

LA DESOXYCYTIDINE AMINOHYDROLASE DES FEUILLES DE *ZEa MAYS*

F. LE FLOC'H et A. GUILLOT*†

Groupe de Recherche de Biologie et Physiologie Végétales, Université de Clermont-Ferrand, 4, rue Ledru,
63000 Clermont-Ferrand, France

(Received 23 January 1974)

Key Word Index—*Zea Mays*; Gramineae; corn; deoxycytidine aminohydrolase; deoxyuridine; 5-bromo-deoxyuridine; uridine; 5-bromodeoxycytidine; arabinosyl-cytosine; cytidine.

Abstract—Deoxycytidine aminohydrolase was extracted from *Zea Mays* leaves and purified 22-fold. The extract deaminates deoxycytidine, cytidine, 5-methyldeoxycytidine, 5-bromodeoxycytidine and arabinosylcytosine. Its molecular weight was estimated to be 77 000–78 000 based on the elution pattern from Sephadex G100 and G200. Kinetic studies indicated that the hydrolysis of the substrates proceeds at rates which can formally be described by Michaelis–Menten kinetics. *p*-Chloromercuribenzoate inhibits deoxycytidine aminohydrolase activity, as do mercaptoethanol and dithiothreitol. The activity is also inhibited by deoxyuridine (mixed type), uridine (non competitive), 5-bromodeoxyuridine (competitive).

INTRODUCTION

ON CONNAIT actuellement 4 types d'enzymes pouvant intervenir dans la désamination de la cytosine ou de ses dérivés: cytosine aminohydrolase, cytidine et désoxycytidine aminohydrolase, désoxycytidine monophosphate aminohydrolase^{1,2} et désoxycytidine triphosphate aminohydrolase.³

Beaucoup d'organismes semblent pouvoir posséder au moins deux de ces enzymes: trois, par exemple, chez *Salmonella typhimurium* (cytosine désaminase, cytidine et désoxycytidine désaminase, désoxycytidine triphosphate désaminase)^{1,3} et deux chez les vertébrés (cytidine et désoxycytidine désaminase^{4,5} et désoxycytidine monophosphate désaminase).² Par contre les végétaux supérieurs semblent bien ne pouvoir désaminer la cytosine que sous la forme de nucléoside puisqu'aucune cytosine désaminase, ni cytosine–nucléotide désaminase n'a jamais été signalée chez ces organismes. Cette situation confère une importance toute particulière à l'enzyme correspondante qui a été signalée ou étudiée chez plusieurs

* Présente adresse: Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté des Sciences, Université François Rabelais, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France.

† Avec la collaboration technique appréciée de Madame S. Genestier.

¹ O'DONOVAN, G. A. and NEUHARD, J. (1970) *Bactériol. Rev.* **34**, 278.

² BALIS, M. E. (1968) *Antagonists and Nucleic Acids*. North Holland, Amsterdam.

³ NEUHARD, J. and THOMASSEN, E. (1971) *J. Bactériol.* **105**, 657.

⁴ TOMCHICK, R., SASLAW, L. D. and WARAVDEKAR, V. S. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 2534.

⁵ WISDOM, G. B. and ORSI, B. A. (1969) *European J. Biochem.* **7**, 223.

espèces.⁶⁻¹¹ En effet, la désamination de la cytosine ou de ses dérivés peut jouer deux rôles dans le métabolisme des nucléotides pyrimidiques: d'une part dans le catabolisme de la cytosine (celle-ci pouvant être sous forme libre ou combinée), d'autre part, dans la biosynthèse de la désoxythymidine triphosphate¹ et la régulation de la composition du pool des désoxyribonucléotides triphosphates.² Alors que ces deux rôles peuvent être tenus par des enzymes différentes chez des organismes bactériens ou animaux, chez les végétaux supérieurs ils devraient être assurés par la désoxycytidine aminohydrolase qu'on peut provisoirement assimiler à la cytidine aminohydrolase figurant dans la nomenclature internationale sous le numéro E.C. 3.5.4.5.

Ces remarques nous ont incité à entreprendre une étude de cette enzyme chez le Maïs où sa présence a été signalée antérieurement;¹¹ nous rapportons ici les premiers résultats obtenus.

TABLEAU I. PURIFICATION PARTIELLE DE LA DESOXYCYTIDINE DESAMINASE DE FEUILLES DE MAÏS (Poids de matière fraîche = 200 g)

Fraction	Traitement	Volume (ml)	Protéines (mg)	Activité (μ M/hr)	Rendement (%)	Activité spécifique (μ M/hr/mg)	Facteur de purification
I	Extrait protéique brut	200	742.0	160.0	100	0.21	1
II	(NH ₄) ₂ SO ₄ : 35-50%	46	154.8	78.0	49	0.50	2.4
III	Adsorption négative sur gel de phosphate	43	64.5	62.0	39	0.96	4.6
IV	Adsorption positive sur gel de phosphate	40	22.2	36.8	23	1.65	7.9
V	DEAE-cellulose	30	6.0	28.0	18	4.66	22.2

RESULTATS ET DISCUSSION

Purification

La purification de l'extrait brut a été exécutée selon le tableau I. Les techniques sont décrites dans la partie expérimentale. Le comportement de la désoxycytidine aminohydrolase de Maïs au cours du fractionnement par le sulfate d'ammonium est très voisin de celui observé par les auteurs ayant utilisé ce procédé de purification.^{4,7,8} La perte d'activité observée au cours de cette opération (50% de l'activité totale de la fraction I) est dûe seulement pour une faible part (10% de l'activité totale de la fraction I) à la présence d'enzyme dans les fractions 0-35 et 50-70% de saturation; le reste doit être imputé sans doute à une dénaturation partielle de l'enzyme.

⁶ Hotta, Y. and Stern, H. (1961) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 279.

⁷ Frisch, D. M. and Charles, M. A. (1966) *Plant Physiol.* **41**, 475.

⁸ Achar, B. S., Maller, R. K. and Vaidyanathan, C. S. (1966) *Indian J. Biochem.* **3**, 133.

⁹ Laland, S., Steinsolt, G. and Mürer, E. H. (1959) *Proc. Fourth Int. Congr. Biochem.* sect. 4, 41, Pergamon Press, Oxford.

¹⁰ Murray, M. G. and Ross, C. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2645.

¹¹ Wanka, F. and Bauer, F. W. (1967) *Z. Pflanzen Physiol.* **58**, 175.

La perte observée au cours de l'adsorption positive sur gel de phosphate correspond à une non-désadsorption d'une partie de l'enzyme fixée sur gel, mais toute modification des conditions d'élution entraîne une forte baisse de l'activité spécifique.

La purification par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose a présenté quelques difficultés. Cette opération ne peut, en effet, être réussie que si la force ionique initiale est suffisamment élevée (tampon phosphate 0.1 M). A molarité initiale plus faible (0.02 M), l'enzyme est éluée beaucoup plus tard que dans le procédé retenu, mais sous une forme si instable que 48 h plus tard les fractions contenant la desoxycytidine aminohydrolase ne présentent plus aucune activité de ce type. Cette particularité est très probablement à l'origine des échecs subis par Achar *et al.*⁸ et Tomchick *et al.*⁴ dans leurs essais de purification de la même enzyme, extraite de *Phascolus aureus* et de rein de souris respectivement, sur colonne de DEAE-cellulose. Les profils d'élution présentent par ailleurs toujours un épaulement très net en fin de pic, ce qui suggère l'existence d'isozymes. Seule la première partie du pic, la plus importante quantitativement, a été conservée pour constituer la fraction V.

D'autres procédés de purification (tamisage moléculaire sur gels Sephadex de diverses porosités, absorption différentielle sur hydroxyapatite ou ammonium sulfate, précipitation acide fractionnée) ont été essayés, jusqu'ici sans résultats intéressants.

Stabilité

Comme Widsom et Orsi,⁵ nous avons observé que l'enzyme est relativement peu stable: conservée à +4°, elle perd la moitié de son activité en 30 jours. Elle est peu stable aux pH inférieurs à 5.0 (50% d'inactivation en tampon acétate pH 4.5 en 30 mn à 0°) et supérieure à 8.0 (50% d'inactivation en tampon Tris-HCl pH 9.0 en 30 mn à 0°) et aux températures supérieures à +50° (50% d'inactivation en 30 mn à +60° à pH 7.5).

Stœchiométrie. Influence de la température et du pH

Il a été vérifié que, pour 1 μ M de substrat désaminé, il apparaît effectivement 1 μ M d'ammoniac. L'activité enzymatique (Fraction III) en fonction de la température, a été mesurée par la méthode Ib. La courbe observée, voisine de celle obtenue par Achar *et al.*,⁸ présente un optimum entre 50 et 60°. L'activité enzymatique (Fraction III) en fonction du pH a été mesurée par la méthode Ia entre les pH 6.5 et 10.0 et par la méthode Ib entre les pH 4.5 et 7.5. L'utilisation de la méthode Ib est rendue nécessaire par la précipitation progressive des protéines aux pH inférieurs à 6.0. Les tampons employés sont les tampons acétate (pH 4.5 à 5.5); phosphate (pH 5.6 à 7.0); Tris-HCl (pH 7.5 à 9.0); carbonate-bicarbonate (pH 9.0 à 10.0), tous à la même molarité (0.2 M). La courbe de l'activité enzymatique en fonction du pH diffère sensiblement de celles obtenues par les autres auteurs^{4,8,12} en présentant une large zone optimale entre 7 et 8 au lieu d'un pic assez étroit à pH 7, mais il faut noter que dans les trois cas cités, le substrat utilisé était la cytidine et non la desoxycytidine.

Poids moléculaire

Le poids moléculaire de la desoxycytidine aminohydrolase a été déduit de son comportement sur colonnes de Sephadex G 100 et G 200.¹³ Les substances témoins étaient: dextrane bleu (Pharmacia Fine Chemicals), alcool deshydrogénase (Boehringer), sérum albu-

¹² IPATA, P. L., CERCIGNANI, G. and BALESTRI, E. (1970) *Biochemistry* 9, 3390.

¹³ DETERMANN, H. (1969) *Chromatographie Sur Gel* Masson, Paris.

mine de boeuf (Sigma), trypsine (Boehringer), cytochrome c (Fluka). Les résultats obtenus sur les deux types de gels sont très voisins: respectivement 77 000 et 78 000, valeurs plus élevées que celles mesurées par Murray et Ross¹⁰ chez le Pois (47 000) et par Ipata *et al.*¹² chez la levure (57 000).

Spécificité

L'extrait enzymatique obtenu ne montre pas de propriétés désaminantes vis à vis des substances suivantes: cytosine, 5-bromocytosine, 2-thiocytosine, 2-amino-4 méthylpyrimidine, guanosine, désoxyguanosine, désoxyadénosine, désoxycytidine monophosphate. Par contre, comme l'enzyme de foie de mouton,⁵ il désamine non seulement la désoxycytidine, mais aussi la cytidine, la 5-méthyl-désoxycytidine, la 5-bromodésoxycytidine et l'arabinosylcytosine, ces activités pouvant relever ou non de la même enzyme. Les travaux d'Achar *et al.*⁸ suggérant que cytidine et désoxycytidine sont désaminées par la même enzyme, on peut supposer qu'il en est de même ici et qu'une seule et même enzyme désamine tous les substrats cités.

Cinétique

L'examen des graphes tracés en coordonnées inverses selon la méthode de Lineweaver et Burk conformément aux équations de régression calculées à partir des données expérimentales montre que la vitesse de désamination des divers substrats peut être décrite selon le formalisme michaelien.

TABLE 2. PARAMETRES CINETIQUES POUR LES DIFFERENTS SUBSTRATS DE LA DEOXYCYTIDINE AMINOHYDROLASE

Substrat	Fractions enzymatiques utilisées	K_m Nombre de mesures	Valeur moyenne (mM/l.)	V_m (substrat)
				V_m (désoxycytidine) (moyenne de 3 déterminations utilisant la fraction IV)
5-Bromodésoxycytidine	III	2	0.056	0.7
Désoxycytidine	III-IV-V	2-2-3	0.23	1.0
5-méthyl-désoxycytidine	V	2	0.31	1.2
Cytidine	III-V	2-2	0.55	1.5
Arabinosylcytosine	III	2	0.38	0.3

Les valeurs de K_m (calculées à l'aide des équations de régression) ne semblent pas varier significativement au cours de la purification; c'est pourquoi les moyennes figurant au Tableau 2 ont été éventuellement établies à partir de toutes les données disponibles. L'examen de ce tableau montre que l'enzyme présente des affinités apparentes assez voisines pour les divers substrats, à l'exception de la 5-bromodésoxycytidine pour laquelle l'enzyme présente une affinité beaucoup plus élevée. Comme Wang *et al.*¹⁴ et Achar *et al.*⁸ nous trouvons une affinité apparente environ 2 fois plus élevée pour la désoxycytidine que pour la cytidine, les autres auteurs notant des valeurs similaires de K_m pour ces deux substrats.^{4,5,7} Mais alors que l'enzyme de foie de mouton⁵ a une affinité 5 fois plus faible pour la 5-bromodésoxycytidine que pour la désoxycytidine, celle du Maïs présente au contraire une affinité 4 fois plus élevée pour cet antimétabolite que pour le métabolite normal. De même, les enzymes de foie de mouton⁵ et de rein de souris⁴ ont une affinité respectivement environ 4 et 14 fois plus basse pour l'arabinosylcytosine que pour les métabolites naturels

¹⁴WANG, T. P., SABLE, H. Z. and LAMPEN, J. O. (1950) *J. Biol. Chem.* **184**, 17.

correspondants, tandis que l'enzyme de Maïs a des affinités assez voisines pour ces divers substrats.

Les V_m ont été calculées grâce à l'équation de Michaelis-Menten à partir de mesures de l'activité enzymatique exécutées selon la méthode II (voir Expérimentale) en utilisant la même préparation enzymatique pour tous les substrats. Les valeurs de V_m varient en fonction de la nature des substrats (Tableau 2) dans des sens opposés à ceux qui ont été observés par Wisdom et Orsi,⁵ sauf en ce qui concerne la cytidine. Dans le cas présent, si l'on met à part l'arabinosylcytosine, les valeurs de K_m et de V_m varient dans le même sens en fonction de la nature des substrats, de sorte que dans les conditions habituelles d'incubation (pH 7.5, + 38°, 1 μ M de substrat dans 3 ml de tampon phosphate 0.066 M), tous les substrats sont désaminés à peu près à la même vitesse, à l'exception de l'arabinosylcytosine dont la désamination est 4 fois plus lente.

Inhibition par les réactifs des thiols et les thiols

L'iodoacétamide (1 mM/l.) n'a pas d'influence sur l'activité desoxycytidine aminohydrolase. Par contre le *parachloromercuribenzoate* (50 μ M/l.) inhibe à 50% cette activité, résultat assez voisin de ceux obtenus par d'autres auteurs.^{4,5,8,12} Ceci suggère que, chez toutes les cytosine-nucléosides aminohydrolases, au moins une fonction thiol de l'enzyme doit être libre pour permettre son fonctionnement. Mais contrairement à d'autres auteurs,^{4,8} nous n'avons pu lever cette inhibition par un apport de glutathion.

Les thiols sont en effet par eux-mêmes inhibiteurs de la réaction enzymatique étudiée: à 10 mM/l. le mercaptoéthanol inhibe l'activité enzymatique à 75% et le dithiothréitol à 100%. Cette propriété ne semble pas avoir été signalée pour les cytosine-nucléosides aminohydrolases d'autres sources. Dans tous les cas, l'effet inhibiteur disparaît si on élimine la substance à fonction thiol par tamisage moléculaire sur Sephadex G25 médium. Ceci suggère que la présence de thiols entraîne la rupture de ponts disulfures stabilisant la conformation active de l'enzyme, à moins que, mais ceci paraît moins probable, ces substances n'inhibent directement le mécanisme réactionnel lui-même.

Inhibition par excès de substrat

Ipata *et al.*¹² signale que la cytidine aminohydrolase de levure est sensible à une inhibition par le substrat aux concentrations supérieures à 0.5 mM/l. La forme de nos graphes tracés selon la méthode de Lineweaver et Burk, obtenus grâce à des mesures spectrophotométriques de la vitesse initiale (méthode I: voir Expérimentale), suggéraient qu'il en était de même ici pour la desoxycytidine et la cytidine aux concentrations supérieures à 0.8 mM/l.

Vérifications faites, il s'agit en réalité dans les deux cas d'un artefact lié au non-respect de la loi de Beer-Lambert aux concentrations supérieures à 0.8 mM/l. Des mesures spectrophotométriques d'activité enzymatique réalisées après dilution des incubats ont montré que, en réalité, même à une concentration de 3 mM/l., il n'y a pas d'inhibition par excès de substrat dans les cas étudiés ici.

Inhibition par le produit

La desoxyuridine inhibe la désamination de la desoxycytidine catalysée par la desoxycytidine aminohydrolase. Mais alors que les inhibitions par le produit sont le plus souvent du type compétitif,⁵ l'inhibition observée ici est d'un type mixte comme le montre le graphe tracé en coordonnées inverses selon la méthode de Lineweaver et Burk. La valeur de K_i

déterminée graphiquement par la méthode de Dixon est d'environ 0.37 mM/l. (moyenne de 2 déterminations).

L'uridine et la 5-bromodésoxyuridine qui peuvent être considérées comme des analogues structuraux de la désoxyuridine, inhibent aussi l'activité désoxycytidine aminohydrolase, mais dans le premier cas, l'inhibition est du type non compétitif, tandis que, dans le second, elle est du type compétitif; les valeurs de K_i estimées par la méthode de Dixon sont respectivement 3.6 mM/l. et 0.43 mM/l. (moyennes de deux déterminations).

Bien que ces résultats suggèrent l'existence d'au moins 2 sites de fixation de ligands sur la désoxycytidine aminohydrolase, il serait hasardeux de tirer des conclusions précises sur le mécanisme de l'inhibition exercée par la désoxyuridine en se fondant sur la seule considération des caractéristiques cinétiques décrites ici.

Ces résultats montrent du moins que la désoxycytidine désaminase constitue un site d'action possible pour la 5-bromodésoxyuridine, ce qui ne semble pas avoir été signalé jusqu'ici. Cependant rien ne prouve qu'une telle intervention à ce niveau puisse jouer efficacement *in vivo*, dans la mesure où peuvent être aussi présents des systèmes enzymatiques aptes à utiliser la 5-bromodésoxyuridine (thymidine kinase et thymidine phosphorylase) et présentant pour celle-ci une affinité plus élevée que celle de la désoxycytidine aminohydrolase. D'autre part la valeur très élevée de la K_i de l'uridine rend improbable son intervention dans la régulation de l'activité désoxycytidine aminohydrolase *in vivo*, intervention dont on ne verrait d'ailleurs pas l'intérêt physiologique. Par contre la valeur de la K_i de la désoxyuridine (0.37 mM/l.) est voisine de la K_m de la désoxycytidine (0.23 mM/l.). On peut donc envisager un certain rôle de cette inhibition par le produit dans la régulation de l'activité désoxycytidine aminohydrolase *in vivo*; la vitesse de désamination de la désoxycytidine dépendrait alors dans une certaine mesure de la vitesse d'utilisation du produit, c'est-à-dire en définitive de la présence et du fonctionnement de la thymidine kinase ou de la thymidine phosphorylase.

Cependant si la désoxycytidine aminohydrolase tient vraiment une place importante dans la régulation de la composition du pool de désoxyribonucléotides triphosphates en intervenant dans la biosynthèse de la désoxythymidine triphosphate, il paraît peu probable que cette enzyme ne possède pas des propriétés régulatrices mieux adaptées à ce rôle que l'inhibition par le produit observée ici. La désoxycytidine désaminase de foie de mouton⁵ est jusqu'ici la seule enzyme de ce type pour laquelle on ait montré d'intéressantes propriétés régulatrices (inhibition par la désoxythymidine triphosphate, activation par la désoxycytidine triphosphate) s'accordant avec l'hypothèse envisagée. Bien que les premiers essais effectués pour détecter des propriétés régulatrices analogues chez l'enzyme de Maïs ne soient guère encourageants, des recherches plus approfondies devront être entreprises dans cette direction.

EXPERIMENTALE

Obtention du matériel biologique. Les feuilles de Maïs (*Zea Mays* L. var. Dekalb 404) sont récoltées, 7-8 jours après le semis, sur des plantes cultivées sur vermiculite, à 28°, à l'obscurité, puis pesées et congelées dans l'air liquide.

Extraction. Elle est conduite selon la méthode de Loomis et Battaile.¹⁵ L'homogenat obtenu est centrifugé à 3000 *g* et le surnageant additionné de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 70% de saturation. Les protéines précipitées sont redissoutes, après séparation par centrifugation à 25000 *g*, dans du tampon phosphate pH 7.5, 0.02 M. La solution obtenue est alors désalée sur colonne de Sephadex G25 médium. Cette solution désalée constitue l'extrait protéique brut (fraction I).

¹⁵ LOOMIS, W. D. and BATTAILLE, J. (1966) *Phytochemistry* **5**, 423.

Purification. L'extrait protéique brut est soumis à une précipitation fractionnée par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et la fraction obtenue entre 35 et 50% de saturation seule conservée (fraction II). Après désalage et ajustement du pH à 7.5 (0.02 M), la fraction II subit une adsorption négative sur gel de phosphate Sigma (30 mg/mg protéines) à 0° pendant 15 min. Le surnageant obtenu après centrifugation (fraction III) et ajustement du pH à 5.7 subit alors une adsorption positive sur gel de phosphate exécutée dans les mêmes conditions que l'adsorption négative (sauf en ce qui concerne le pH). L'enzyme est ensuite éluee par du tampon phosphate pH 7.5, 0.05 M (fraction IV). L'eluat est enfin chromatographié sur colonne de DEAE-cellulose Whatman DE-32 (25 × 100 mm). L'élution est exécutée en milieu tampon phosphate 0.1 M à pH 7.5 à l'aide d'un gradient de concentration en NaCl de forme concave (0 à 1.5 M); ce gradient est obtenu en remplissant chacune des 3 premières chambres d'un appareil Vari-grad de tampon phosphate 0.1 M (120 ml par chambre) et la 4ème du même tampon additionné de NaCl 1.5 M. Les fractions contenant la majeure partie de l'activité enzymatique constituent la fraction V utilisée dans la plupart des expériences décrites ici.

Dosage des protéines. Il est exécuté selon la méthode de Lowry *et al.*¹⁶ en utilisant l'albumine du sérum de boeuf comme référence.

Mesure de l'activité enzymatique. Les conditions d'incubation sont les suivantes: 38°, pH = 7.5. Le milieu d'incubation (3 ml) contient 0.2 mM de phosphate Na, 1 μ M de substrat (désoxycytidine dans la plupart des expériences) et la solution enzymatique (0.5 ml en général). L'activité enzymatique a été mesurée selon deux méthodes différentes: *Méthode I:* Le plus souvent a été utilisée une méthode spectrophotométrique fondée sur la différence d'absorption en UV des substrats aminés et des produits correspondants désaminés. La méthode consiste à déterminer la diminution de D.O. (qui est proportionnelle à la variation de concentration en substrat) à une longueur d'onde convenable (290 nm pour la désoxycytidine, la cytidine, l'arabinosylcytosine, 295 nm pour la 5-méthyl-désoxycytidine, 310 nm pour la 5-bromodésoxycytine). Cette méthode a été appliquée selon deux modalités: *méthode Ia:* l'incubation a lieu dans le compartiment thermostaté de cuves du spectrophotomètre; la variation de la D.O. des mélanges incubés est enregistrée en fonction du temps, et la vitesse initiale est déterminée à l'aide de cet enregistrement; *méthode Ib:* dans certains cas (études de l'influence de la température et de celle du pH dans la zone acide sur l'activité enzymatique), la méthode spectrophotométrique a été employée ainsi: les incubations sont réalisées au bain-marie thermostaté; après 30 min d'incubation, on ajoute 0.5 ml de NaOH *N* dans chaque essai; on mesure alors la densité optique à 290 nm, ce qui permet de calculer la diminution de D.O. due à la désamination enzymatique de la désoxycytidine. Bien que cette méthode ne permette pas une détermination de la vitesse initiale aussi exacte que la méthode précédente, elle en donne cependant une approximation suffisante pour les études concernées. *Méthode II:* lors de quelques expériences (détermination de la K_m de l'arabinosylcytosine, mesure des V_m , inhibition par la 5-bromodésoxycytidine) a été employée une méthode colorimétrique qui consiste à doser l'ammoniac apparu en un temps donné (25 ou 30 min) par le réactif de Nessler.

¹⁶ LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, J., FARR, A. L. and RANDALL R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **220**, 265.