, en particulier les Rosacées, pour moitié ou presque totalement dans les feuilles chez les herbacées (Heller *et al.*, 1993). Afin de situer les zones de réduction de NO_3^- et d'assimilation de NH_4^+ chez *A. albida*, nous avons réalisé, en culture hydroponique pendant trois mois, des mesures d'activité enzymatique NR et GS sur des plants :

- non inoculés cultivés dans un milieu nutritif de Hoagland et Arnon (1950) modifié dont la seule source d'azote est KNO_3 maintenu à concentration constante (3 mM) ;
- inoculés et maintenus dans un milieu nutritif de Hoagland et Arnon (1950) modifié sans source d'azote minéral.

Après cinquante jours de culture en présence de KNO_3 3 mM, les teneurs en NO_3^- des racines, tiges et feuilles sont respectivement ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ matière fraîche) : $19,14 \pm 0,41$; $1,90 \pm 0,03$; 0 (non détectable). Ce gradient d'accumulation de NO_3^- décroissant des racines aux feuilles suggère que NO_3^- est transporté et totalement assimilé dans les feuilles.

Dans le cas où la source d'azote disponible pour les racines est l'ammonium provenant de la fixation symbiotique, l'activité GS est essentiellement retrouvée dans les nodules et les feuilles, où elle est respectivement 22 et 90 fois plus forte que dans les racines (tabl. 2). Les racines semblent jouer dans ce cas un faible rôle dans l'assimilation de l'azote. Ainsi, hormis leur fonction de réserve d'azote sous forme NO_3^- , elles ne participent que faiblement à la réduction des nitrates et à l'assimilation de l'ammonium, devenant encore moins actives pour cette dernière activité lorsque le nodule est installé et qu'il devient la seule source d'azote (activité GS 3,5 fois plus faible dans les racines inoculées que dans les racines alimentées en

KNO_3). Cette assimilation préférentielle du nitrate dans les feuilles est souvent rencontrée chez les plantes tropicales, pour lesquelles la réduction et l'assimilation des nitrates peuvent être des voies de consommation de pouvoir réducteur et d'ATP produits en excès grâce à une photosynthèse très active due à la forte intensité lumineuse (Andrews, 1986).

Activités ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) pour les traitements et organes suivants

	KNO_3		Inoculation		
	Racines	Feuilles	Nodules	Racines	Feuilles
NR	0,12 ± 0,09	2,16 ± 1,55	0	0	0,92 ± 0,15
GS	11,80 ± 5,64	223 ± 22	73,4 ± 37,5	3,36 ± 1,68	302 ± 111

Tableau 2

Activités nitrate réductase (NR) et glutamine synthétase (GS) dans les organes d'*A. albida*.

Ces plantes sont maintenues pendant 90 jours en culture hydroponique en présence de KNO_3 ou d'inoculum (ORS 188).

NR : nitrate réductase ; GS : glutamine synthétase ;

MF : matière fraîche. Moyennes de 10 prélèvements de 5 plantes et intervalles de confiance au seuil de 5 %.

Isolement des isoformes GS des feuilles et des racines

La glutamine synthétase des plantes supérieures est une protéine octamérique d'un poids moléculaire de 350-400 kDa, présente dans beaucoup de tissus chlorophylliens sous deux isoformes : GS_1 (cytosolique) et GS_2 (chloroplastique). La proportion de ces deux isoformes foliaires est variable suivant les plantes (Mc Nally *et al.*, 1983), le stade de développement des tissus et les saisons (Pearson et Ji, 1994). Cette particularité a permis à Mc Nally *et al.* (1983) de répartir les plantes en 4 groupes suivant l'importance relative de ces isoformes dans les feuilles, les légumineuses tempérées présentant généralement une plus forte activité GS_2 par rapport à GS_1 , les tropicales montrant une activité équivalente des isoformes. Par ailleurs, Woodall et Forde (1996) ont récemment montré que les racines des légumineuses tropicales non-papilionacées ne présen-

tent pas d'activité GS₂ dans leurs racines, excepté pour 3 d'entre elles, dont *A. farnesiana* (L.) Willd.

L'isolement et la purification partielle de la GS des feuilles d'*Acacia albida* révèle la présence de deux pics d'activité (fig. 2). Le premier, élué à une concentration de KCl d'environ 130 mM, ne représente que 26 % de l'activité GS totale des feuilles. Le reste de l'activité est élué à une concentration de KCl voisine de 230 mM. Ces caractéristiques d'éluion, proches de celles observées pour différentes espèces (Mc Nally *et al.*, 1983) ainsi que les révélations par immunoblotting (Hirel *et al.*, 1984) permettent d'assimiler le premier pic à la GS₁ et le second à la GS₂. Dans les racines, un pic majoritaire, élué à 110 mM, représente 81 % de l'activité totale et correspond à la GS₁. Le deuxième, élué à 220 mM, correspondrait à la GS₂, bien que les profils par immunoblotting ne révèlent pas de bande pour cette isoforme.

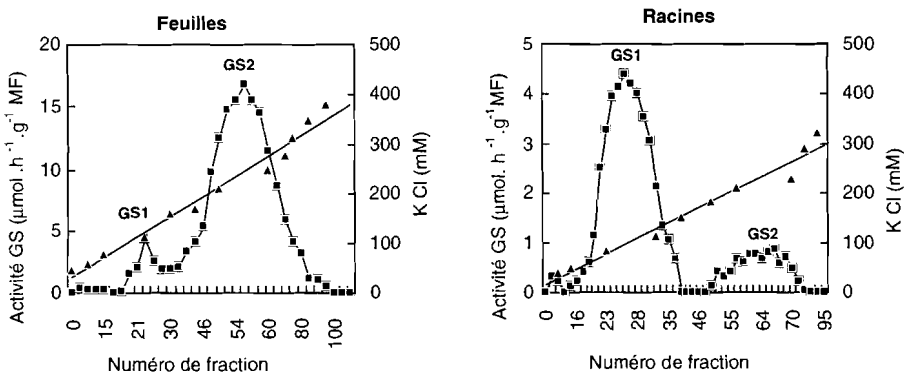


Figure 2
Profil d'éluion des isoformes GS de feuilles et racines d'*A. albida*.

Conclusion

A. albida, par son mode de transport de l'azote fixé, peut être classé parmi les plantes à amides. Ce type de transport est classiquement attribué aux Légumineuses tempérées, mais quelques exceptions

sont observées parmi les Légumineuses tropicales de la famille des Papilionacées (Yonoyema et Kondo, 1990) et des Mimosacées, parmi lesquelles on compte la plupart des acacias australiens (Van Kessel *et al.*, 1988). La présence de nitrate dans les racines et les tiges de jeunes plants inoculés avec une souche bactérienne très efficace montre que ces plantes ont une capacité à absorber le nitrate excédant l'assimilation. Les faibles activités NR et GS observées dans les racines suggèrent que ces organes interviennent essentiellement dans le métabolisme azoté de la plante en tant que réservoir d'azote minéral. Le transport du nitrate vers les feuilles ainsi que la présence de fortes activités réductrice de NO_3^- et assimilatrice d' NH_4^+ dans ces organes confirment cette hypothèse. Ce comportement, typique de celui des Légumineuses tropicales, est attribué à la présence d'une forte disponibilité en énergie dans leurs feuilles, liée à une activité photosynthétique intense (Andrews, 1986). L'activité assimilatrice serait en grande partie due à l'isoforme GS_2 chloroplastique, ce qui correspondrait plus au type de fonctionnement classiquement rencontré chez les Légumineuses tempérées (Mc Nally *et al.*, 1983). De même, la présence d'une activité GS_2 dans les racines n'est généralement pas rencontrée chez les Légumineuses tropicales, avec une exception chez *A. farnesiana* (Woodall et Forde, 1996). Ces particularités d'*A. albida* (transport de l'azote fixé sous forme d'amides et activité GS_2) par rapport au comportement général des plantes tropicales trouvent peut-être une explication dans les aires géographiques de prédilection de cet arbre. En effet, même s'il est rencontré un peu partout en Afrique, on le retrouve de préférence dans les régions semi-arides (zone soudano-sahélienne) caractérisées par de faibles pluies (von Maydell, 1983) et des sols généralement pauvres en nitrates. Or, dans la littérature, le terme tropical désigne bien souvent les régions humides aux sols fortement humifiés. Dans ces zones, le transport de l'azote sous forme uréide, très coûteux en eau, n'est compatible qu'avec une grande disponibilité en eau pour les plantes s'y développant (Sprent, 1980). Par contre, il ne semble pas applicable aux plantes des zones sahéliennes, confrontées aux problèmes d'alimentation hydrique. Aussi, il est possible que le métabolisme de l'azote fixé observé chez *Acacia albida*, original par rapport aux autres Légumineuses tropicales, soit une des réponses des Légumineuses tropicales des régions arides à la faible disponibilité en eau.

Bibliographie

- ANDREWS (M.), 1986 -
The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environ.*, 9 : 511-519.
- BODDEY (R. M.), PEREIRA (J. A. R.), HUNGRIA (M.), THOMAS (R. J.), NEVES (M. C. P.), 1987 -
Methods for the study of nitrogen assimilation and transport in grain legumes. *MIRCEN J.*, 3 : 3-22.
- CHARREAU (C.), VIDAL (P.), 1965 -
Influence de l'*Acacia albida* Del. sur le sol, nutrition minérale et rendements des mils *Pennisetum* au Sénégal. *L'agronomie Tropicale*, série Agronomie Générale, 6-7 : 600-625.
- DREYFUS (B. L.),
DOMMERGUES (Y. R.), 1981 -
Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 97-99.
- DUHOUX (E.),
DOMMERGUES (Y. R.), 1986 -
« The use of nitrogen fixing trees in forest and soil restoration in the tropics. » In : *Les arbres fixateurs d'azote et l'amélioration de la fertilité des sols*. Actes Séminaire FIS/ORSTOM, Dakar, 17-25 mars : 340-400.
- DUPUY (N. C.), DREYFUS (B. L.), 1992 -
Bradyrhizobium populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 2415-2419.
- GIBSON (A. H.), 1963 -
Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* plants. *Aust. J. Biol. Sci.*, 16 : 28-42.
- GILLER (K. E.), WILSON (K. J.), 1991 -
« Agroforestry Nitrogen fixing trees in integrated agriculture. » In : *Nitrogen fixing in tropical cropping systems*. (K. E.) Giller, (K. J.) Wilson édés, C.A.B. International : 178-196.
- HARDY (R. W. F.), BURNS (R. C.), HOLSTEN (R. D.), 1973 -
Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of N₂-fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 5 : 47-81.
- HELLER (R.), ESNAULT (R.), LANCE (C.), 1993 -
« L'assimilation de l'azote et du soufre. » In *Physiologie Végétale. 1. nutrition*, (R.) Heller, (R.) Esnault, (C.) Lance édés, Masson, Paris, Milan, Barcelone : 149-165.
- HOAGLAND (D. R.), ARNON (D. I.), 1950 -
Water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Bull.* 347 : 12.
- HIREL (B.),
WEATHERLEY (C.), CRETIN (C.), BERGOUNIUX (C.), GADAL (P.), 1984 -
Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.*, 74 : 448-450.
- LAEMMLI (U.), 1970 -
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685.
- LEA (P. J.), 1993 -
« Nitrogen metabolism. » In *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, (P. J.) Lea, (R. C.) Leegood édés, John Wiley and sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore : 155-180.
- LOUPPE (D.), 1990 -
Faidherbia albida : l'arbre miracle du Sahel. L'Agroforesterie aujourd'hui, Nairobi, Kenya, ICRAF, avril-juin 1989, vol 1, n° 2.

- MC NALLY (S. F.), HIREL (B.), GADAL (P.), MANN (A. F.), STEWART (G. R.), 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.
- MIRANDA-HANN (M. L.), LOYOLA-VARGAS (V. M.), 1992 - Purification and characterization of glutamine synthetase from leaves of *Catharanthus roseus* plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 30 (5) : 585-592.
- NDOYE (I.), GUEYE (M.), DANSO (S. K. A.), DREYFUS (B.), 1995 - Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal* and *Acacia seyal* estimated using the ¹⁵N isotope dilution technique. *Plant Soil.*, 172 : 175-180.
- OLIVER (R.), DEPOMMIER (D.), JANODET (E.), 1996 - Influence de *Faidherbia albida* sur le sol et le sorgho. Observations dans le parc de Wanitoma au Burkina Faso. In : Les parcs à *Faidherbia*, Cirad-Forêt. *Cahiers scientifiques*, n° 12 : 141-152.
- O'NEAL (D.), JOY (K. W.), 1973 - Glutamine synthetase in pea leaves. I. Purification, stabilization and pH optima. *Arch. Biochem. Biophys.*, 159 : 113-122.
- PEARSON (J.), JI (Y. M.), 1994 - Seasonal variation of leaf glutamine synthetase isoforms in temperate deciduous trees strongly suggests different functions for the enzymes. *Plant Cell Environ.*, 17 : 1331-1337.
- PEOPLES (M. B.), FAIZAH (A. W.), RERKASEM (B.), HERRIDGE (D. F.), 1989 - « Xylem-solute technique. » In *Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field*, (M. B.) Peoples, (A. W.) Faizah, (B.) Rerkasemet, (D. F.) Herridge édés. ACIAR, Camberra, 22-46.
- ROSEN (H.), 1957 - A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 67 : 10-15.
- SANGINGA (N.), BOWEN (G. D.), DANSO (S. K. A.), 1990 - Assessment of genetic variability for N₂ fixation between and within origins of *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* estimated by ¹⁵N labelling techniques. *Plant Soil.*, 127 : 169-178.
- SCHUBERT (K.R.), BOLLAND (M. J.), 1990 - « The ureides. » In : *The Biochemistry of plants, a comprehensive treatise*, Vol 16 Intermediary nitrogen metabolism, (B. J.) Mifflin, (P. J.) Lea édés, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sidney, Tokyo, Toronto : 197-282.
- SMITH (R. J.), GALLON (J. R.), 1993 - « Nitrogen fixation. » In : *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, (P. J.) Lea, (R. C.) Leegood édés, John Wiley and sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore : 129-153.
- SNELL (F.D.), SNELL (C. T.), 1949 - « Colorimetric methods for analysis. » Van Nostrand édés, New York, vol. 2.
- SPRENT (J. I.), 1980 - Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some *Leguminosae*. *Plant Cell Environ.*, 3 : 35-43.
- THOMAS (R. J.), SHRADER (L. E.), 1981 - Ureide metabolism in higher plants. *Phytochem.*, 20 : 361-371.
- VAN KESSEL (C.), ROSKOSKI (J. P.), KEANE (K.), 1988 - Ureide production by N₂-fixing and non-N₂-fixing leguminous trees. *Soil. Biol. Biochem.*, 20 : 891-897.
- VINCENT (J. M.), 1970 - « A manual for the practical study of root nodule bacteria », International

Biological Programme Handbook
N° 15. Blackwell Scientific
Publications, Oxford and Edinburgh.

VON MAYDELL (H.-J.), 1983 -
« *Acacia albida* Del. »
In Arbres et arbustes du Sahel.
Leurs caractéristiques et leurs
utilisations. (H.-J.) Von Maydell éds,
GTZ, Verlag Josef Margraf, Scientific
books, Weikersheim, 88-93.

WALLACE (W.), 1986 -
Distribution of nitrate assimilation
between the root and shoot
of legumes and a comparison
with wheat. *Physiol. Plant*,
66 : 630-636.

WOODALL (J.), FORDE (B. G.), 1996 -
Glutamine synthetase polypeptides
in the roots of 55 legume species
in relation to their climatic origin
and the partitioning of nitrate
assimilation. *Plant Cell Environ.*,
19 : 848-858.

YONOYEMA (T.), KONDO (M.), 1990 -
Sesbania spp., *Aeschynomene*
indica and *Crotalaria* spp. are
amide-exporters. *Soil. Science*
Plant Nutr., 36 : 689-693.

YOUNG (E. G.), CONWAY (C. F.), 1942 -
On the estimation of allantoin by
the Rimini-Schrivver reaction.
J. Biol. Chem., 142 : 839-853.