

FORMATION, D'INOSITOL PAR LES CHLOROPLASTES ISOLÉS DE POIS

V. IMHOFF et R. BOURDU

Laboratoire Structure et Métabolisme des Plantes, Associé au C.N.R.S., Bât. 490,
Université Paris XI, Centre d'Orsay, 91 Orsay, France

(Reçu le 11 juillet 1972. Accepté le 1 septembre 1972)

Key Word Index—*Pisum sativum*; Leguminosae; chloroplast extracts; mesoinositol; biosynthesis.

Résumé—Une préparation de chloroplastes isolés de pois est susceptible de transformer *in vitro* du (U-¹⁴C)-glucose-6-phosphate en (U-¹⁴C)inositol-1-phosphate. L'incorporation de la radioactivité dans l'(U-¹⁴C)-inositol provenant de l'hydrolyse phosphatase de l'(U-¹⁴C)inositol-1-phosphate formé est étudiée dans quelques conditions expérimentales. La D-glucose-6-phosphate cyclase est active dans un extrait protéique obtenu à partir des chloroplastes isolés. Ces résultats montrent la participation des chloroplastes à la synthèse de leur inositol endogène.

Abstract—It was possible to synthesize D-inositol-1-phosphate from glucose-6-phosphate with extracts of chloroplasts isolated from pea-leaves. (U-¹⁴C)Inositol produced by alkaline phosphatase hydrolysis was studied under various conditions. The enzyme D-glucose-6-phosphate cyclase was isolated from the chloroplast preparation. The results showed the role of chloroplasts in the synthesis of their endogenous inositol.

INTRODUCTION

LA PRESENCE de l'inositol, de ses isomères ou dérivés a été fréquemment et dernièrement¹ démontrée dans les feuilles. Du ¹⁴C-inositol est isolé à la suite d'incorporation de ¹⁴CO₂ par des plantes entières,²⁻⁴ ou d'infiltration de fragments foliaires⁵ et de feuilles⁶ en présence de glucose radioactif. Les faibles taux d'incorporation de la radioactivité dans le ¹⁴C-inositol évoquent l'existence d'un chemin de synthèse compliqué; cependant la conservation du cycle des atomes de carbone du glucose à l'inositol étant assurée il faut penser que la filiation est directe et que la réaction est lente. Il a d'ailleurs été montré que des préparations enzymatiques de germinations synthétisent de l'(U-¹⁴C)inositol à partir de l'(U-¹⁴C)glucose-6-phosphate,^{7,8} qui est le substrat habituel de sa biosynthèse.⁹⁻¹¹

¹ V. PLOUVIER, *Compt. Rend.* **274**, 1735 (1972).

² E. A. MOSCATELLI et J. LARNER, *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 26 (1959).

³ K. E. RICHARDSON et B. AXELROD, *Plant Physiol.* **32**, 334 (1957).

⁴ R. SCHOLDA, G. BILLEK et O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **335**, 180 (1964).

⁵ H. KINDL et O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Monatsh. Chem.* **95**, 548 (1964).

⁶ F. A. LOEWUS et S. KELLY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 204 (1962).

⁷ H. RUIS, E. MOLLINARI et O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 1705 (1967).

⁸ H. KURASAWA, T. HAYAKAWA et S. MOTODA, *Agric. Biol. Chem. Tokyo* **31**, 382 (1967).

⁹ E. PINA et E. L. TATUM, *Biochim. Biophys. Acta* **136**, 265 (1966).

¹⁰ I. W. CHEN et F. C. CHARALAMPOUS, *J. Biol. Chem.* **229**, 1905 (1964); **240**, 3507 (1965); **241**, 2994 (1966).

¹¹ F. EISENBERG, JR. et A. H. BOLDEN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**, 100 (1965).

Les chloroplastes des cellules foliaires renferment de l'inositol^{12,13} dont l'origine est à établir, car le manque de perméabilité de l'enveloppe chloroplastique à ce cyclohexane-hexol¹⁴ fait douter de sa provenance cytoplasmique. La proximité métabolique du glucose-6-phosphate et de l'inositol, et la présence intrachloroplastique du glucose-6-phosphate,¹⁵ déjà sollicité *in situ* par plusieurs enzymes,¹⁶ rendent possible la participation de l'organite photosynthétique à la synthèse de l'inositol qu'il contient.

Nous montrons dans ce travail que les chloroplastes de Pois sont capables, *in vitro*, de cycliser le glucose-6-phosphate. D'un milieu réactionnel contenant du (U-¹⁴C)glucose-6-phosphate nous avons pu isoler de l'(U-¹⁴C)inositol formé *de novo*, et observer des variations de sa production dans quelques cas où les conditions sont différentes. Dans ces expériences une poudre acétonique chloroplastique purifiée apporte le(s) enzyme(s) active(s). Il a été possible d'en extraire une protéine présentant une activité glucose-6-phosphate: D-inositol-1-phosphate cyclase.

RESULTATS

La biosynthèse de l'inositol procède de deux étapes principales:¹⁷ la cyclisation du glucose-6-phosphate, puis l'hydrolyse du D-myoinositol-1-phosphate, premier produit libre formé et origine de l'inositol, de ces dérivés et isomères.¹⁸

Mise en Evidence de la Synthèse d'(U-¹⁴C)Inositol par les Chloroplastes in vitro

Isolement et identification de l'(U-¹⁴C)inositol. L'(U-¹⁴C)inositol-1-phosphate formé dans le milieu réactionnel chloroplastique, en fin de réaction, se sépare difficilement de son isomère structural, l'(U-¹⁴C)glucose-6-phosphate; c'est pourquoi il est quantitativement hydrolysé en (U-¹⁴C)inositol sous l'action d'une phosphatase exogène, puis isolé par chromatographie sur papier. La pureté de l'(U-¹⁴C)inositol néoformé est contrôlée par les opérations suivantes; (a) dans chaque expérience du meso-inositol est ajouté après l'hydrolyse alcaline. Il chemine sur le chromatogramme avec l'(U-¹⁴C)inositol, et c'est la radioactivité présente à l'emplacement qu'il occupe qui est éluee et mesurée; (b) plusieurs solvants propres à la séparation du glucose et de l'inositol ont été essayés, l'(U-¹⁴C)inositol conserve le même taux de radioactivité quel que soit l'entraîneur utilisé; et (c) un dosage de glucose par la glucose oxydase¹⁹ assure qu'il n'y a pas de contamination de l'(U-¹⁴C)-inositol par l'(U-¹⁴C)glucose provenant de l'hydrolyse alcaline du (U-¹⁴C)glucose-6-phosphate, substrat en excès dans la réaction *in vitro*. La séparation est bonne à condition que les solutions analysées soient convenablement privées de sels et de protéines avant d'être chromatographiées.

Effet de la concentration en enzyme sur la quantité de (U-¹⁴C)inositol isolé. La capacité de la poudre acétonique chloroplastique, purifiée par dialyse, à incorporer une fraction de la radioactivité fournie par l'(U-¹⁴C)glucose-6-phosphate dans l'(U-¹⁴C)inositol est pré-

¹² V. IMHOFF, *Compt. Rend.* **270**, 2441 (1970).

¹³ V. IMHOFF et R. BOURDU, *Physiol. Vég.* **8**, 649 (1970).

¹⁴ C. T. WANG et P. S. NOBEL, *Biochim. Biophys. Acta* **241**, 200 (1971).

¹⁵ U. HEBER, K. A. SANTORIUS, M. A. HUDSON et U. W. HALLIER, *Z. Naturforschg.* **22b**, 1189 (1967).

¹⁶ U. HEBER, U. W. HALLIER et M. A. HUDSON, *Z. Naturforschg.* **22b**, 1200 (1967).

¹⁷ I. W. CHEN et F. C. CHARALAMPOUS, dans *Methods in Enzymology* (édité par W. A. WOOD), Vol. IX, p. 698, Academic Press, New York (1966).

¹⁸ P. DITTRICH et O. KANDLER, *Phytochem.* **11**, 1729 (1972).

¹⁹ J. H. PAZUR, dans *Methods in Enzymology* (édité par W. A. WOOD), Vol. IX, p. 82, Academic Press, New York (1966).

sentée dans le Tableau 1. La quantité d'(U-¹⁴C)inositol formé, évaluée en dpm, varie avec la quantité d'azote protéique mise en jeu. On constate qu'avec une valeur élevée de poudre protéique chloroplastique l'augmentation de radioactivité incorporée ne suit pas la proportionnalité initiale; ce qui peut s'expliquer soit par une insuffisance en glucose-6-phosphate, soit par une transformation du produit formé sous l'effet d'enzymes parasites. Quand le système protéique actif est porté à l'ébullition pendant 10 min avant d'être ajouté au milieu réactionnel, le taux d'incorporation de la radioactivité dans l'(U-¹⁴C)inositol est nul. Le β -NAD est le cofacteur de cyclisation du glucose-6-phosphate en inositol-1-phosphate, et tous les milieux cités contiennent 0,5 ou 1 mM de NAD. Pourtant nous constatons ici que 0,5 mM de NAD abaisse le taux d'incorporation de la radioactivité dans l'(U-¹⁴C)-inositol. Ce résultat sera discuté plus loin.

TABLEAU 1. EFFET DE LA CONCENTRATION EN ENZYME SUR LA SYNTHÈSE D'INOSITOL PAR LES CHLOROPLASTES ISOLÉS

Contenu en azote chloro- plastique (mg)	(U- ¹⁴ C)Inositol (dpm) avec NAD (0,54 mM)		Contenu en azote chloro- plastique (mg)	(U- ¹⁴ C)Inositol (dpm) avec NAD (0,54 mM)		Contenu en azote chloro- plastique (mg)	(U- ¹⁴ C)Inositol (dpm) avec NAD (0,54 mM)	
	sans NAD			sans NAD			sans NAD	
1,25	1950	1250	5,0	9350	4850	10,0	11560	7900

Les valeurs, en dpm, correspondent à l'(U-¹⁴C)inositol isolé d'un milieu réactionnel contenant dans 400 μ l: (U-¹⁴C)glucose-6-phosphate 10 mM (radioactivité spécifique $6,6 \times 10^5$ dpm/ μ mol), NAD 0 mM ou 0,5 mM, Mg^{2+} 2,5 mM, NH_4^+ 5 mM, NaF 1,25 mM, solution Tris-HCl pH 7,7 50 mM et les quantités indiquées en azote protéique chloroplastique. La réaction est effectuée à 37° pendant 60 min.

Effet des variations de pH sur la quantité d'(U-¹⁴C)inositol isolé. Le même tampon Tris-maléate a été utilisé dans une gamme de pH allant de 5,3 à 8,6, établie en présence du glucose-6-phosphate. Les concentrations en substrat et cofacteurs sont en excès par rapport à la quantité de protéine active et les autres conditions expérimentales sont celles indiquées dans le chapitre traitant du matériel et des méthodes. On constate une variation dans la production d'(U-¹⁴C)inositol, liée à la valeur du pH du milieu réactionnel; la courbe de variations de la quantité d'(U-¹⁴C)inositol formé en fonction des valeurs de pH imposées présente deux maxima, l'un pour une valeur $7,3 \pm 0,2$, l'autre pour une valeur $6,2 \pm 0,2$ (Fig. 1).

Effet de la concentration en glucose-6-phosphate sur la quantité d'(U-¹⁴C)inositol isolé. L'expérience a été réalisée au pH 7,3 favorable à la production d'inositol dans les conditions expérimentales adoptées. La concentration molaire en glucose-6-phosphate est variable dans chaque milieu réactionnel, mais l'activité radiochimique d'une μ moles de glucose 6-phosphate, la concentration des autres composants et les conditions expérimentales sont identiques. Pour l'incorporation de la radioactivité provenant du (U-¹⁴C)glucose-6-phosphate dans l'(U-¹⁴C)inositol isolé de chaque milieu, on observe que la synthèse d'(U-¹⁴C)-inositol augmente linéairement avec la concentration molaire en glucose-6-phosphate jusqu'à la valeur de 25 mM qui est la teneur maximum utilisée ici.

Formation d'Inositol-Phosphate par une Fraction Protéique Isolée des Chloroplastes

Un extrait protéique de la poudre acétonique est purifié par précipitation au sulfate d'ammonium, puis par chromatographie sur une colonne de Bio-gel A-15 m. Chaque

fraction éluée est utilisée comme source d'enzyme active dans un milieu réactionnel de composition semblable à celle des expériences précédentes, et le dosage de l'inositol-1-phosphate synthétisé est effectué directement sur une fraction aliquote.²⁰

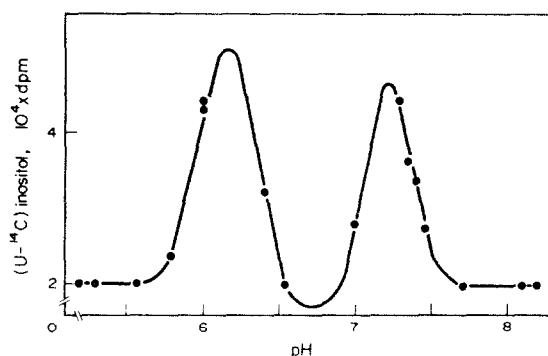


FIG. 1. EFFET DU pH SUR LA SYNTHÈSE D'INOSITOL PAR LES CHLOROPLASTES ISOLÉS.

Les valeurs en dpm correspondent à l'($U-^{14}C$)-inositol isolé d'un milieu réactionnel contenant dans 400 μ l: NAD 0 mM, glucose-6-P 10 mM (AS. 6×10^6 dpm/ μ mol) Mg^{2+} 5 mM, NH_4^+ 10 mM, NaF 2,5 mM, solution Tris-HCl pH 7,2 50 mM, 2 mg d'azote protéique d'une préparation acétonique vieillie de chloroplastes. La réaction est effectuée à 37° pendant 60 min.

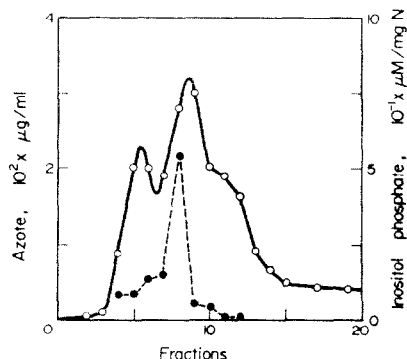


FIG. 2. FRACTIONNEMENT CHROMATOGRAPHIQUE D'UN EXTRAIT PROTÉIQUE DE CHLOROPLASTES DE POIS ET LOCALISATION DE L'ACTIVITÉ INOSITOL SYNTHÉTASE.

L'élution de la colonne de Bio-gel A 15 m est effectuée par une solution de Tris-HCl, 50 mM, pH 7,3, contenant 5 mM de β -mercaptoéthanol. Volume des fractions éluées 2,5 ml. \circ —concentration en protéine des différentes fractions; \bullet —activité de synthèse de l'inositol-1-phosphate dans les différentes fractions.

La Fig. 2 indique, d'une part, la concentration en protéines des diverses fractions éluées, d'autre part, les quantités d'inositol-1-phosphate que 1 mg de protéine est susceptible de former dans des conditions identiques. La fraction 8 possède une activité de synthèse apparente de l'ordre de 0,6 μ mol d'inositol-1-phosphate par mg d'azote et par heure, ce qui correspond à une purification de 30 fois par rapport à l'extrait brut.

DISCUSSION

Barnett et Corina²¹ signalent qu'une poudre acétonique contenant la glucose-6-phosphate: D-myoinositol-1-phosphate cyclase d'origine animale conserve seulement 10% de cette enzyme sous forme active après un mois; ainsi utiliser une poudre acétonique comme source enzymatique n'est sans doute pas un procédé de choix. Cependant le traitement à l'acétone de la préparation de chloroplastes intacts rend la membrane chloroplastique perméable, ce qui facilite, lors de la dialyse, l'élimination complète des molécules de faibles poids moléculaires, puis favorise au cours de la réaction enzymatique *in vitro* les contacts enzyme-substrat.

Dans les conditions expérimentales employées, les enzymes chloroplastiques qui utilisent

²⁰ J. E. G. BARNETT, R. E. BRICE ET D. I. CORINA, *Biochem. J.* **119**, 183 (1970).

²¹ J. E. G. BARNETT ET D. I. CORINA, *Biochem. J.* **108**, 125 (1968).

le glucose-6-phosphate comme substrat, ne gênent pas la mise en évidence de la cyclisation par les organites du glucose-6-phosphate en inositol. Cependant, dans quelques cas, l'isomérisation du glucose-6-phosphate n'est pas négligeable en regard de la production d'(U-¹⁴C)inositol: l'(U-¹⁴C)fructose produit, visible sur les radiochromatogrammes d'isolement de l'(U-¹⁴C)inositol, représente 2 % du (U-¹⁴C)glucose provenant de l'hydrolyse de (U-¹⁴C)-glucose-6-phosphate, alors que la production d'(U-¹⁴C)inositol n'est que de 1 %. Ces valeurs indiquent que la concentration en substrat reste largement excédentaire dans le milieu réactionnel.

Les résultats présentés montrent une production d'inositol dans un milieu réactionnel qui est le milieu d'efficacité ordinaire de la cycloaldolase; on en déduit que les chloroplastes possèdent la capacité de cycliser le glucose-6-phosphate. Le β -NAD est cofacteur de cette réaction; il est joint habituellement au milieu *in vitro*.^{7-11,17} Or les résultats du Tableau 1 font état d'un rôle inhibiteur du NAD dans notre système. Il s'agit, semble-t-il, d'une contradiction apparente. En effet les chloroplastes contiennent du NAD,²² que ni le traitement à l'acétone ni la dialyse n'éliminent, car l'étude du mécanisme de la cyclisation du glucose-6-phosphate²³⁻²⁶ montre que le NAD est lié très fortement à l'enzyme isolée et purifiée. Le système chloroplastique actif contient donc sûrement du NAD endogène. On sait d'autre part que le NAD intervient dans une réaction d'oxydo réduction d'intermédiaires de synthèse et on peut penser qu'une forte concentration de NAD freine cette étape oxydative et ralentit ainsi la formation d'inositol.

La courbe de synthèse de l'(U-¹⁴C)inositol en fonction du pH du milieu réactionnel présente deux maxima. Elle laisse entrevoir la possibilité d'intervention d'autres mécanismes fonctionnels de la production d'inositol; au pH 7,3 doit correspondre l'activité dominante de la glucose-6-phosphate cycloaldolase décrite par Chen et Charalampous pour les Levures¹⁰ ou par les auteurs qui extraient cette protéine enzymatique de matériel végétal^{17,8} et animal.¹¹ Mais l'hydrolyse du phosphatidylinositol s'effectue à un pH acide,²⁷ et une activité d'hydrolyse prédominante de ce phospholipide préformé pourrait être responsable du maximum de la courbe dans cette zone de pH.

Plusieurs fonctions métaboliques qui peuvent intéresser la dynamique chloroplastique ont été attribuées à l'inositol. Le myoinositol a été reconnu comme constituant végétal; le phosphatidylinositol en particulier constitue 10 % des phospholipides membranaires chloroplastiques;²⁸ l'inositol entre dans la composition de glycolipides complexes isolés de feuilles.²⁹ Mais son rôle de médiateur dans le métabolisme des glucides paraît de plus en plus important. Il sert, par exemple, d'intermédiaire dans la formation des acides uroniques et des pentoses court-circuitant leur synthèse par la voie de l'UDPG.³⁰ C'est d'autre part un puissant inhibiteur de l' α -galactosidase^{31,32} intervenant dans la mobilisation des galactolipides.³³

²² A. J. KEYS, *Biochem. J.* **108**, 1 (1968).

²³ I. W. CHEN et F. C. CHARALAMPOUS, *Biophys. Acta* **136**, 570 (1967).

²⁴ F. EISENBERG, *J. Biol. Chem.* **242**, 1375 (1967).

²⁵ W. R. SHERMAN, M. A. STEWART et M. ZINBO, *J. Biol. Chem.* **244**, 5703 (1969).

²⁶ A. RASHEED, D. L. CORINA et J. E. G. BARNETT, *Biochem. J.* **126**, 15 P (1972).

²⁷ P. K. KEMP, G. HÜBSCHER et J. N. HAWTHORNE, *Biochem. J.* **79**, 193 (1961).

²⁸ R. DOUCE, T. GUILLLOT-SALOMON, C. LANCE et M. SIGNOL, *Bull. Soc. Fr. Phys. Vég.* **14**, 351 (1968).

²⁹ H. E. CARTER et A. KISIC, *J. Lipid Res.* **10**, 356 (1969).

³⁰ F. LOEWUS, *Fed. Proc.* **24**, 855 (1965).

³¹ C. B. SHARMA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 572 (1971).

³² P. M. DEY et J. B. PRIDHAM, *Biochem. J.* **115**, 47 (1969).

³³ P. S. SASTRY et M. KATES, *Biochemistry* **3**, 1280 (1964).

EXPERIMENTALE

Matériel. Des graines de Pois (*Pisum sativum*, var. Alaska) sont mises à germer à l'obscurité à 20–25° pendant 6–8 jours; puis les plantes sont cultivées en salles conditionnées (60% humidité; 8 hr lumière: 15 000 lux, 16 hr d'obscurité) pendant 8 jours, sur milieu nutritif de Arnon,³⁴ à 20°.

Isolement des chloroplastes. Les feuilles sont prélevées, portées à 4°, broyées pendant 1 sec dans une solution de 15 mM de phosphate de sodium, pH 7,8, contenant 40 mM de sorbitol, 10 mM d'acétate de magnésium, 1 mM de glutathion, et 1 mM de L-cystéine. Après filtration sur gaze et nylon, le surnageant est centrifugé à 2500 *g* pendant 3 min. Les chloroplastes obtenus sont mis en suspension dans le milieu d'isolement à raison de 5 mg de chlorophylle pour 1 ml.

Préparation de la poudre acétonique. La suspension chloroplastique (vol. = 10 ml) est projetée goutte à goutte dans 200 ml d'acétone à 80% (v/v) maintenue en agitation constante à –10°, selon le procédé de Lennarz³⁵ et d'Ongun et Mudd.³⁶ Après 7–8 lavages à l'acétone 80% (v/v), les chloroplastes dépourvus de chlorophylle sont séchés sous vide dans un dessiccateur, puis stockés à 4°. Au moment de son emploi, la poudre acétonique sèche, devenue très hydrophobe, est remise en suspension dans une solution de Tris-HCl 50 mM pH 7,3, contenant 0,02% de digitonine ou 5 mM de β -mercaptoethanol. Elle est dialysée pendant 18–20 hr contre la solution de Tris-HCl 10 mM à 4°, et ainsi privée des molécules de faibles poids moléculaires. La suspension de poudre acétonique, dialysée, est utilisée comme source enzymatique dans la première série d'expériences.

Préparation d'un extrait enzymatique soluble. La poudre acétonique mise en suspension, dialysée, est centrifugée à 20 000 *g* pendant 10 min, puis à 100 000 *g* pendant 90 min. La fraction protéique précipitant entre 50 et 70%⁹ de saturation en sulfate d'ammonium est recueillie. Elle est dialysée une nuit contre une solution de Tris-HCl de pH 7,7 (1 mM).

Purification. 10 mg de cet extrait protéique actif sont placés au sommet d'une colonne de Bio-gel A 15 m, de volume total 60 ml. L'élution est effectuée par la solution de Tris-HCl, 5 mM, de pH 7,3, qui a servi à la confection de la colonne.

Milieu réactionnel. Le milieu réactionnel habituellement choisi est celui de Chen et Charalampous.¹⁷ 0,3–3 mg d'azote pour 1 mg de glucose-6-phosphate sont généralement utilisés. L'arrêt de la réaction est effectué en ajoutant 100 μ l d'alcool fort et en plaçant les tubes pendant 10 min à l'ébullition.

Isolement et évaluation de la radioactivité de l'(U-¹⁴C)inositol. Le milieu réactionnel est centrifugé à 50 000 *g*. Les résidus sont lavés à l'alcool 80% (v/v), trois fois. Les lavages alcooliques sont joints au surnageant de la centrifugation, concentrés, et étendus par une solution de Tris-acétate pH 8,8 contenant 10 U de phosphatase alcaline d'origine bactérienne. L'hydrolyse se prolonge pendant 2 hr, puis la réaction est arrêtée par addition de 50 μ l de TCA à 50%. Quelques μ g d'inositol entraîné sont ajoutés et la solution hydrolysée est passée sur des résines échangeuses d'ions Dowex-1 (X 8) et Dowex 50. La solution est concentrée et une fraction aliquote est chromatographiée sur papier Arches 302 dans l'un des solvants suivants: *n*-BuOH aqueux-EtOH 95%–trichloréthylène (6:2:2); acétone-H₂O (85:15); acétate d'éthyle-*n*-BuOH-HOAc-H₂O (3:4:2,5:4). La surface correspondant à l'inositol, repérée par révélation au NO₃Ag des deux bandes latérales du chromatogramme, est découpée, élue, et sa radioactivité est évaluée dans une solution de mélange scintillant de Bray,³⁷ au scintillateur, avec une efficacité de 65%. Le nombre d'impulsions est de 10 fois supérieur au bruit de fond.

Dosage de l'inositol-1-phosphate. Ce dosage s'effectue selon la méthode de Barnett²⁰ qui permet d'évaluer l'activité enzymatique des fractions d'élution obtenues à la sortie de la colonne de Bio-gel A.

Autres méthodes analytiques. Le taux de chlorophylle est mesuré selon la méthode d'Arnon.³⁸ Les dosages d'azote de la suspension chloroplastique sont effectués selon Umbreit et Burris.³⁹ Dans les solutions protéiques purifiées l'azote est évalué spectrométriquement.⁴⁰

³⁴ D. I. ARNON, *Am. J. Bot.* **25**, 322 (1938).

³⁵ W. J. LENNARZ et B. TALAMO, *J. Biol. Chem.* **241**, 2707 (1966).

³⁶ A. ONGUN et J. B. MUDD, *J. Biol. Chem.* **243**, 1558 (1968).

³⁷ G. A. BRAY, *Analyt. Biochem.* **1**, 279 (1960).

³⁸ D. I. ARNON, *Plant Physiol.* **24**, 1 (1949).

³⁹ W. W. UMBREIT et R. H. BURRIS, dans *Manometric Techniques* (édité par W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS et J. F. STAUFFER), p. 208, Burgess, Minneapolis (1964).

⁴⁰ J. B. MURPHY et M. W. KIES, *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 382 (1960).