

BBA 47040

## EVOLUTION DES ADENOSINE PHOSPHATES ET DE LA CHARGE ENERGETIQUE DANS LES COMPARTIMENTS CHLOROPLASTIQUE ET NON-CHLOROPLASTIQUE DES FEUILLES DE BLE

ADNEN SELLAMI

*Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée, Université Pierre et Marie Curie, Tour 53, 4, place Jussieu, 75230, Paris Cedex 05 (France)*

(Reçu le 3 juin, 1975)

### SUMMARY

#### *Changes in adenosine phosphates and energy charge in chloroplastic and non-chloroplastic compartments of wheat leaves*

Changes in the adenine nucleotides and energy charge ( $= (\text{ATP}) + 1/2(\text{ADP}) / (\text{AMP}) + (\text{ADP}) + (\text{ATP})$ ) levels were studied in chloroplastic and non-chloroplastic compartments using non-aqueously isolated wheat leaves chloroplasts. The two adenine nucleotides pools (of chloroplasts and non-chloroplastic part of the cell), though distinct, are linked. This linkage substantiates an energy-rich bond exchange between the two compartments.

When both photophosphorylation and oxidative phosphorylation occur simultaneously, energy charge takes high values, generally higher than 0.80. When neither oxidative phosphorylation nor photophosphorylation occur, energy charge is very low and takes values generally lower than 0.45. When one compartment alone produces  $\sim P$ , energy charge in the two compartments takes intermediate values which remain relatively high.

Dark-light transition in nitrogen resulted in changes of the AMP, ADP and ATP levels which quickly reach a steady state. Chloroplast energy charge shifts rapidly from 0.45 to 0.75 in 10 s; after 1 min it reaches 0.86, a value that corresponds to a steady level. In the cytoplasm, energy charge changes from 0.44 to 0.71 in 1 min. Energy charge increase in the non-chloroplastic compartment substantiates an energy transfer from chloroplasts to the cytoplasm.

On nitrogen-air transition in the dark, the cytoplasm energy charge reaches a steady level in 30 s. In chloroplasts, it also increases but slowly. There is indeed a transfer of energy from cytoplasm to chloroplasts.

Darkening of the leaves in air causes a drastic and lasting drop of energy charge in the chloroplasts where it has a low value after 5 min in the dark. Then it increases again but slowly and is still lower than 0.70 after 10 min in the dark. Meanwhile, energy charge in cytoplasm keeps values higher than 0.75.

Metabolic regulation by energy charge and control of adenine nucleotides level by adenylate kinase (EC 2.7.4.3) are discussed.

## RESUME

Nous avons étudié l'évolution du niveau des nucléotides adényliques et de la charge énergétique ( $= (ATP) + 1/2(ADP)/(AMP) + (ADP) + (ATP)$ ) dans les compartiments chloroplastique et non-chloroplastique des feuilles de Blé après fractionnement cellulaire en milieu apolaire. Les deux pools de nucléotides du chloroplaste et du reste de la cellule, quoique distincts, sont liés. Ce fait s'explique par un échange de liaisons riches entre les deux compartiments.

Lorsque l'oxydation phosphorylante et la photophosphorylation peuvent produire simultanément des  $\sim P$ , la charge énergétique prend des valeurs élevées, généralement supérieures à 0,80. Lorsque ni l'oxydation phosphorylante ni la photophosphorylation ne participent à la fourniture de liaisons riches, la charge énergétique est très basse et prend des valeurs généralement inférieures à 0,45. Quand un seul compartiment est le siège de phosphorylation, la charge énergétique des deux compartiments prend des valeurs intermédiaires mais relativement élevées.

Quand on passe de l'obscurité à la lumière dans l'azote les niveaux des trois nucléotides adényliques, dans les deux compartiments, évoluent rapidement vers un état presque stable. Dans le chloroplaste la charge énergétique augmente très rapidement et passe en 10 s de 0,45 à 0,75; au bout de 1 min, elle atteint 0,86, valeur qui correspond à un niveau d'équilibre. Dans le cytoplasme, elle passe de 0,44 à 0,71 en 1 min. La remontée de la charge énergétique dans le compartiment non-chloroplastique indique un transfert d'énergie du chloroplaste vers le cytoplasme.

Quand on passe de l'azote dans l'air à l'obscurité, la charge énergétique du cytoplasme atteint son niveau d'équilibre en 30 s. Dans le chloroplaste, elle augmente également mais lentement. Il y a donc transfert d'énergie du cytoplasme vers le chloroplaste.

La suppression de l'éclairement dans l'air provoque une chute brutale et durable de la charge énergétique dans le chloroplaste où elle a toujours une valeur faible après 5 min d'obscurité; elle ne remonte que très lentement et reste inférieure à 0,70 après 10 min d'obscurité. Pendant tout ce temps, elle garde des valeurs élevées dans le cytoplasme, toujours supérieures à 0,75.

La régulation métabolique par la charge énergétique et le contrôle du niveau des nucléotides adényliques par l'adénylate kinase sont discutés.

## INTRODUCTION

Les nucléotides adényliques jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique. L'équilibre entre leurs différents représentants est régi par l'adénylate kinase (EC 2.7.4.3) qui contrôle la réaction:



L'étude, *in vitro*, de l'adénylate kinase extraite de tissus animaux [1] a montré que cet enzyme a une constante d'équilibre voisine de 1. Cette particularité lui fait jouer un rôle stabilisateur du niveau énergétique de la cellule et lui permet une mobilisation des liaisons pyrophosphates en  $\beta$ .

Atkinson et Walton [2] comparent le système adénylique à un accumulateur électrochimique qui serait complètement chargé quand il n'y a que de l'ATP et

complètement déchargé quand seul l'AMP est présent. Ils ont montré comment, si on admet un équilibre régi par l'adénylate kinase, les concentrations en AMP, ADP et ATP varient en fonction de la charge énergétique (Energy charge) qu'ils définissent de la façon suivante:

$$\text{Energy charge} = (\text{ATP}) + \frac{1}{2}(\text{ADP}) / (\text{AMP}) + (\text{ADP}) + (\text{ATP})$$

Pradet et Bomsel [3] et Bomsel et Pradet [4] considèrent plutôt le rapport  $\epsilon/\Sigma$  où  $\epsilon = 2(\text{ATP}) + (\text{ADP})$  et  $\Sigma = (\text{ATP}) + (\text{ADP}) + (\text{AMP})$

En accord avec Atkinson, Pradet [5] propose le rapport  $\epsilon/2\Sigma$ , que nous utiliserons, pour désigner la charge énergétique.

Comparant les équilibres apparents observés dans des feuilles de Blé maintenues dans différentes conditions aux courbes théoriques Bomsel et Pradet [4] ont conclu à l'intervention active de l'adénylate kinase dans ce matériel. Or, dans les tissus végétaux verts, l'énergie chimique est produite par oxydation phosphorylante au niveau des mitochondries et par photophosphorylation au sein des chloroplastes. On peut, alors, se demander si dans la cellule chlorophyllienne il n'y a qu'un seul pool de nucléotides adényliques ou s'il y en a deux. Dans le cas où il existe deux pools distincts, on peut se demander s'ils sont liés ou totalement indépendants. On peut se demander aussi quels peuvent être les moyens dont dispose la cellule pour contrôler la production et la consommation d'énergie.

Le problème de l'échange, *in vivo*, de liaisons riches entre les chloroplastes et le reste de la cellule a été abordé pour la première fois, par Santarius et al. [6]. Santarius et Heber [7] et Heber et Santarius [8] ont déjà conclu à un "transfert effectif" de l'ATP et de l'ADP d'un compartiment cellulaire à un autre. Mais, ces auteurs n'ont pas pu doser l'AMP dans les chloroplastes et le cytoplasme ou, dans d'autres expériences, l'AMP, l'ADP et l'ATP du cytoplasme. Ils n'ont pas pu, de ce fait, mesurer correctement la taille de chacun des deux pools chloroplastique et non-chloroplastique et évaluer convenablement l'échange de nucléotides totaux entre les deux compartiments. Heber [9] a, par la suite, surtout mis l'accent sur l'échange des nucléotides par transfert indirect des liaisons riches.

Le travail que nous allons présenter concerne une étude des équilibres des nucléotides adényliques dans les chloroplastes et le reste de la cellule, quand des feuilles de Blé détachées sont placées dans des conditions stables ou au cours de "transitions". Nous verrons comment on peut mettre en évidence, *in vivo*, le transport direct de nucléotides. Nous examinerons, aussi, le rôle que joue l'adénylate kinase dans la régulation du niveau énergétique cellulaire dans chacun des deux compartiments. Nous verrons, enfin, comment la théorie d'Atkinson [10] permet d'interpréter certains résultats expérimentaux. Des résultats préliminaires de ce travail ont été communiqué au 3ème Congrès International de Photosynthèse [11].

#### MATERIEL ET METHODES

(1) *Matériel végétal.* Les plants de Blé (*Triticum vulgare*, var. Etoile de Choisy) sont cultivés sur vermiculite. Les limbes de la première feuille sont prélevés 15 jours après le semis.

(2) *Traitement des échantillons: stabilisation.* Les échantillons de feuilles détachées sont placés dans des récipients en verre balayés par un courant de gaz

humidifié. Selon les conditions expérimentales, le gaz est soit de l' "Azote U" fourni par "l'Air Liquide" soit de l'air comprimé. A la fin de l'expérience, les échantillons sont stabilisés par l'azote liquide (-196 °C). Après stabilisation, les échantillons destinés à la préparation des chloroplastes sont lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur Usifroid type MS 32. Les autres échantillons sont fixés directement.

(3) *Préparation des chloroplastes.* Nous avons adapté la technique décrite par Thalacker et Behrens [12], pour séparer les chloroplastes de Blé en milieu apolaire. Toutes les opérations du fractionnement cellulaire sont menées entre 0 et 4 °C, comme nous l'avons décrit ailleurs [13].

(4) *Extraction et dosage des nucléotides.* Après fixation du matériel biologique par l'acide trichloroacétique 0,6 M dans l'éther éthylique à -21 °C pendant au moins 30 min, les nucléotides sont extraits à 2 °C au moyen d'une solution aqueuse d'acide trichloroacétique 0,1 M.

Les dosages de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP sont effectués selon Pradet [14], comme cela a été décrit [13], à l'aide d'un appareil "pico ATP" construit par la société MUKA.

(5) *Extraction et dosage des chlorophylles.* L'extraction des chlorophylles est faite à 2 °C au moyen d'acétone 80 % dans l'eau, en présence de CaCO<sub>3</sub>. Le dosage spectrophotométrique est effectué au moyen d'un spectrophotomètre "Unicam" SP800, selon Arnon [15].

(6) *Expression des résultats.* La chlorophylle étant localisée entièrement dans les chloroplastes, un moyen simple de comparer les teneurs en nucléotides des chloroplastes et de la feuille entière consiste à rapporter les teneurs en nucléotides au mg de chlorophylle. Si l'on multiplie ces valeurs par la teneur en chlorophylle des feuilles, on obtient des teneurs en nucléotides par unité de matière fraîche. Nous avons préféré ce dernier mode d'expression.

Chaque point expérimental représente la moyenne de 2 à 4 échantillons d'une même expérience. Les échantillons sont constitués de 16 feuilles au moins chacun. Chaque expérience a été répétée au moins deux fois et le plus souvent quatre fois, les résultats des répétitions étant, dans l'ensemble, très concordants. Cependant les teneurs en nucléotides varient d'une culture à l'autre et reflètent la variabilité du matériel végétal. C'est pourquoi les résultats que nous présentons ne sont pas la moyenne de plusieurs expériences mais sont les valeurs obtenues au cours d'une même expérience.

## RESULTATS EXPERIMENTAUX

### (I) *Etude de la répartition des nucléotides dans des feuilles maintenues dans des conditions stables: états d'équilibre*

La combinaison de différentes conditions d'atmosphère et d'éclairement permet aux différents types de phosphorylation de se produire ensemble ou séparément.

Nous définissons quatre combinaisons qui constituent nos conditions d'incubation.

(a) Air-obscurité: seule l'oxydation phosphorylante fonctionne au niveau des mitochondries.

(b) Air-lumière: les liaisons riches sont produites à la fois par oxydation phosphorylante et par photophosphorylation.

TABLEAU I

Répartition des nucléotides adényliques dans les compartiments chloroplastique et non-chloroplastique des feuilles de Blé, en fonction des conditions d'incubation. Pour chaque condition, l'incubation est de 10 min. Les teneurs en nucléotides sont exprimées en nmol/g de feuilles fraîches.

$\Sigma$ , somme des nucléotides = (ATP)+(ADP)+(AMP).

$\epsilon$ , somme des liaisons riches = 2(ATP)+(ADP), exprimée en néquiv. par g de feuilles fraîches.

$\epsilon/2\Sigma$ , charge énergétique.

	ATP	ADP	AMP	$\Sigma$	$\epsilon$	$\epsilon/2\Sigma$
(a) Air obscurité						
Cellule entière	55	24	6	85	134	0.79
Chloroplastes	19	16	4	39	54	0.69
Reste de la cellule	36	8	2	46	80	0.87
(b) Air-lumière						
Cellule entière	53	20	7	80	126	0.79
Chloroplastes	23	15	2	40	61	0.76
Reste de la cellule	30	5	5	40	65	0.81
(c) Azote-lumière						
Cellule entière	48	22	10	80	118	0.74
Chloroplastes	24	17	2	43	65	0.76
Reste de la cellule	24	5	8	37	53	0.72
(d) Azote-obscurité						
Cellule entière	16	30	34	80	62	0.39
Chloroplastes	8	20	13	41	36	0.44
Reste de la cellule	8	10	21	39	26	0.33

(c) Azote-lumière: les liaisons riches sont produites par photophosphorylation au niveau des chloroplastes.

(d) Azote-obscurité: ni l'oxydation phosphorylante, ni la photophosphorylation ne peuvent fonctionner. Seule la glycolyse pourrait fournir des  $\sim P$ , mais elle est peu ou pas active dans notre matériel.

Quand on maintient les feuilles pendant un temps suffisant, sous une de ces conditions, la transformation des nucléotides atteint un certain équilibre et la taille du pool de chaque compartiment tend à se stabiliser. C'est ce que nous appellerons "état d'équilibre". L'expérience montre que 10 min suffisent pour l'établissement d'un état d'équilibre. Pour des temps plus longs, l'équilibre n'évolue que très lentement.

Dans le Tableau I sont réunis les résultats d'une expérience où des échantillons de feuilles prélevées simultanément dans une même culture ont été placés respectivement dans les quatre conditions d'incubation que nous avons définies. Dans les cas où l'incubation devait avoir lieu à l'obscurité, celle-ci était précédée d'un éclairage de 10 min, dans les mêmes conditions d'atmosphère.

Si on considère, d'abord, les résultats relatifs à la cellule entière, on retrouve, en général les phénomènes décrits par Bomsel et Pradet [16]. Les faibles valeurs des teneurs en AMP, et les valeurs de la charge énergétique plus élevées qui en découlent, sont dues à l'amélioration des conditions de fixation.

Les valeurs de la charge énergétique sont caractéristiques pour chaque condition d'incubation. C'est quand tous les types de phosphorylation peuvent produire

simultanément des liaisons riches (condition b) que la charge énergétique est très élevée. Dans d'autres expériences, on a obtenu des valeurs égales ou supérieures à 0,90. Lorsque ni l'oxydation phosphorylante, ni la photophosphorylation ne participent à la fourniture de liaisons riches, la charge énergétique est très basse et prend des valeurs généralement inférieures à 0,45 (condition d). Quand les conditions d'incubation n'autorisent qu'un seul type de phosphorylation (condition a ou c),  $\varepsilon/2\Sigma$  garde des valeurs élevées, mais légèrement inférieures à celles de la condition b.

Si maintenant, nous comparons les chloroplastes et la partie non-chloroplastique de la cellule, nous pouvons faire les remarques suivantes.

(1) Pour une condition d'incubation donnée, à l'équilibre, les valeurs de  $\varepsilon/2\Sigma$  relatives aux deux compartiments étudiés, bien que voisines, ne sont pas identiques. Ceci indique bien qu'il y a deux pools distincts de nucléotides dans la cellule. La charge énergétique est, en général, plus élevée dans le compartiment non-chloroplastique quand les feuilles sont incubées dans l'air. En anaérobiose,  $\varepsilon/2\Sigma$  prend des valeurs plus élevées dans les chloroplastes que dans le cytoplasme.

(2) Quand un seul compartiment est le siège de phosphorylation (condition a ou c), le compartiment qui ne produit pas de  $\sim P$  a, cependant, une charge énergétique élevée. Ceci indique que les deux pools de nucléotides, quoique distincts, sont liés. Cette liaison ne peut s'expliquer que par un échange de liaisons riches entre les deux compartiments.

(3) Quand on considère les feuilles qui phosphorylent, il semble y avoir, à l'équilibre, peu de variation dans l'ATP chloroplastique.

(4) Si on compare les deux conditions où les feuilles sont incubées à la lumière (b et c), on remarque qu'il y a peu de variation dans les nucléotides chloroplastiques. La différence porte, essentiellement, sur les nucléotides "cytoplasmiques".

(5) Lorsque le tissu n'est le siège d'aucune phosphorylation (condition d), les liaisons riches des deux compartiments sont consommées jusqu'à ce que  $\varepsilon/2\Sigma$  atteigne une valeur inférieure à 0,45. A ce moment, conformément à la théorie développée par Atkinson [10], les réactions consommatrices de liaisons riches sont fortement inhibées. C'est pourquoi, dans notre matériel, il faut une anoxie prolongée à l'obscurité pour que  $\varepsilon/2\Sigma$  prenne des valeurs inférieures à 0,40.

(6) La somme des liaisons riches,  $\varepsilon$ , est plus élevée dans le compartiment qui phosphoryle que dans celui qui ne phosphoryle pas. Il en est, souvent, de même pour la charge énergétique. Mais on trouve, cependant dans certains cas, une valeur élevée de  $\varepsilon$  dans un compartiment avec une valeur de  $\varepsilon/2\Sigma$  plus basse que dans le compartiment voisin. Et ceci est simplement dû à une variation de la taille de chacun des deux pools. On pourrait, donc, chercher là un mécanisme régulateur nouveau du métabolisme énergétique.

(7) Si on examine la répartition de l'ADP et de l'ATP dans les deux compartiments, on constate qu'il y a plus d'ADP dans le chloroplaste que dans le cytoplasme et qu'il y a, généralement, plus d'ATP dans le cytoplasme. Il en résulte un rapport ATP/ADP beaucoup plus élevé dans le cytoplasme que dans le chloroplaste. Ce résultat a été aussi observé par Heber et Santarius [8] et Keys et Whittingham [17].

Le fait essentiel, qui ressort de ces observations, est la nécessité de l'existence d'un transfert, sous une forme ou sous une autre, de liaisons riches d'un compartiment cellulaire à un autre. Pour caractériser ce transfert, nous avons réalisé des expériences que nous appellerons "transitions", au cours desquelles nous suivons l'évolution des

différents nucléotides adényliques dans les compartiments chloroplastique et non-chloroplastique, quand on modifie les conditions d'incubation des feuilles.

(II) *Evolution de la répartition des nucléotides adényliques dans des feuilles de Blé au cours des transitions*

Nous envisageons, tout d'abord, les cas où on rétablit un type de phosphorylation dans des feuilles où on avait supprimé la possibilité de produire des liaisons riches, par leur maintien en anaérobiose à l'obscurité (conditions d). Il est alors très intéressant de suivre l'évolution de la charge énergétique dans les deux compartiments et notamment dans celui où il ne se produit pas de phosphorylation. Nous examinons ensuite un cas où on supprime la photophosphorylation dans des feuilles placées dans des conditions permettant le fonctionnement des deux types de phosphorylation (condition a).

(1) *Transition (obscurité → lumière) dans l'azote.* On part d'un niveau énergétique bas (feuilles incubées dans la condition d) et on assiste à la remontée de la charge énergétique, dans les deux compartiments, alors que seule la photophosphorylation fonctionne. Les résultats obtenus sont réunis dans le Tableau II.

Quand on rétablit la phosphorylation, les niveaux des trois nucléotides adényliques subissent des variations brusques, à la fois dans le chloroplaste et dans le cytoplasme, et évoluent vers un état presque stable, comparable au cas (c) du Tableau I.

La charge énergétique augmente très rapidement dans le chloroplaste (Fig. 1A). En 10 s d'éclairage, elle passe de 0,54, valeur pour laquelle les réactions de synthèse sont fortement inhibées, à 0,75, valeur permettant à de nombreuses réactions de synthèse de se produire. Au bout de 1 min, elle atteint 0,86, valeur qui correspond à un niveau d'équilibre.

Dans la partie non-chloroplastique de la cellule la charge énergétique augmente, aussi, rapidement mais avec un léger retard. Comme dans ce compartiment l'oxydation phosphorylante ne fonctionne pas, l'augmentation de  $\epsilon/2\Sigma$  ne peut

TABLEAU II

Evolution des nucléotides de la feuille de Blé au cours de la transition (obscurité → lumière) dans l'azote. Les feuilles sont maintenues, d'abord, 10 min à l'obscurité dans l'azote puis on allume. Les teneurs en nucléotides sont exprimées en nmol/g de feuilles fraîches. 0 veut dire une valeur < 0,5 nmol. Autres conventions comme pour le Tableau I. Teneur en chlorophylles: 1,90 mg/g de feuilles fraîches.

Temps à la lumière	ATP		ADP		AMP		$\Sigma$			$\epsilon$	
	chl.	cyt.	chl.	cyt.	chl.	cyt.	chl.	cyt.	cel.	chl.	cyt.
0	23	23	33	14	17	31	73	68	141	79	60
10 s	48	22	31	9	6	24	85	55	140	127	53
30 s	59	36	27	6	3	16	89	58	147	145	78
1 min	59	43	23	7	0	15	82	65	147	141	93
2 min	52	37	23	5	4	14	79	56	135	127	79
3 min	68	29	25	8	1	11	94	48	142	161	66
5 min	65	42	20	9	0	14	85	65	150	150	93
15 min	71	43	27	0	0	12	98	55	153	169	86

chl., chloroplastes; cyt., reste de la cellule; cel., cellule entière.

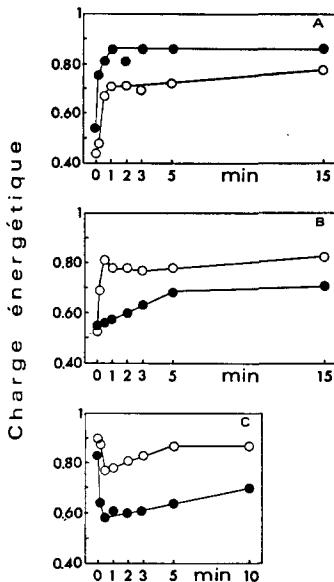


Fig. 1. Evolution de la charge énergétique au cours des différentes transitions. (A) Transition obscurité-lumière dans l'azote. (B) Transition azote-air à l'obscurité. (C) Transition lumière-obscurité dans l'air. ●—●, chloroplastes; ○—○, reste de la cellule.

s'expliquer que par un apport de liaisons riches d'origine chloroplastique. En effet la somme des liaisons riches,  $\varepsilon$ , augmente pendant la première minute d'éclairement dans la partie non-chloroplastique. Entre la 10ème et la 30ème seconde,  $\varepsilon$  augmente, dans ce compartiment, de 25 unités. On peut donc estimer que le chloroplaste exporte des liaisons riches vers le cytoplasme à raison de 4,5  $\mu\text{equiv./g}$  de feuilles fraîches par h.

Pendant les 10 premières secondes d'éclairement, les nucléotides totaux chloroplastiques ont augmenté alors que, pendant le même temps,  $\Sigma$  de la partie non-chloroplastique a diminué d'une quantité équivalente. Il y a tout lieu de penser qu'il s'est produit à travers l'enveloppe chloroplastique un transfert de molécules de nucléotides du cytoplasme vers le stroma du chloroplaste. Si tel n'était pas le cas, il faudrait admettre qu'il y a eu, simultanément, néoformation de nucléotides libres dans le chloroplaste et dégradation ou mise sous une forme de stockage d'une quantité égale de molécules de nucléotides, en dehors du chloroplaste, ce qui est peu vraisemblable. S'il s'agit d'un franchissement effectif de l'enveloppe chloroplastique, on peut évaluer une vitesse minimale de cette translocation. En 10 s,  $\Sigma$  du chloroplaste a augmenté de 12 unités, ce qui représente une vitesse de transfert de 4,32  $\mu\text{mol}$  de nucléotides/g de feuilles fraîches par heure.

(2) *Transition (azote → air) à l'obscurité.* On part de feuilles incubées dans une atmosphère d'azote à l'obscurité et on remplace le courant d'azote par une circulation d'air. Les résultats obtenus sont réunis dans le Tableau III.

Comme dans le cas précédent, la remontée de la charge énergétique dans le compartiment qui phosphoryle est très rapide (Fig. 1B). En 30 s, elle atteint pratiquement son niveau d'équilibre. Dans le compartiment chloroplastique,  $\varepsilon/2\Sigma$  remonte

TABLEAU III

Evolution des nucléotides de la feuille de Blé au cours de la transition (azote → air) à l'obscurité. Les feuilles sont d'abord maintenues 10 min dans l'azote à l'obscurité. On remplace ensuite l'atmosphère d'azote par une circulation d'air comprimé. Les teneurs en nucléotides sont exprimées en nmol/g de feuilles fraîches. Autres conventions comme pour le Tableau I. Teneur en chlorophylles: 1,74 mg/g de feuilles fraîches.

Temps dans l'air	ATP		ADP		AMP		$\Sigma$			$\epsilon$	
	chl.	cyt.	chl.	cyt.	chl.	cyt.	chl.	cyt.	cel.	chl.	cyt.
0	10	20	11	11	7	17	28	48	76	31	51
10 s	16	22	13	10	12	7	41	39	80	45	54
30 s	18	24	16	7	12	3	46	34	80	52	55
1 mn	17	27	14	10	11	4	42	41	83	48	64
2 min	17	25	15	9	9	4	41	38	79	49	59
3 min	17	28	13	12	7	4	37	44	81	47	68
5 min	17	34	12	15	5	4	34	53	87	46	83
15 min	16	44	9	17	4	2	29	63	92	41	105

chl., chloroplastes; cyt., reste de la cellule; cel., cellule entière.

également, mais plus lentement et progressivement. Il y a là une indication nette d'un transfert d'énergie du cytoplasme vers le chloroplaste.

Pendant les 10 premières secondes, la somme des liaisons riches,  $\epsilon$ , augmente de 14 unités dans les chloroplastes, ce qui représente un transfert de liaisons riches, du cytoplasme vers le stroma chloroplastique, à raison de 5,04  $\mu\text{équiv./g}$  de feuilles fraîches par h. On peut remarquer que, pendant ce temps,  $\epsilon$  varie peu dans le cytoplasme. Pour le reste, on s'achemine vers un équilibre comparable à celui de la condition b du Tableau I.

Il faut, également, remarquer la tendance à l'augmentation progressive de la somme des nucléotides ( $\Sigma$ ) de la feuille entière qui se stabilise dans l'air à des valeurs supérieures à celles qu'elle prend dans l'azote. C'est un fait que nous avons remarqué dans d'autres expériences et ce serait là un moyen, pour la cellule, de stabiliser son niveau d'énergie en variant la taille du pool de nucléotides adényliques. Chapman et Atkinson [18] ont montré le rôle que jouerait l'AMP-désaminase dans cette stabilisation.

Comme dans la transition précédente,  $\Sigma$  du chloroplaste augmente durant les 30 premières secondes. En particulier, pendant les 10 premières secondes,  $\Sigma$  a augmenté de 13 unités dans le chloroplaste. Pendant le même temps,  $\Sigma$  a diminué d'une quantité presque équivalente dans le compartiment non-chloroplastique. Nous pouvons donc apprécier la vitesse minimale de transfert des nucléotides du cytoplasme vers le chloroplaste à 4,68  $\mu\text{mol/g}$  de feuilles fraîches par h.

(3) *Transition (lumière → obscurité) dans l'air.* Au cours de cette expérience, la capacité du compartiment non-chloroplastique de produire des liaisons riches, par oxydation phosphorylante, reste intacte. Cette transition montre, encore plus nettement que les deux précédentes, la réalité de la compartmentation des nucléotides adényliques: on voit sur la Fig. 1C que la suppression de l'éclairage provoque une chute brutale et durable de la charge énergétique dans le chloroplaste, où elle a toujours une valeur très faible après 5 min d'obscurité. Elle ne remonte que très

TABLEAU IV

Evolution des nucléotides de la feuille de Blé au cours de la transition (lumière → obscurité) dans l'air. Les feuilles sont éclairées pendant 10 min puis la lumière est éteinte. Les teneurs en nucléotides sont exprimées en nmol/g de feuilles fraîches. Autres conventions comme pour le Tableau I. Teneur en chlorophylles: 1,82 mg/g feuilles fraîches.

Temps à l'obscurité	ATP		ADP		AMP		$\Sigma$			$\varepsilon$	
	chl.	cyt.	chl.	cyt.	chl.	cyt.	chl.	cyt.	cel.	chl.	cyt.
0	28	38	9	7	2	1	39	46	85	65	83
10 s	19	34	17	6	7	2	43	42	85	55	74
30 s	14	34	16	11	8	6	38	51	89	44	79
1 min	13	35	12	16	6	4	31	55	86	38	86
2 min	16	32	16	11	8	3	40	46	86	48	75
3 min	16	35	16	11	7	3	39	49	88	48	81
5 min	17	34	17	9	6	2	40	45	85	51	77
10 min	19	36	16	8	4	2	39	46	85	54	80

chl., chloroplastes; cyt., reste de la cellule; cel., cellule entière.

lentement et reste encore inférieure à 0,70 après 10 min d'obscurité. Pendant tout ce temps,  $\varepsilon/2\Sigma$  garde des valeurs élevées dans le cytoplasme, bien que celles-ci soient sujettes à une chute transitoire, d'une amplitude beaucoup plus faible que dans le chloroplaste.

On peut noter (Tableau IV) que les variations de  $\Sigma$  des deux compartiments ont des amplitudes plus faibles que dans les cas précédents. La somme des nucléotides de la feuille entière reste pratiquement stable. Pendant les 10 premières secondes d'obscurité,  $\Sigma$  diminue de 4 nmol dans le cytoplasme et augmente d'autant dans le chloroplaste. On peut donc évaluer à 1,44  $\mu\text{mol/g}$  de feuilles fraîches par h la vitesse minimale de transport des nucléotides du cytoplasme vers le stroma chloroplastique.

On retrouve au cours de cette transition, les résultats de Keys et Whittingham [17] et Heber et Santarius [8] qui observent une diminution de l'ATP et une augmentation de l'ADP et de l'AMP dans les deux compartiments lorsque les feuilles éclairées sont transférées à l'obscurité. On retrouve aussi le fait que le rapport ATP/ADP est beaucoup plus élevé dans le cytoplasme que dans le chloroplaste. Ce résultat est observé quelle que soit la transition (Tableaux II-IV).

## DISCUSSION

### (1) Transfert des nucléotides d'un compartiment cellulaire à un autre

En réalité on ne peut, au cours d'expériences *in vivo*, mettre directement en évidence le transport des nucléotides que pendant les premières secondes qui suivent la suppression ou le rétablissement de phosphorylation. Car le renouvellement des liaisons riches est un phénomène très rapide. De plus, des phénomènes de régulation, qui font qu'il s'établit un équilibre entre la production et la consommation d'énergie, masquent le phénomène de transfert.

On peut expliquer le transfert des nucléotides adényliques de quatre façons:  
(a) Les nucléotides adényliques traversent l'enveloppe chloroplastique par simple phénomène de diffusion non spécifique. (b) Le transport des liaisons riches se produit

par un mécanisme de transphosphorylation sans qu'il y ait transfert effectif de nucléotides. (c) Les nucléotides sont transportés sous forme de molécules intactes. (d) L'échange des nucléotides est assuré par un transfert indirect de liaisons riches, par l'intermédiaire de métabolites communs à la glycolyse et au cycle de Calvin.

La diffusion passive ne permet pas d'expliquer toute seule le résultat du transfert, puisque, dans les expériences que nous avons effectuées, nous avons toujours observé des niveaux énergétiques différents d'un compartiment à l'autre. Si un phénomène de diffusion existait, il aurait pour résultat une égalisation des deux pools. Or ce n'est pas ce qu'on observe.

Si un mécanisme de transphosphorylation existait, il se produirait au niveau de l'enveloppe chloroplastique sous l'action d'un enzyme du type NDP-kinase et aurait pour résultat une apparente translocation de l'ATP sans qu'il y ait transfert de molécules de nucléotides. Si un tel mécanisme se produisait réellement, la taille de chaque pool de nucléotides ne devrait pas varier au cours des transitions, notamment lorsque  $\Sigma$  de la cellule entière demeure pratiquement stable. Or nous avons observé que le transfert des liaisons riches est accompagné d'un mouvement de nucléotides à travers l'enveloppe chloroplastique qui est de l'ordre de  $4 \mu\text{mol/g}$  de feuilles fraîches par h, soit environ  $2,5 \mu\text{mol/mg}$  de chlorophylle par h. Il s'agit là d'une valeur minimale, car elle est le solde du bilan d'un transfert de molécules aussi bien dans le sens cytoplasme → stroma chloroplastique que dans le sens inverse.

Par analogie avec le transporteur de nucléotides des mitochondries [19–25], Heldt et ses collaborateurs [26–30] ont décrit un transporteur de nucléotides adényliques localisé au niveau de la membrane interne des chloroplastes. La différence avec les mitochondries est que le transporteur des chloroplastes a plus d'affinité pour l'ATP que pour l'ADP et l'AMP. Les vitesses de transfert, assurées par ce transporteur et mesurées *in vitro*, varient avec la température et sont de l'ordre de  $2\text{--}5 \mu\text{mol d'ATP/mg de chlorophylle par h}$  pour des chloroplastes d'*Epinard* à  $20^\circ\text{C}$  [31]. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles que nous avons observé, *in vivo*. On est donc tenté d'admettre que l'échange de nucléotides entre les deux compartiments chloroplastique et non-chloroplastique se fait par transfert direct. Mais nous avons vu que les valeurs calculées au cours d'expériences *in vivo* sont des valeurs minimales soit parce qu'elles ne tiennent pas compte de la consommation de liaisons riches et de l'interconversion des nucléotides adényliques sous l'action de l'adénylate kinase soit parce qu'elles représentent le solde du bilan de transfert des molécules dans les deux sens. Les valeurs réelles sont certainement plus élevées. Heber et Santarius [8] ont, d'ailleurs, observé *in vivo* des vitesses plus grandes dans les feuilles d'*Elodea* ( $7\text{--}9 \mu\text{mol d'ATP/mg de chlorophylle par h}$ ). Il faut donc admettre l'existence, à côté du transfert direct, d'un mécanisme de transport indirect des liaisons riches à travers l'enveloppe chloroplastique. Un système de "navette" (Shuttle transfer), qui transporte les équivalents réduits et l'ATP, produits par photophosphorylation, des chloroplastes intacts au milieu environnant, a été plusieurs fois décrit *in vitro* [8, 9, 31–36]. Le système requiert deux métabolites communs à la glycolyse et au cycle de Calvin: le phosphoglycérate et la dihydroxyacétone phosphate. L'existence d'un tel mécanisme *in vivo* est très plausible. En effet, la perméabilité de l'enveloppe chloroplastique au phosphoglycérate et à la dihydroxyacétone phosphate a été depuis longtemps démontrée [37–43]. Travailant sur des chloroplastes isolés d'*Epinard*, Heldt et Rapley [44] et Heldt et Sauer [30] ont défini de la même façon que pour les

nucléotides, un transporteur spécifique de la dihydroxyacétone phosphate, du phosphoglycérate et du  $P_i$ , qu'ils ont appelé transporteur de phosphate. A 20 °C, le phosphoglycérate est transporté à raison de 50–60  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de chlorophylle par h [45]. Ces vitesses très élevées, plus de 10 fois celles de l'ATP, font probablement jouer à ce transporteur un rôle important dans le transfert des liaisons riches du chloroplaste vers le cytoplasme. Le transporteur de nucléotides jouerait alors un rôle de contrôle ou permettrait d'approvisionner les chloroplastes en liaisons riches à l'obscurité, comme l'a suggéré Heber [36].

## (2) Charge énergétique et régulation métabolique

A la suite de travaux effectués *in vitro* par Atkinson et ses collaborateurs et montrant que plusieurs activités enzymatiques sont affectées par les nucléotides adényliques, Atkinson [10, 46] postule que les réactions utilisant des liaisons riches ont une activité qui croît avec la charge énergétique; il les appelle réactions de type U. Les réactions produisant de l'ATP ont une vitesse qui décroît quand la charge énergétique augmente; ce sont les réactions de type R.

Plusieurs travaux *in vitro* ont ensuite confirmé cette théorie [47–50]. Un cas intéressant est celui de la phosphoglycérate kinase. Cet enzyme se trouve à la fois dans les chloroplastes et dans le cytoplasme. Les deux formes de l'enzyme sont contrôlées par la charge énergétique [51]. A la lumière, quand  $\epsilon/2\Sigma$  est élevé, l'enzyme chloroplastique est stimulé dans la voie du cycle de Calvin et l'activité glycolytique de la kinase cytoplasmique est inhibée. A l'obscurité, quand  $\epsilon/2\Sigma$  est bas, les deux formes de l'enzyme participent à la formation d'ATP par oxydation de la dihydroxyacétone.

En réalité certains enzymes ne répondent pas à la charge énergétique comme le prévoit la théorie d'Atkinson [52–55]. La réponse de l'AMP-désaminase [18] est d'un type particulier, en rapport avec le rôle stabilisateur de la charge énergétique que joue cet enzyme.

Il est intéressant que des travaux effectués *in vivo* sur divers matériels [5, 56–68] semblent apporter un support expérimental à la théorie d'Atkinson.

Si on se place dans le cadre de cette théorie, on peut expliquer l'évolution de la charge énergétique après la suppression ou le rétablissement des phosphorylations. Par exemple, quand on rétablit l'aérobie à l'obscurité (Fig. 1B) on observe un accroissement rapide de la charge énergétique du compartiment cytoplasmique. Cette réponse intense traduirait une extrême sensibilité à la charge énergétique des enzymes contrôlant l'oxydation phosphorylante. Les réactions catalysées par ces enzymes, étant productrices d'ATP, sont exaltées par les faibles valeurs de  $\epsilon/2\Sigma$ , ce qui expliquerait que le passage de l'anoxie à l'aérobie se traduise par une production rapide de  $\sim P$  et par conséquent par une élévation de la charge énergétique. Si, après cette augmentation brutale, la charge énergétique est maintenue à un niveau pratiquement stable, c'est qu'un équilibre s'est établi entre les réactions fournissant de l'ATP et celles consommant des liaisons riches. La charge énergétique du chloroplaste, au cours de cette transition, augmente beaucoup plus lentement que dans le cytoplasme. Ceci est probablement en rapport avec la vitesse de transfert des liaisons riches à travers l'enveloppe chloroplastique, qui constitue un facteur limitant.

Lorsqu'on passe de la lumière à l'obscurité, la charge énergétique décroît rapidement dans les deux compartiments. Elle augmente ensuite et atteint un niveau presque stable en quelques minutes (Fig. 1C). Le fait que la chute de  $\epsilon/2\Sigma$  soit suivie

d'un rétablissement du niveau énergétique pourrait s'expliquer ainsi: une charge énergétique faible a pour effet de diminuer l'activité des réactions consommant des liaisons riches et augmente la vitesse de l'oxydation phosphorylante, c'est-à-dire des réactions produisant de l'énergie.

Quand on parle de régulation par la charge énergétique, il ne faut pas perdre de vue que c'est la balance entre les trois adénosine phosphates qui doit contrôler et réguler les réactions métaboliques de la cellule. Mais on peut parler de régulation métabolique par la charge énergétique parce que, précisément, ce paramètre traduit l'équilibre du système adénylique. Il est d'ailleurs remarquable de voir, dans les expériences que nous avons répétées, que si  $\Sigma$  peut varier d'une culture à l'autre  $\varepsilon/2\Sigma$  reste parfaitement reproductible et caractéristique des conditions définies.

(3) *Intervention de l'adénylate kinase pour réguler le niveau des nucléotides, à la fois dans les chloroplastes et dans le reste de la cellule*

L'adénylate kinase contrôle la réaction:



Selon les courbes théoriques (Fig. 2), dans une zone où la charge énergétique est comprise entre 0,25 et 0,75, l'ADP demeure pratiquement constant. Lorsque  $\varepsilon/2\Sigma$  varie de 0,25 à 0,75, tout se passe comme si l'AMP était directement transformé en ATP. Par contre, si  $\varepsilon/2\Sigma$  varie de 0,75 à 0,25, tout se passe comme si l'ATP était transformé en AMP.

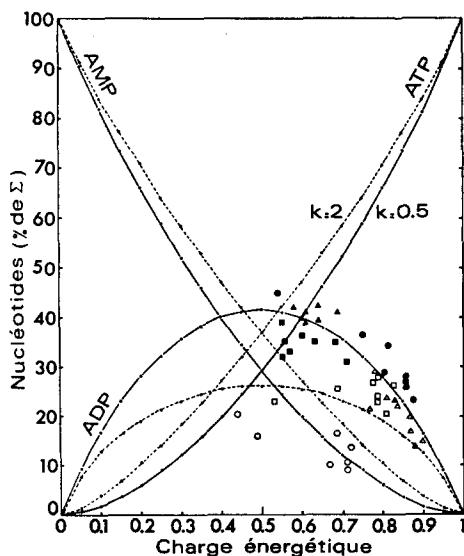


Fig. 2. Evolution, en fonction de la charge énergétique, des nucléotides adényliques exprimés en pourcentage de  $\Sigma$ . Les courbes représentent l'évolution théorique des nucléotides pour deux valeurs  $K = 0,5$  et  $K = 2$  de la constante d'équilibre de l'adénylate kinase. On a figuré les points expérimentaux relatifs à l'ADP au cours des transitions étudiées.  $\Sigma = (\text{ATP}) + (\text{ADP}) + (\text{AMP})$ ;  $K = (\text{AMP}) (\text{ATP}) / (\text{ADP})^2$ . ●, ■, ▲, chloroplastes; ○, □, △, cytoplasme. Les cercles correspondent à la transition obscurité-lumière dans l'azote, les carrés à la transition azote-air à l'obscurité et les triangles à la transition lumière-obscurité dans l'air.

Au cours de la transition obscurité → lumière dans l'azote par exemple (Fig. 1A), lorsqu'on rétablit la photophosphorylation,  $\epsilon/2\Sigma$  du chloroplaste passe de 0,54–0,88 en quelques minutes. Pendant ce temps l'ATP augmente brutalement et, comparativement, l'ADP varie peu (Tableau II). L'AMP, lui, diminue fortement et a pratiquement disparu en fin d'expérience. Tout se passe donc comme si l'AMP était directement transformé en ATP.

Dans le compartiment non-chloroplastique, les variations sont presque parallèles à celles du chloroplaste et peuvent, pratiquement s'interpréter de la même manière. Le même raisonnement montre que l'évolution du niveau des nucléotides adényliques, en dehors des chloroplastes, s'explique aisément par l'intervention de l'adénylate kinase. Cet enzyme intervient donc activement pour régir l'équilibre des nucléotides adényliques dans les deux compartiments, non seulement quand les feuilles sont maintenues dans des conditions stables, mais aussi quand on provoque une variation brusque de la charge énergétique, par la suppression ou le rétablissement d'une phosphorylation.

La comparaison des équilibres apparents, observés *in vivo* au cours des transitions, avec les équilibres théoriques (Fig. 2) montre que la constante d'équilibre apparent de l'adénylate kinase n'est pas la même dans le compartiment chloroplastique et dans le reste de la cellule. Bien qu'on ait décrit plusieurs isoenzymes de l'adénylate kinase qui ont une distribution tissulaire et une localisation cellulaire différentes [69–76] la différence dans la constante d'équilibre apparent de l'adénylate kinase peut refléter une différence de pH ou une répartition inégale entre les deux compartiments de certains ions tels que  $Mg^{2+}$ . On sait d'ailleurs que certains facteurs comme le rapport  $Mg^{2+}/\Sigma$  peuvent agir sur l'activité de l'enzyme [77].

## CONCLUSION

L'étude des équilibres des nucléotides adényliques dans les chloroplastes et le reste de la cellule et celle de la variation de leurs niveaux au cours des transitions nous ont permis de mettre en évidence deux pools distincts de nucléotides. Ces pools sont liés et des molécules de nucléotides peuvent s'échanger entre les deux compartiments. Si on admet un mécanisme de transfert sous forme de molécules intactes, on peut calculer une vitesse minimale de transport de l'ATP à travers l'enveloppe chloroplastique. Lorsque seule la photophosphorylation fonctionne (Tableau II), l'ATP est transporté du stroma chloroplastique vers le cytoplasme à raison de 22 nmol/mg de chlorophylle par min. Sous ces conditions, le chloroplaste contient 21 nmol d'ATP/mg de chlorophylle. Il exporte donc l'équivalent de son stock en liaisons riches vers le cytoplasme toutes les minutes environ.

Les chloroplastes représentent un compartiment métabolique distinct du reste de la cellule. Leur principale fonction est de fournir à la cellule des composés produits au cours de la photosynthèse. Parmi ces métabolites, les nucléotides adényliques tiennent une place importante. A la lumière, les liaisons riches produites par photophosphorylation peuvent être utilisées en dehors des chloroplastes, dans les biosynthèses cellulaires. A l'obscurité, le compartiment non-chloroplastique peut fournir aux chloroplastes des liaisons riches, ce qui permet à ces organites de maintenir leur structure.

La notion de charge énergétique nous a permis, dans le cadre de la théorie

d'Atkinson, de mieux interpréter la régulation métabolique par le niveau énergétique cellulaire. Pour fournir encore un support expérimental à cette théorie, il faudrait suivre *in vivo* la cinétique de réactions de dégradations ou de synthèses, quand on fait varier la charge énergétique.

S'il est certain que les nucléotides adényliques tiennent la place la plus importante dans la mobilisation et la canalisation de l'énergie chimique au sein de la cellule, les autres nucléotides doivent jouer un certain rôle dans le métabolisme énergétique. On connaît, malheureusement, très peu de choses à leur sujet et il faudrait l'élaboration de nouvelles techniques de dosages pour pouvoir faire la part qui revient à chaque catégorie de nucléotides dans le métabolisme énergétique cellulaire. Des réactions de transphosphorylation doivent, probablement, jouer un rôle non-négligeable dans l'établissement d'un certain équilibre entre les différentes catégories de nucléotides, pour que le système adénylique tienne, dans le métabolisme énergétique, la place qu'on lui connaît.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 Bowen, W. J. et Kerwin, T. D. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.* 64, 278–284
- 2 Atkinson, D. E. et Walton, G. M. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3239–3241
- 3 Pradet, A. et Bomsel, J. L. (1968) *C. R. Acad. Sci. Paris* 266, 2416–2418
- 4 Bomsel, J. L. et Pradet, A. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 162, 230–242
- 5 Pradet, A. (1969) *Physiol. Vég.* 7, 261–275
- 6 Santarius, K. A., Heber, U., Ullrich, W. et Urbach, W. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 139–146
- 7 Santarius, K. A. et Heber, U. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 102, 39–54
- 8 Heber, U. et Santarius, K. A. (1970) *Z. Naturforsch.* 25b, 718–728
- 9 Heber, U. (1975) Proc. 3rd Int. Congr. Photosyn. (Avron, M., ed.), Vol. II, pp. 1335–1348, Elsevier, Amsterdam
- 10 Atkinson, D. E. (1968) *Biochemistry* 7, 4030–4034
- 11 Bomsel, J. L. et Sellami, A. (1975) Proc. 3rd Int. Congr. Photosyn. (Avron, M., ed.), Vol. II, pp. 1363–1367, Elsevier, Amsterdam
- 12 Thalacker, R. et Behrens, M. (1959) *Z. Naturforsch.* 14b, 343–346
- 13 Sellami, A. (1972) Thèse de Doctorat de 3ème cycle, Université Paris VI, p. 102
- 14 Pradet, A. (1967) *Physiol. Vég.* 5, 209–221
- 15 Arnon, D. I. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1–15
- 16 Bomsel, J. L. et Pradet, A. (1967) *Physiol. Vég.* 5, 223–236
- 17 Keys, A. J. et Whittingham, C. P. (1969) dans *Progress in Photosynthesis Research* (Metzner, H., ed.), Vol. I, pp. 352–358, H. Laupp, Jr., Tübingen
- 18 Chapman, A. G. et Atkinson, D. E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 8309–8312
- 19 Pfaff, E., Klingenberg, M. et Heldt, H. W. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 104, 312–315
- 20 Heldt, H. W. et Pfaff, E. (1969) *Eur. J. Biochem.* 10, 494–500
- 21 Meissner, H. M. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 205, 27–34
- 22 Meissner, H. M. (1971) *Biochemistry* 10, 3485–3491
- 23 Vignais, P. V., Vignais, P. M. et Defaye, G. (1971) *FEBS Lett.* 17, 281–288
- 24 Klingenberg, M., Falkner, G., Erdelt, H. et Grebe, K. (1971) *FEBS Lett.* 16, 296–300
- 25 Klingenberg, M., Grebe, K. et Scherer, B. (1971) *FEBS Lett.* 16, 253–256
- 26 Strotmann, H. et Berger, S. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 20–26
- 27 Strotmann, H. et Heldt, H. W. (1969) dans *Progress in Photosynthesis Research* (Metzner, H., ed.), Vol. III, pp. 1131–1140, H. Laupp, Jr., Tübingen
- 28 Heldt, H. W. (1969) *FEBS Lett.* 5, 11–14
- 29 Heldt, H. W. et Rapley, L. (1970) *FEBS Lett.* 7, 139–142
- 30 Heldt, H. W. et Sauer, F. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 234, 83–91
- 31 Heldt, H. W., Sauer, F. et Rapley, L. (1972) Proc. 2nd Int. Congr. Photosyn. Res. (Forti, G., Avron, M. et Melandri, A., eds.), Vol. II, pp. 1345–1355, W. Junk, The Hague

- 32 Stocking, C. R. et Larson, S. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 278–282
- 33 Heber, U. et Krause, G. H. (1971) in *Photosynthesis and Photorespiration* (Hatch, M. D., Osmond, C. B. et Slater, R. O., eds.), pp. 218–225, Wiley Interscience, New York
- 34 Kelley, G. J. et Gibbs, M. (1973) *Plant Physiol.* 52, 111–118
- 35 Kelley, G. J. et Gibbs, M. (1973) *Plant Physiol.* 52, 674–676
- 36 Heber, U. (1974) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 393–421
- 37 Heber, U. et Willenbrink, J. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 82, 313–324
- 38 Bamberger, E. S. et Gibbs, M. (1965) *Plant Physiol.* 40, 919–926
- 39 Jensen, R. G. et Bassham, J. A. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56, 1095–1101
- 40 Heber, U. (1967) in *Biochemistry of Chloroplasts* (Goodwin, T. W., ed.), Vol. II, pp. 71–78, Academic Press, London
- 41 Cockburn, W., Baldry, C. W. et Walker, D. A. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 143, 614–624
- 42 Robinson, J. M. et Stocking, C. R. (1968) *Plant Physiol.* 43, 1597–1604
- 43 Bassham, J. A., Kirk, M. et Jensen, R. G. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 211–218
- 44 Heldt, H. W. et Rapley, L. (1970) *FEBS Lett.* 10, 143–148
- 45 Werdan, K. et Heldt, H. W. (1972) *Proc. 2nd Congr. Photosyn. Res.* (Forti, G., Avron, M. et Melandri, A., eds.), Vol. II, pp. 1337–1344, W. Junk, The Hague
- 46 Atkinson, D. E. (1969) *Ann. Rev. Microbiol.* 23, 47–68
- 47 Lé John, H. B., Stevenson, R. M. et Meuser, R. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5569–5576
- 48 Shen, L. C. et Atkinson, D. E. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3996–4000
- 49 Liao, C. L. et Atkinson, D. E. (1971) *J. Bacteriol.* 106, 37–44
- 50 Shen, L. C. et Atkinson, D. E. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5974–5978
- 51 Pacold, I. et Anderson, L. E. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 139–143
- 52 Liao, C. L. et Atkinson, D. E. (1971) *J. Bacteriol.* 106, 31–36
- 53 Wong, K. F. et Davies, D. D. (1973) *Biochem. J.* 131, 451–458
- 54 Coombs, J., Maw, S. L. et Baldry, C. W. (1974) *Planta* 117, 279–292
- 55 Davies, D. D. et Patil, K. D. (1974) *Biochem. J.* 137, 45–53
- 56 Pradet, A. (1970) *Thèse de Doctorat es-Sciences*, Université Paris VI, p. 81
- 57 Ching, T. M. et Ching, K. K. (1972) *Plant Physiol.* 50, 536–540
- 58 Moreland, D. E., Hussey, G. G., Shriner, C. R. et Farmer, F. S. (1974) *Plant Physiol.* 54, 560–563
- 59 Ching, T. M., Crane, J. M. et Stamp, D. L. (1974) *Plant Physiol.* 54, 748–751
- 60 Gendraud, M. et Prevôt, J. C. (1972) *C. R. Acad. Sci. Paris* 274, 2049–2052
- 61 Forsee, W. T. et Kahn, J. S. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 150, 302–309
- 62 Weissman, G. S. (1972) *Plant Physiol.* 49, 142–145
- 63 Somlo, M. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 122–133
- 64 Chapman, A. G., Fall, L. et Atkinson, D. E. (1971) *J. Bacteriol.* 108, 1072–1086
- 65 Cocucci, M. C. et Marrè, E. (1973) *Plant Sci. Lett.* 1, 293–301
- 66 Bomsel, J. L. (1973) *C. R. Acad. Sci. Paris* 277, 1753–1756
- 67 Ridge, J. W. (1972) *Biochem. J.* 127, 351–355
- 68 Sellami, A. et Bomsel, J. L. (1975) *Physiol. Vég.* 13, 523–529
- 69 Bowman, J. E., Frischer, H., Ajmar, F., Carson, P. E. et Gower, M. K. (1967) *Nature* 214, 1156–1158
- 70 Böckelmann, W., Wolf, U. et Ritter, H. (1968) *Humangenetik* 6, 78–83
- 71 Salmon, C., Seger, J., Mannoni, J., Bahano-Duchery, J. et Liberge, G. (1968) *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.* 13, 296–298
- 72 Böckelmann, W. et Ritter, H. (1968) *Humangenetik*, 6, 373–376
- 73 Khoo, J. C. et Russel, P. J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 268, 98–101
- 74 Sapico, V., Litwack, G. et Criss, W. E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 258, 436–445
- 75 Chiu, C. S., Su, S. et Russel, P. J. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 132, 361–369
- 76 Adelman, R. C., Lo, C. H. et Weinhouse, S. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 2538–2544
- 77 Su, S. et Russel, P. J. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 132, 370–378