

Activité des différentes isozymes de la malate déshydrogénase dans la feuille de l'épinard (*Spinacia oleracea*) : état végétatif et induction florale

Autor(en): **Valat, Michel / Greppin, Hubert**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société**

Band (Jahr): **45 (1992)**

Heft 2: **Archives des Sciences**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-740339>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Séance du 18 juin 1992

ACTIVITÉ DES DIFFÉRENTES ISOZYMES
DE LA MALATE DESHYDROGENASE DANS LA FEUILLE
DE L'EPINARD (*Spinacia oleracea*): ETAT VÉGÉTATIF
ET INDUCTION FLORALE

PAR

Michel VALAT* & Hubert GREPPIN*

ABSTRACT

Malate Dehydrogenase isozymes (MDH) of spinach leaves at the vegetative state or during the flowering process by luminous treatment have been isolated. The MDH NADPH or NADH dependent activity from chloroplast, mitochondria, peroxisome and cytosol were tested. The environmental signals, detected by the chloroplasts, are transmitted by the malic shuttle to the other cellular compartments via the cytosol. During the floral induction, two steps are distinguishable in the compartmental interaction involving the MDH isozymes (accommodation, adaptation).

RÉSUMÉ

Les isozymes de la malate deshydrogénase (MDH) des feuilles d'épinard, à l'état végétatif ou lors de l'induction à fleurir après un traitement lumineux, ont été isolées. L'activité NADPH ou NADH dépendante des MDH du chloroplaste, de la mitochondrie, du peroxysome et du cytosol a été testée. Les signaux de l'environnement, perçus par les chloroplastes, sont transmis par la navette malique aux autres compartiments cellulaires via le cytosol. Lors de l'induction florale, deux étapes, dans l'interaction compartimentale impliquant les isozymes de la MDH, se distinguent (accommodation, adaptation).

INTRODUCTION

Le métabolisme du malate occupe une position centrale dans la physiologie des plantes supérieures (LANCE et RUSTIN, 1984; LÜTTGE et SMITH, 1988). Si la participation du malate au cycle de Krebs est bien connue, il est également bien établi qu'il se trouve au cœur de la discrimination entre les différents types de métabolisme en C₄ (cycle de Hatch et Slack) et CAM («crassulacean metabolism») ainsi qu'en C₃ (cycle de Calvin) par une voie spécifique, en raison de son interaction dans l'assimilation du gaz carbonique (HATCH et SLACK, 1969; BLACK, 1973; MOYSE, 1976; DAVIES, 1979; KENT,

* Laboratoire de Physiologie végétale, 3, pl. de l'Université, CH-1211 Genève 4.

1979; KLUGE, 1979; OSMOND et HOLTHUM, 1981; O'LEARY, 1982; LATZKO et KELLY, 1983; RUFFNER *et al.* 1983).

Le malate est également impliqué dans l'assimilation des nitrates (WOO *et al.*, 1980; NAIK et NICHOLAS, 1986), le contrôle du pH, le maintien de la balance électrique, les mouvements d'ouverture et de fermeture des stomates (ALLAWAY, 1981; WILLMER, 1983), la réponse au stress (HOOK et CRAWFORD, 1978; LEWITT, 1980), la pollution par le SO₂ (PIERRE, 1984), les blessures (BRINKMAN *et al.*, 1982), les excès de sel (DIALLO et QUEIROZ-CLARET, 1983).

Le malate est considéré comme un produit final de la glycolyse (DAVIES, 1978), au même titre que le phosphoénolpyruvate son précurseur; il tient une position clef entre la glycolyse et le cycle de Krebs ainsi qu'avec des réactions périphériques liées au métabolisme des acides aminés (KENT, 1979). Il constitue une réserve en CO₂ et en équivalents réduits. Traversant facilement les membranes, à l'aide de nombreux transporteurs (WISKICH, 1977; DAY et WISKICH, 1984), c'est donc une navette efficace d'un compartiment à l'autre, facilitant les échanges d'équivalents réduits et l'interconversion du NADPH/NADH (WALKER, 1976). En tant que diacide, il peut être générateur de protons (échange anions-cations; WILLMER, 1981); le rapport du couple malate-pyruvate lui confère un rôle prépondérant dans la régulation du pH cytosolique et vacuolaire (GUERN *et al.*, 1983; MARIGO *et al.*, 1986; FELLE, 1988). Enfin, le malate est oxydé par deux voies différentes, l'une par la malate deshydrogénase, l'autre par l'enzyme malique; la voie électronique terminale peut être phosphorylante (cyano-sensible) ou bien non-phosphorylante (cyanorésistante) (PALMER, 1976, 1984; RUSTIN *et al.*, 1980; LATIES, 1982).

Au vu d'une telle implication, on comprend mieux le rôle de «message» du malate dans les relations intercompartimentales, de même que dans les interactions dans différentes étapes du métabolisme. Il nous a donc paru être un marqueur intéressant pour analyser le mécanisme de l'induction florale dont la nature est encore inconnue (GREPPIN *et al.*, 1991).

La malate deshydrogénase qui peut fonctionner avec deux cofacteurs, le NADH et le NADPH, occupe une position particulière, car ses différentes isozymes sont présentes dans tous les compartiments cellulaires (VIDAL *et al.*, 1977; VALAT, 1992), et sont donc impliquées dans le système de navettes. La plante utilisée est l'épinard, dont la photopériode critique est d'environ 11 heures; végétatif en jour court, il est induit par un passage en lumière continue (plante de jour long). La modulation photopériodique du malate a été bien établie chez *Kalanchoë blossfeldiana* (BRULFERT *et al.*, 1975; QUEIROZ, 1965; 1976, 1979).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les feuilles d'épinard, *Spinacia oleracea* (c.v. Nobel), utilisées dans ce travail proviennent de plantes cultivées en chambres climatisées (Phytotron); lumière issue de tubes fluorescents Sylvania «daylight» de 40 W (éclairage de 12 000 ergs/s/cm² sur

les feuilles); la température est maintenue à $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ et l'humidité relative varie de $70\% \pm 10\%$ la nuit et de $50\% \pm 10\%$ le jour. Les plantes sont arrosées deux fois par semaine avec une solution nutritive Sinesol 0,3‰.

PHOTOPÉRIODE

Différents traitements lumineux sont pratiqués. Les jours courts (JC) correspondent à 8 heures de lumière (08 à 16 heures locales) et 16 heures d'obscurité: dans ces conditions les plantes restent végétatives pendant au moins 4 semaines. L'induction florale se fait par transfert de JC en lumière continue (plantes âgées de 4 semaines): la photopériode critique est de 11 heures ± 1 de lumière. Un autre lot de plantes est cultivé en lumière continue (LC) en permanence dès le semis. Le traitement «inducteur» mimé (MIT) s'opère avec des plantes de 3 semaines (JC) induites par 48 heures de LC, puis transférées en JC pendant 6 jours. A ce moment, les plantes sont transférées à nouveau en LC. Ceci constitue le MIT proprement dit: mise en évidence d'un effet irréversible du traitement lumineux lors de l'induction florale.

ECHANTILLONNAGE

A chaque temps de prélèvement, deux ou quatre heures sur plusieurs jours, et pour les différents traitements lumineux, 1 g de feuilles primaires est prélevé et immédiatement congelé dans l'azote liquide (-192°C), et conservé dans celui-ci.

Les résultats présentés proviennent d'expériences issues de plusieurs séries répétées au moins trois fois. La totalité (95%) des activités NAD^+ et NADP^+ malate deshydrogénase de l'extrait brut est récupérée après un gradient inverse de sulfate d'ammonium. L'activité des isozymes de la malate deshydrogénase est très stable d'une expérience à l'autre.

DOSAGES

Toutes les mesures photométriques sont faites à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam SP 1700, couplé à l'Unicam SP 1805, contrôleur de programme. Les cinétiques enzymatiques sont enregistrées sur Unicam AR 25 Linear.

PROTÉINES

Nous utilisons la coloration au bleu de Coomassie (BRADFORD, 1976) à l'aide du réactif de Bio-Rad. Une aliquote de l'extrait (5 μl) est injecté dans 800 μl d'eau distillée, puis 200 μl de réactif pur sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 595 nm et une courbe étalon est établie avec de la BSA (sérum albumine bovine).

CHLOROPHYLLES

L'estimation est faite selon la méthode de BRUINSMA (1961). Les chlorophylles sont estimées dans un extrait acétonique à 80% (v/v) en mesurant l'absorbance à 652 nm et convertie par le coefficient de Bruinsma.

MALATE DESHYDROGÉNASE L-MALATE NAD⁺ OXYDO-RÉDUCTASE

La procédure utilisée est celle de DEITZER *et al.* (1974). Dans une cuve en quartz d'un ml sont ajoutés 800 µl de tampon phosphate 0,25 M (Na₂HPO₄-KH₂PO₄) à pH 7,8; puis 100 µl de NADH 2,7 mM et 100 µl de l'extrait enzymatique dilué ou non. On enclenche la réaction par l'ajout de 100 µl d'acide oxalo-acétique 100 mM. La cinétique d'oxydation du NADH est suivie à 366 nm. L'activité de la MDH est exprimée en nmole S. ml⁻¹.min.⁻¹.

L-MALATE NADP⁺ OXYDO-RÉDUCTASE

La méthode est similaire à la précédente, le milieu de réaction contenant du NADPH.

ENZYMES MARQUEURS

Le choix des indicateurs biochimiques pour les divers compartiments cellulaires: cytosol, mitochondries, peroxyosomes, chloroplastides correspond aux propositions de P.H. QUAIL (1979). Cytosol: phosphoénolpyruvate carboxylase, selon SCHNARRENBARGER *et al.* (1980). Chloroplastes: chlorophylles selon Bruinsma, glycéraldéhyde 3-phosphate-deshydrogénase selon DE LOOZE (1980). Mitochondries: cytochrome c oxydase selon WHARTON et TZAGOLOFF (1967), fumarase selon HILL et BRADSHAW (1969). Peroxyosomes et glyoxyosomes: catalase selon AEBI (1974) modifié par EISING et GERHARDT (1986).

EXTRACTION ET SÉPARATION DE LA MALATE DESHYDROGÉNASE

La procédure est celle de BONZON *et al.* (1987) modifiée (VALAT, 1992), à partir d'1 g de feuilles congelées. La séparation se fait en gradient inverse discontinu de sulfate d'ammonium (KING, 1972; DE LOOZE et WAGNER, 1983; BONZON *et al.*, 1987; VALAT, 1992). Les fractions recueillies à la sortie de la colonne de Célite sont analysées

automatiquement sur un prototype Ismatec ASA modular system couplé à un spectrophotomètre Eppendorf PCP 6121 et contrôlé par un ordinateur ADDS Regent 100.

ISOLEMENT DES CHLOROPLASTES

On utilise le plan expérimental proposé par SIMON (1985) et adapté de la méthode de DOUCE et JOYARD (1979) et de MOURIOUX et DOUCE (1981). On utilise 100 g de feuilles. La purification sur gradient autogénéré de Percoll est proposée par ADAM et RUSTIN (1986). Les opérations se déroulent à 4°C (VALAT, 1992).

ISOLEMENT DES PEROXYSOMES ET DES MITOCHONDRIES

La procédure de séparation sur gradient discontinu de Percoll repose sur les travaux de SCHWITZGUEBEL et SIEGENTHALER (1984). On utilise 100 g de feuilles (VALAT, 1992).

A chaque étape des aliquotes sont prélevées et utilisées pour les tests d'enzymes marqueurs des différents compartiments isolés, ainsi que pour le dosage des protéines et des chlorophylles.

PRÉPARATION DE LA FRACTION CYTOSOLIQUE

Après la séparation des mitochondries et des peroxysomes, on élimine par centrifugation l'ensemble des organelles et débris contenus dans le filtrat. Le dernier surnageant constitue une fraction enrichie en cytosol (VALAT, 1992).

Une autre voie suivie consiste à partir de protoplastes de feuilles d'épinard. La méthode utilisée est celle de NISHIMURA et AKAZAWA (1975) adaptée de TABEKE *et al.* (1968). Le fractionnement des protoplastes a été mis au point par GARDESTRÖM et WIGGE (1988) en utilisant le principe de filtration sur membranes développé par LILLEY *et al.* (1982). La suspension est ensuite cassée et on sépare les organelles à travers un jeu de membranes de différents pores. Le filtrat final correspond à la fraction riche en cytosol. Indépendamment des tests enzymatiques faits, un examen en microscopie électronique a aussi été réalisé sur les différentes fractions obtenues.

L'espace intercellulaire des feuilles a aussi été analysé (VALAT, 1992).

Par l'application de l'ensemble de ces techniques, un haut niveau de purification a pu être obtenu et 5 isozymes de la malate deshydrogénase ont pu être séparés et identifiés: un chloroplastique et NADPH dépendant, deux cytosoliques NADH dépendants, un mitochondrial NADH dépendant et un peroxysomal NADH dépendant.

RÉSULTATS

La capacité de La MDH NADPH dépendante du chloroplaste, en jours courts (état végétatif), évolue de manière hémicircadienne (fig. 1). Le premier pic survient deux heures après le début du jour, le deuxième deux heures après le début de la nuit. Lors du transfert inducteur en lumière continue, on observe une très forte augmentation de la capacité de la MDH durant les quatre premières heures, avec un maximum bien corrélé à la photopériode critique. Un deuxième pic apparaît plus tard, 8 heures après le précédent maximum (fig. 1).

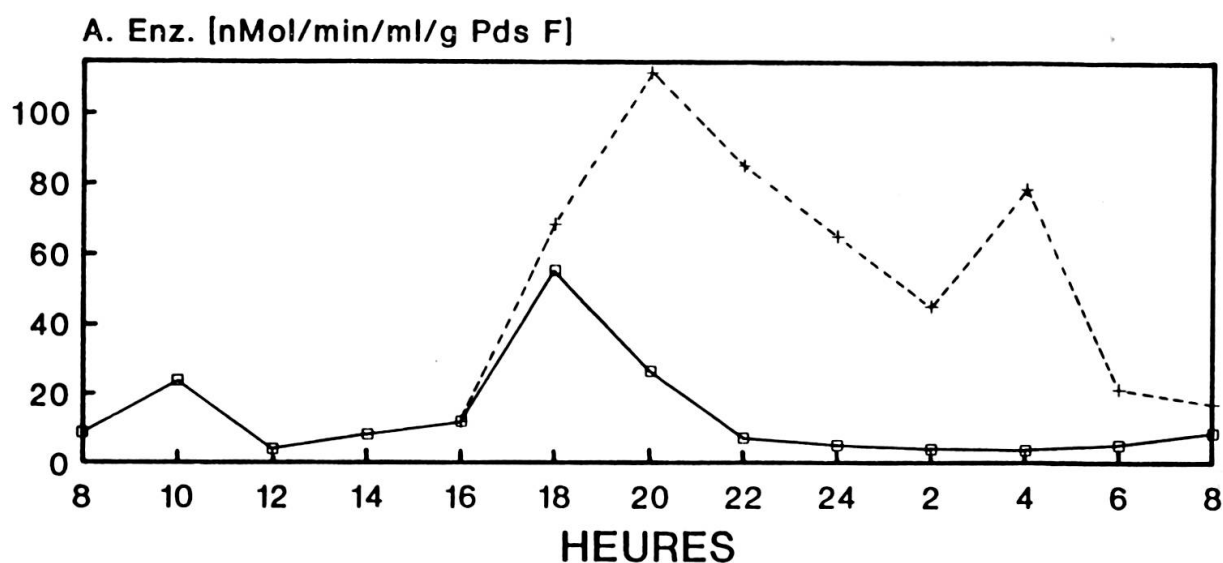


FIG. 1.

Evolution de la capacité de l'activité enzymatique de la MDH NADPH dépendante, extraite du chloroplaste de feuille d'épinard en jours courts (état végétatif: trait continu) et lors du transfert inducteur en lumière continue (trait discontinu).

En lumière continue dès le semis, on observe, chez la plante adulte, une évolution rythmique en libre cours. (fig. 2). Le transfert mimé (MIT) montre que seul le deuxième pic observé lors de l'induction réelle, est de nature irréversible (fig. 3), suite à l'induction florale.

Les figures 4, 5 et 6 montrent l'évolution globale des MDH NADH dépendantes. A l'état végétatif (JC), la capacité enzymatique de ces isozymes augmente deux heures après le début du jour puis diminue rapidement avec un minimum à midi. Cette capacité augmente légèrement durant le début de la nuit et un pic important apparaît en fin de nuit.

Lors du transfert de JC en LC, l'évolution est du même type, mais avec une avance de phase de plus de 4 heures provoquée par l'effet photopériodique et l'interaction avec le chloroplaste. En lumière continue, dès le semis, on constate, chez les plantes adultes, l'existence d'un rythme circadien en libre cours. Le transfert mimé provoque une

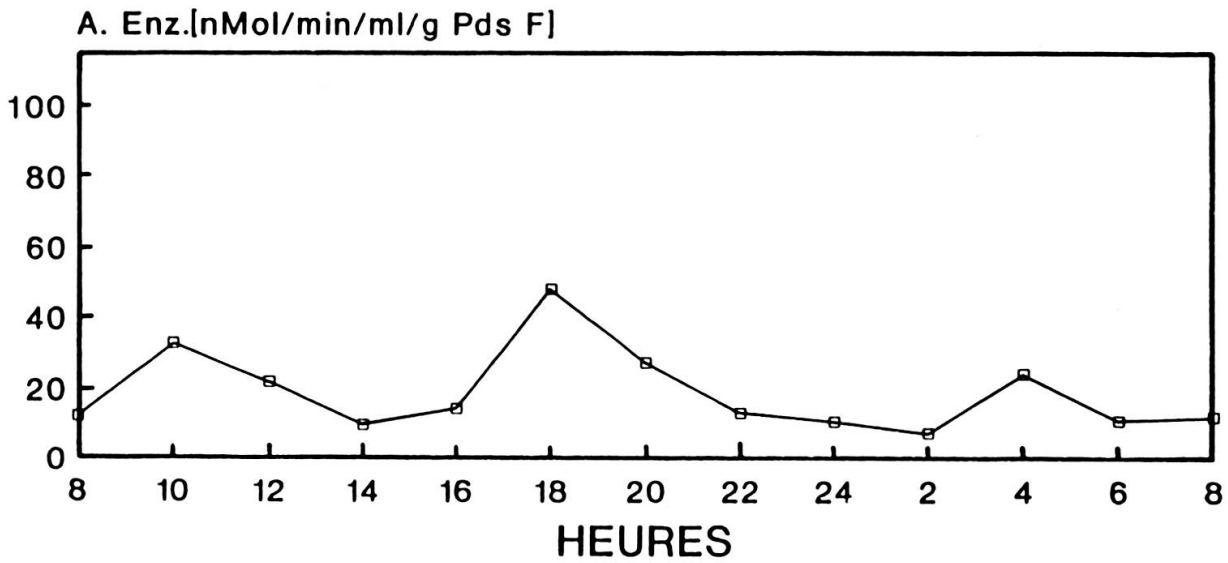


FIG. 2.

Capacité enzymatique de la MDH NADPH dépendante en lumière continue (plante adulte).

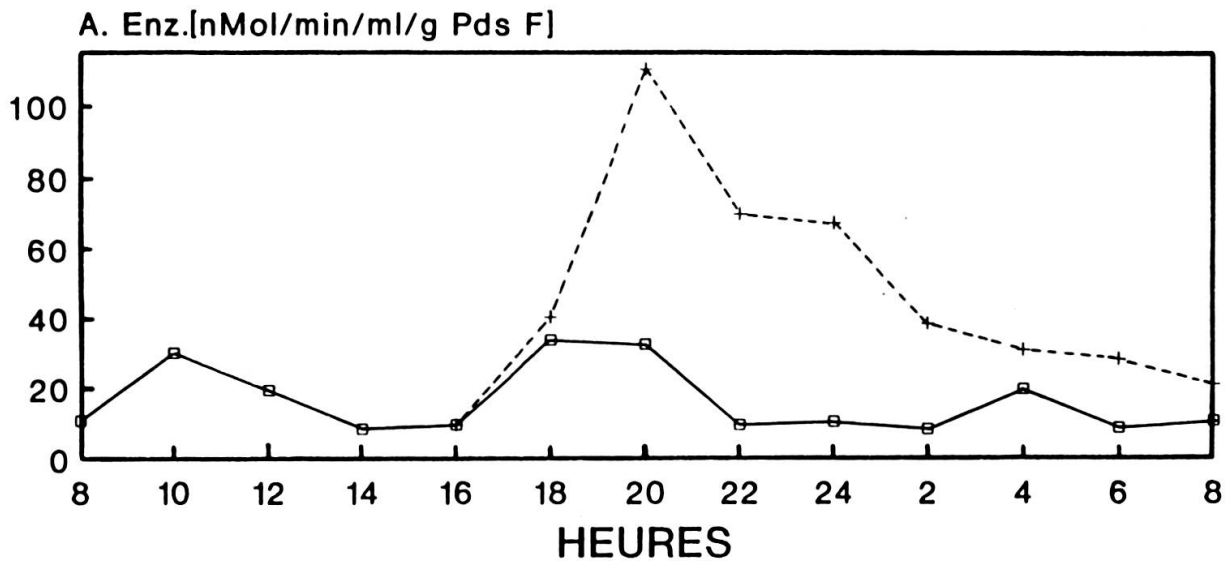


FIG. 3.

Capacité enzymatique de la MDH NADPH dépendante de feuilles induites remises en jours courts (trait continu) puis transférées en lumière continue («induction» mimée: trait discontinu).

stimulation de la capacité de la MDH NADH dépendante plus forte que celle observée lors de l'induction réelle, par contre le deuxième pic est plus faible.

Si quelques modifications irréversibles dans le contrôle de la MDH semblent apparaître lors de l'induction florale, l'effet photopériodique *per se* est beaucoup plus

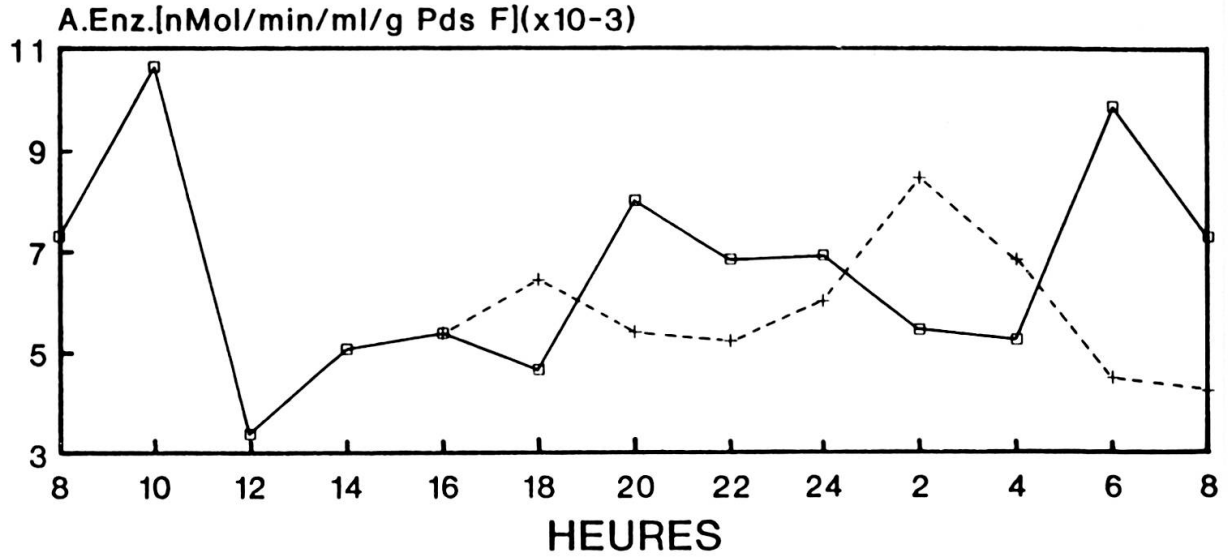


FIG. 4.

Evolution de la capacité de l'activité enzymatique des MDH NADH dépendantes extraites des feuilles (2 isozymes du cytosol, 1 isozyme mitochondrial, 1 isozyme peroxyosomal) de l'épinard en jours courts (état végétatif: trait continu), et lors du transfert inducteur en lumière continue (trait discontinu).

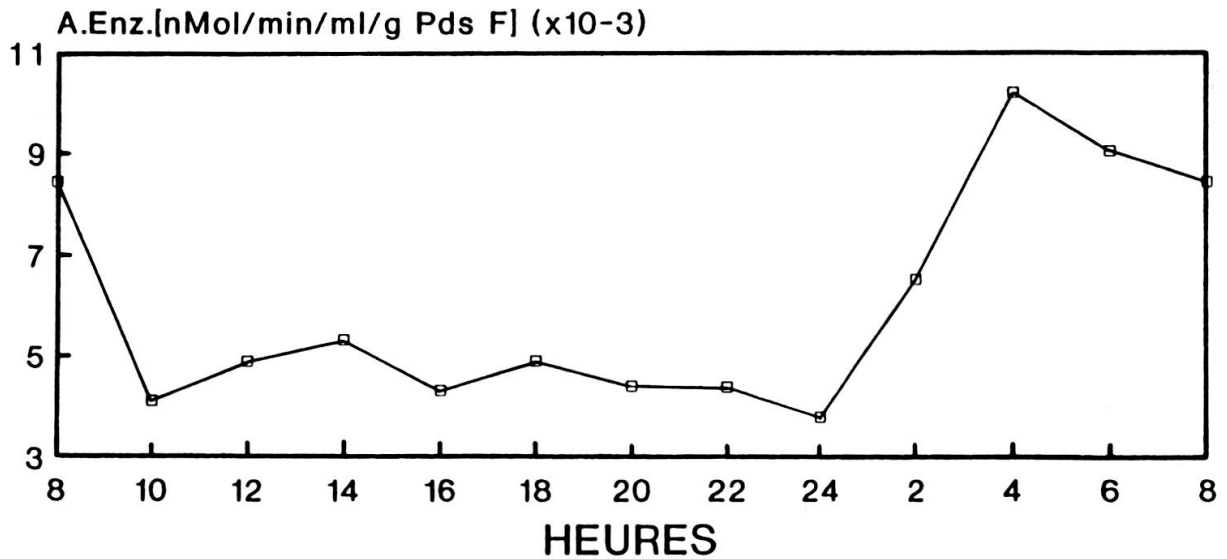


FIG. 5.

Capacité enzymatique des MDH NADH dépendantes en lumière continue (plante adulte).

important. Cela ne signifie pas qu'il n'ait pu jouer un rôle dans l'énergétique liée à la floraison.

Pour comprendre le transfert d'énergie dans les divers compartiments cellulaires et observer si, éventuellement, celui-ci est différent à l'état végétatif ou lors de l'induction florale, nous avons suivi le transfert des équivalents réduits du chloroplaste dans le

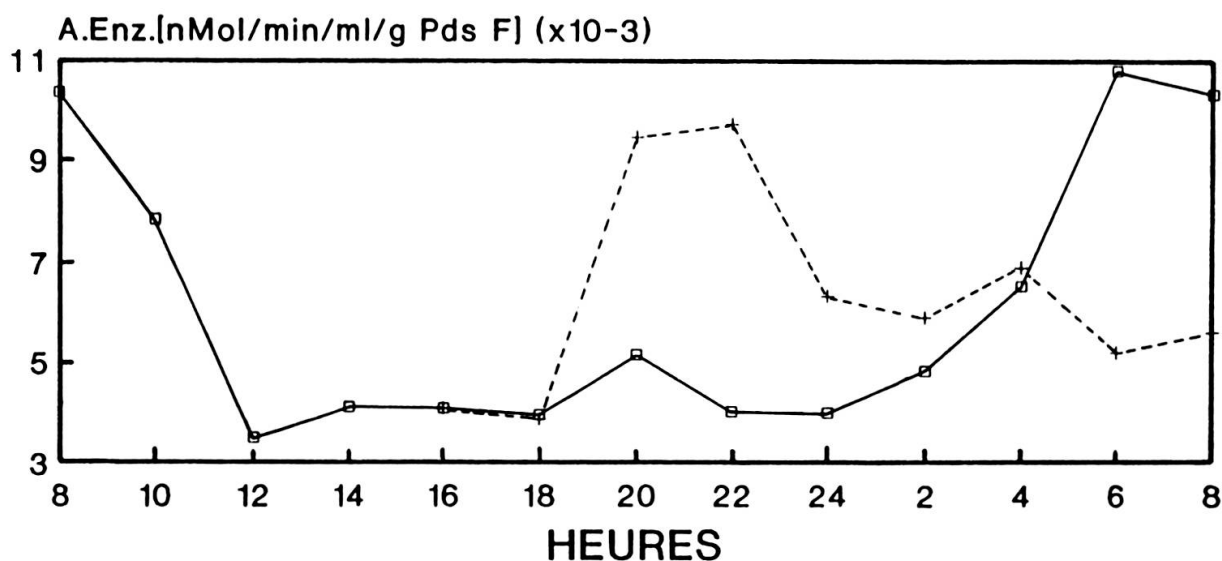


FIG. 6.

Capacité enzymatique des MDH NADH dépendantes de feuilles induites remises en jours courts (trait continu) puis transférées en lumière continue («induction» mimée: trait discontinu).

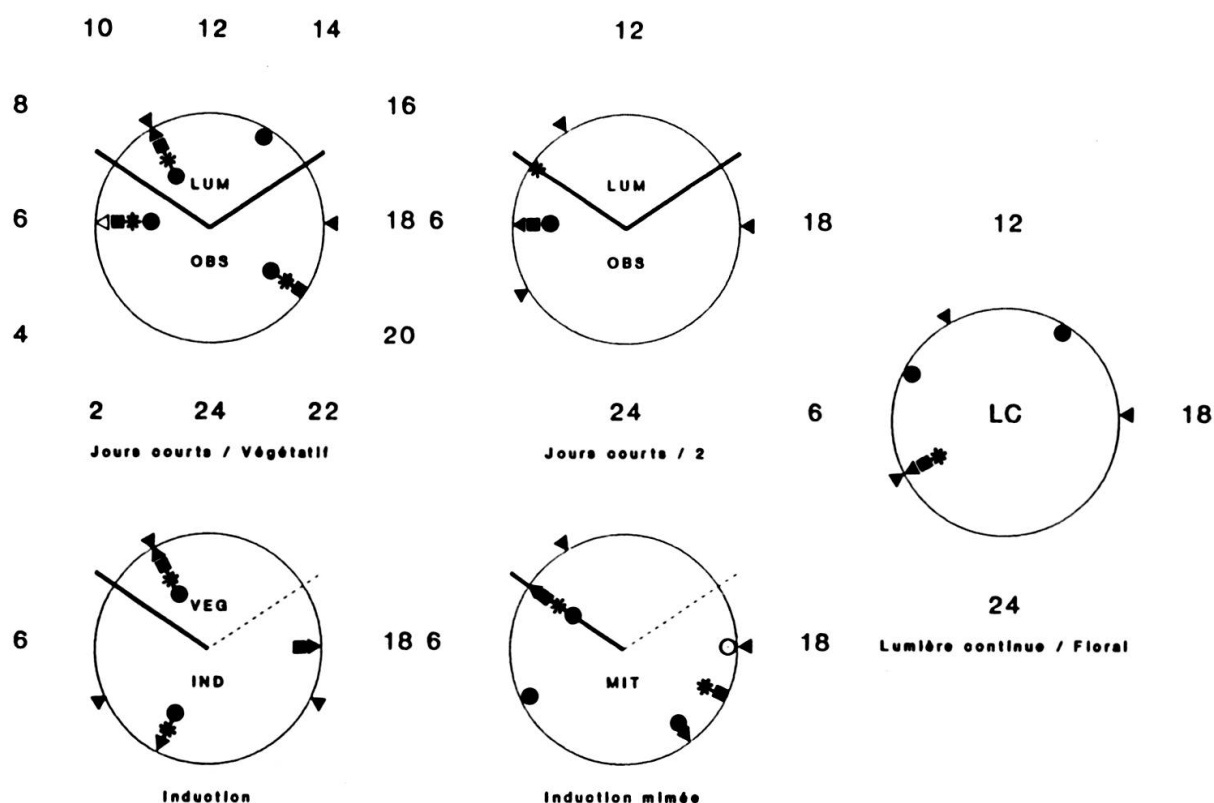


FIG. 7.

Structure temporelle simplifiée des MDH NADP (triangle externe) et NADH dépendantes (triangle interne: cytosol I; carré: cytosol II; étoile: mitochondrie; rond: peroxysome) concernant la position dans le temps local des principaux maxima de l'activité enzymatique (capacité) en jours courts (état végétatif), lors du transfert inducteur en lumière continue; situation en lumière continue dès le semis ou lors de la remise en jours courts (JC/2) d'une plante induite, puis de son transfert en lumière continue («induction» mimée). Les signes vides correspondent à des minima importants.

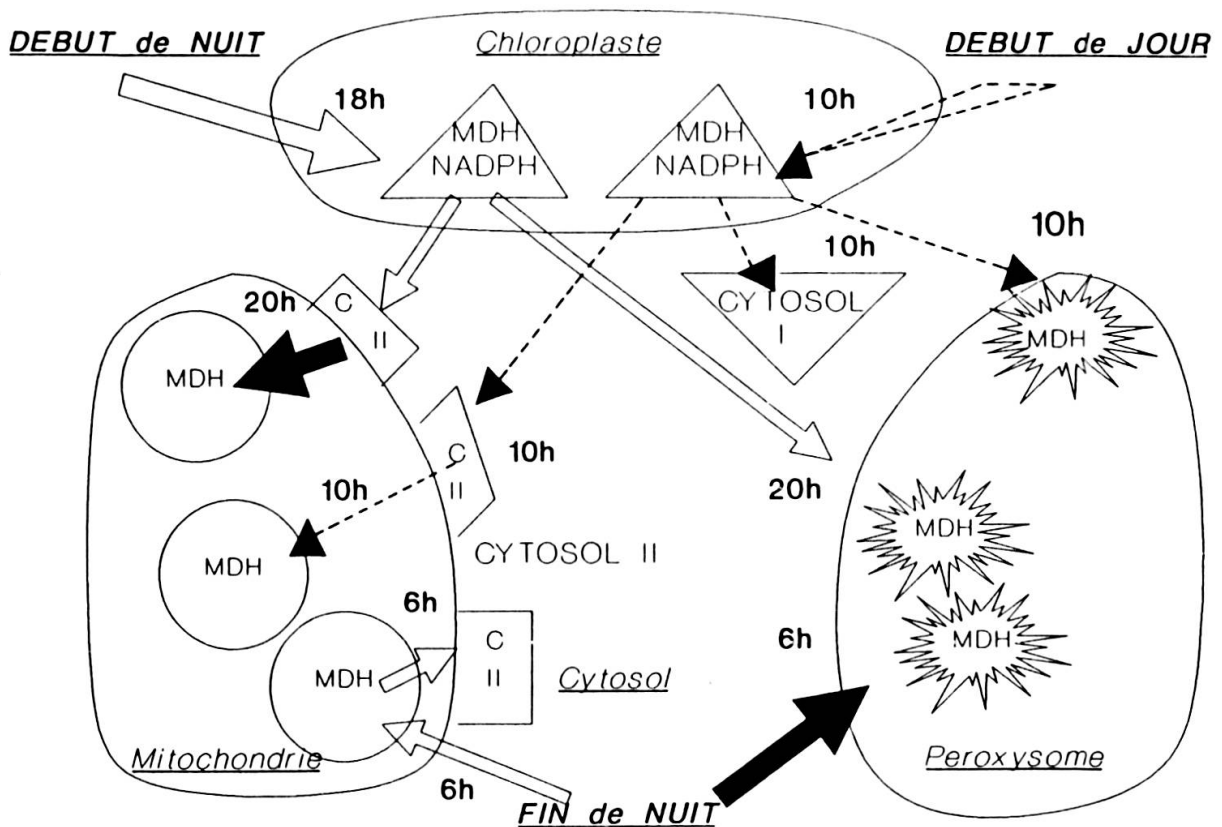


FIG. 8.

Schéma représentant en jours courts (état végétatif) la transduction de la puissance et du signal redox (via le malate et les isozymes de la MDH) dans les différents compartiments cellulaires. Activité importante durant le jour en traits discontinus. En traits continus (nuit) pleins: étapes importantes se distinguant par une augmentation forte de la capacité enzymatique. Le temps correspond à l'heure locale.

cytosol, puis vers les mitochondries et les peroxysomes, toutes les deux heures (VALAT, 1992). L'ensemble des résultats est résumé dans les fig. 7, 8, 9, 10.

Nous constatons que la structure temporelle de la capacité des MDH est très différente en jours courts comparée à la situation en lumière continue où les isozymes ont des activités évoluant en libre cours, avec toutefois un couplage obligé entre l'activité des isozymes cytosoliques et mitochondriales, lesquelles dépendent du chloroplaste pour l'approvisionnement en équivalents réduits via la navette malique.

Le couplage fort observé à l'état végétatif, en jours courts, se maintient mais de manière différente, lors de l'induction florale. Le retour en jours courts d'un système induit ne fait pas apparaître la même structure temporelle que celle observée à l'état végétatif; de même le transfert mimé ne permet pas de revenir à la distribution temporelle des activités observées lors de l'induction réelle.

Comment s'opère l'allumage énergétique (transfert d'équivalents réduits) lors de l'induction florale et ceci par rapport à l'état végétatif (fig. 8, 9, 10)? Examinons, au cours du temps, le sens d'action de la navette malique. Dans un premier temps, en jours

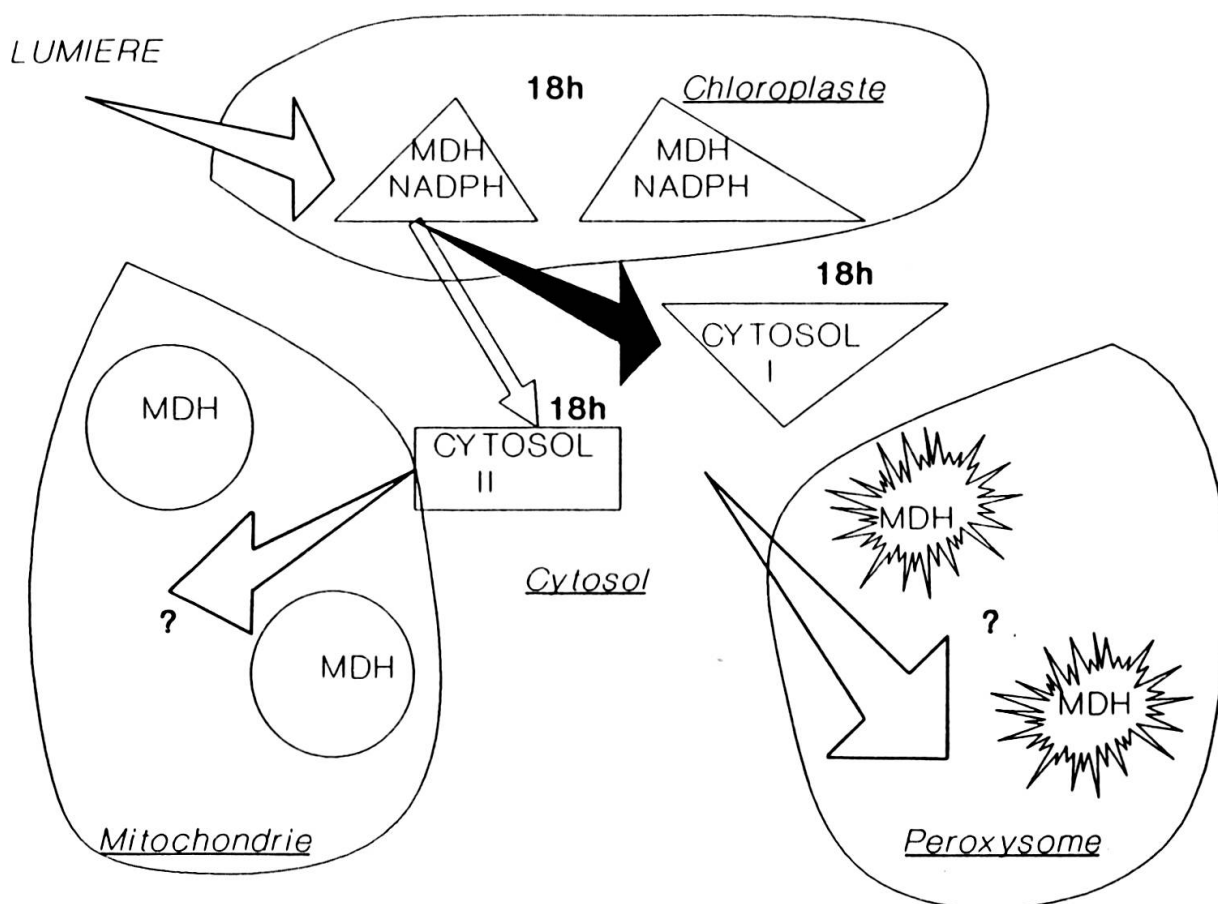


FIG. 9.

Même schéma que la fig. 8, mais lors du transfert en lumière continue (1ère étape: accommodation). En traits continus (lumière) pleins: phase importante quant à son intensité (isozyme du cytosol I).

courts, il y a, en présence de lumière, l'interconversion du NADPH/NADH, par le biais de la navette du malate entre le chloroplaste (source du pouvoir réducteur primaire) et le cytosol, puis vers le peroxysome et la mitochondrie. L'isozyme cytosolique II est responsable de l'interaction via la navette malique avec la mitochondrie. L'activité potentielle de la MDH est particulièrement forte durant la nuit aussi bien dans la mitochondrie que dans le peroxysome (cf. fig. 8).

Lors du transfert en lumière continue (induction florale), on observe une redistribution de l'activité des navettes, c'est-à-dire un fonctionnement différent des voies métaboliques associées aux compartiments analysés. On peut distinguer deux étapes, l'une précoce au voisinage de la photopériode critique (11 heures \pm 1 de lumière) et une deuxième plus tardive (16 à 20 heures de lumière) correspondant probablement à la stabilisation de l'état floral (les protéines spécifiques nouvelles immunodélectables apparaissent dans la feuille après 16 heures de lumière). Ce cheminement énergétique et aussi au titre de message (par l'effet sur les voies métaboliques) se définit à travers deux

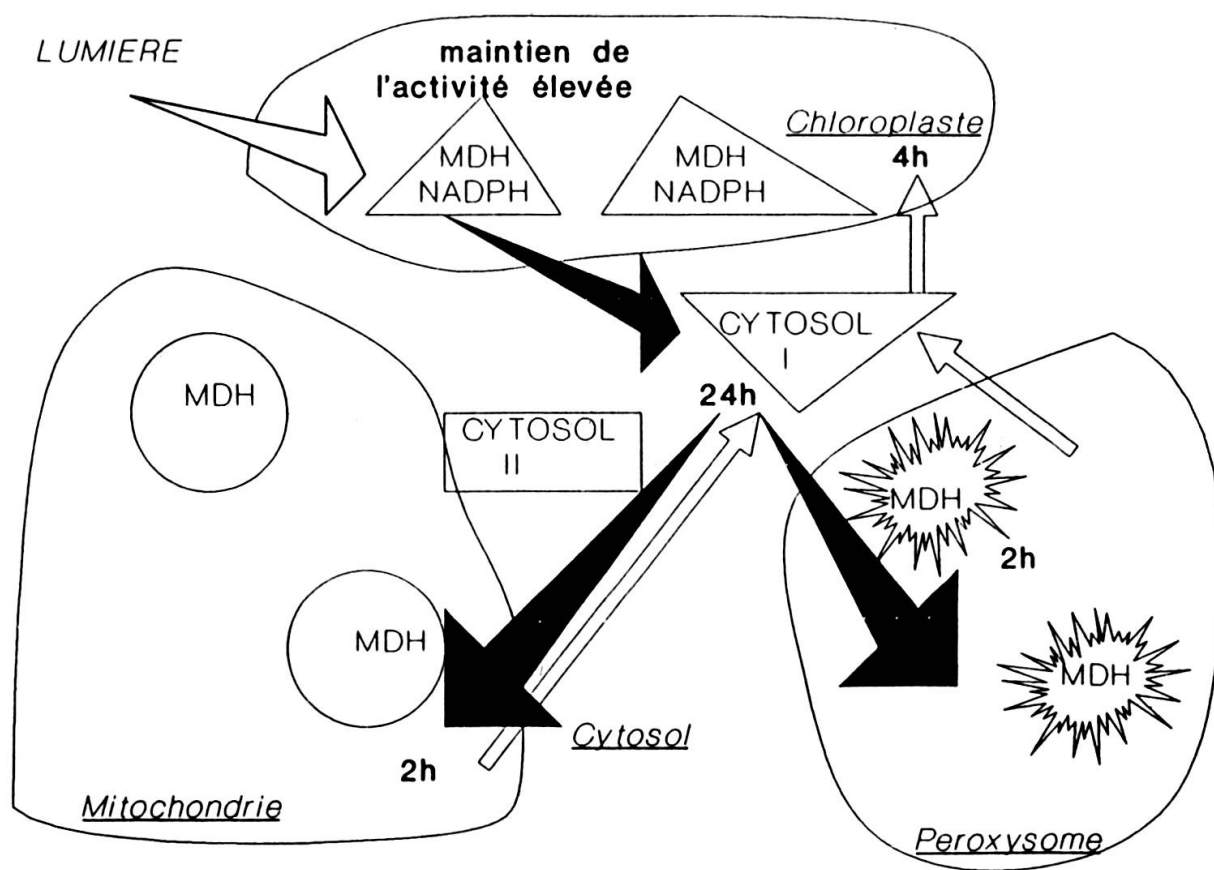


FIG. 10.

Idem fig. 9, mais correspond au deuxième temps de l'induction florale (adaptation). En traits continus (lumière) pleins: augmentation importante de la capacité enzymatique. Le temps correspond à l'heure locale.

composantes: la composante spatiale (compartiments subcellulaires: chloroplaste, cytosol, mitochondrie, peroxyosome) et la composante temporelle (fluctuations rythmiques, structure temporelle des différents rythmes, phase générale d'accommodation-acclimatation suivie d'une phase d'adaptation-assimilation: stabilisation de l'état floral).

Il est bien connu que l'induction florale est habituellement accompagnée d'une augmentation des sucres libres (BERNIER *et al.*, 1981). Chez l'épinard, le rôle de la charge énergétique globale et de la charge rédox catabolique, lors de la photopériode critique (début de l'induction) a bien été mis en évidence (BONZON *et al.*, 1981, 1983, 1985; GREPPIN *et al.* 1990, 1991). L'importance de l'activité de la MDH NADH dépendante I du cytosol confirme et renforce les déductions faites à partir des travaux précédents sur le rôle de l'énergie au moment de l'induction florale. Cette transduction rédox peut constituer un signal métabolique vers la voie de la floraison.

Dès 11 heures \pm 1 de lumière continue (transfert de JC en LC), il y a une forte stimulation de l'activité MDH de l'isozyme cytosolique I puis II. L'activité liée à la mitochondrie est ralentie. Cette première phase d'accommodation photopériodique est réversible. (fig. 9). Lors du deuxième temps, après 14 heures à 18 heures de lumière

continue, il y a forte activation des MDH des mitochondries et des peroxysomes. L'isozyme du cytosol I joue toujours un rôle prépondérant (fig. 10).

CONCLUSION

Les résultats présentés montrent comment l'organisation temporelle des isozymes de la MDH dans des feuilles à l'état végétatif est transformée lors de l'induction à fleurir par voie photopériodique, ceci pour aboutir à un pattern caractéristique de l'état floral. Ils montrent, dans la séquence des événements inducteurs, le rôle important de l'isozyme chloroplastique et de celui du cytosol I, et dans une moindre mesure du cytosol II. Ceci doit contribuer à l'augmentation de la charge rédox catabolique des pyridine-nucléotides.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAM, V. et P. RUSTIN (1986). Isolation, purification and photosynthetic activity of chloroplasts from *Kalanchoe blossfeldiana*, a CAM-performing plant. *Physiol. veg.*, 24(6): 663-671.
- AEBI, H. (1974). In: *Methoden der Enzymatischen Analyse*, vol. 1: 713. H. U. Bergmeyer, ed. Verlag Chemie, Weinheim.
- ALLAWAY, W.G. (1981). Anions in stomatal operation. In *Stomatal physiology*, 71-85; Jarvis et Mansfield, ed. Cambridge University Press.
- BERNIER, G., KINET J.M., SACHS, R.M. (1981). *The Physiology of Flowering*, CRC Press, Boca Raton, Fl.
- BLACK, C.C. (1973). Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake. *Ann. rev. Plant Physiol.*, 24: 253-286.
- BONZON, M., HUG, M., WAGNER, E., GREPPIN, H. (1981). Adenine nucleotides and energy charge evolution during the induction of flowering in spinach leaves. *Planta* 152: 184-194.
- BONZON, M., SIMON, P., GREPPIN, H., WAGNER, E. (1983). Pyridine nucleotides and redox charge evolution during the induction of flowering in spinach leaves. *Planta*, 159: 254-260.
- BONZON, M., DEGLI AGOSTI, R., WAGNER, E., GREPPIN, H. (1985). Enzyme patterns in energy metabolism during flower induction in spinach leaves. *Plant Cell Environ.*, 8: 303-308.
- BONZON, M., SIMON, P., DEGLI AGOSTI, R., GREPPIN, H., WAGNER, E. (1987). Activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isozymes during photoperiodic floral induction in spinach leaves. *Physiol. Plantarum*, 70: 577-582.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitative determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 76: 248-254.
- BRINKMAN, F.G., DONKERS, C.K., SMETT, J.J. ET L.H.W. VAN DER PLAS (1982). Respiration rate and redox state of NAD during wound-induced differentiation of potato tuber tissue (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci. Lett.*, 27: 29-36.
- BRUINSMA, J. (1961). A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochem. Biophys. Acta*, 52: 576-578.
- BRULFERT, J., GUERRIER, D., et O. QUEIROZ (1975). Photoperiodism and Enzyme Rhythms: kinetic characteristics of the photoperiodic induction of Crassulacean Acid Metabolism. *Planta*, 125: 33-44.
- DAVIES, D.D. (1978). Control of glycolysis in plant storage tissues. In: *Biochemistry of wounded plant tissue*, 309-346, W. de Gruyter ed., Berlin.

- DAVIES, D.D. (1979). The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30: 131-158.
- DAY, D.A. et J.T. WISKICH (1984). Transport processes of isolated plant mitochondria. *Physiol. vég.*, 22: 242-261.
- DEITZER, G.F., KEMPF O., FISCHER S. ET E. WAGNER (1974). Endogenous Rhythmicity and Energy Transduction IV Rhythmic Control of Enzymes involved in the tricarboxylic-acid Cycle and the oxidative pentose-phosphate Pathway in *Chenopodium rubrum* L., *Planta*, 117: 29-41.
- DE LOOZE, S. (1980). In vitro and in vivo regulation of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isozymes from *Chenopodium rubrum*. Thèse, Université de Freiburg i. Br.
- DE LOOZE, S. et E. WAGNER (1983). In vitro and in vivo regulation of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isozymes from *Chenopodium rubrum* I. Purification and properties of isozymes. *Physiol. plantarum*, 57: 231-237.
- DIALLO, N. ET C. QUEIROZ-CLARET (1983). Effet du chlorure de sodium sur le métabolisme carboné de *Cakile maritima* et *Kalanchoë blossfeldiana*. *Physiol. vég.*, 21(4): 621-632.
- DOUCE, R. et J. JOYARD (1979). Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. In: *Plant Organelles*, 9: 47-59, E. Reid ed. J. Wiley & Sons, N.Y.
- EISING, R. et B. GERHARDT (1986). Activity and hematin content of catalase from greening sun flower cotyledons. *Phytochemistry*, 25(1): 27-31.
- FELLE, H. (1988). Short-term pH regulation in plants. *Physiol. Plantarum*, 74: 583-591.
- GARDESTRÖM, P. et B. WIGGE (1988). Influence of photorespiration on ATP/ADP ratio in the chloroplasts, mitochondria and cytosol, studies by rapid fractionation of Barley (*Hordeum vulgare*) protoplasts. *Plant Physiol.* 88: 69-76.
- GREPPIN, H., BONZON, M., CRESPI, P., CREVECŒUR, M., DEGLI AGOSTI, R. et C. PENEL (1990). Physiological macrofunctions and indicators of the flowering process. In: *Intra-and intercellular communications in plants*, 107-123, B. Millet et H. Greppin, ed. INRA, Paris.
- GREPPIN, H., BONZON, M., CRESPI, P., CREVECŒUR, M., DEGLI AGOSTI, R., PENEL, C. et P. TACCHINI (1991). Communication in Plants. In: *Plant Signalling, Plasmamembrane, and Change of State*, 139-177, C. Penel et H. Greppin, ed., Genève.
- GUERN, J., MATHIEU, Y. et A. KURDJIAN (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and the regulation of intracellular pH in plant cells. *Physiol. vég.* 21: 855-866.
- HATCH, M.D. et C.R. SLACK (1969). NAD-specific malate dehydrogenase and glycerate kinase in leaves and evidence for their location in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 34: 589-593.
- HILL, R.L. et R.A. BRADSHAW (1969). Fumarase. In: *Methods of Enzymology*, 13(7): 91, S.P. Colowick and N.O. Kaplan, ed. Academic Press, N.Y.
- HOOK, D.D. et CRAWFORD, R.M. (1978). *Plant life in anaerobic environment*. Ann. Arbor Science, Ann. Arbor.
- KENT, S.S. (1979). Photosynthesis in the higher plant *Vicia faba* V. Role of malate as a precursor of the tricarboxylic acid cycle. *Plant Physiol.*, 64: 159-161.
- KING, T.P. (1972). Separation of protein by ammonium sulfate gradient solubilization. *Biochemistry*, 11(3): 367-371.
- KLUGE, M. (1979). The flow of carbon in crassulacean acid metabolism (CAM). In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, 6: 113-125, M. Gibbs et E. Latzko, ed. Springer Verlag, Berlin.
- LANCE, C. et P. RUSTIN (1984). The central role of malate in plant metabolism. *Physiol. vég.*, 22(5): 625-641.
- LATIES, G.G. (1982). The cyanide-resistant alternative path in higher plant respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 33: 319-555.
- LATZKO, E. et G.J. KELLY (1983). The many-faceted function of phosphoenol pyruvate carboxylase in C₃ plants. *Physiol. vég.*, 21: 805-815.
- LEWITT, J.L. (1980). *Responses of plants to environmental stresses*, Academic Press, N.Y.
- LILLEY, R., M. STITT, G. MADER et H. HELDT (1982). Rapid fractionation of wheat leaf protoplasts using membrane filtration. *Plant Physiol.*, 70: 965-970.

- LÜTTGE U. et J.A.C. SMITH (1988). CAM plants, Solute transport in plant cells and tissues. In D.A. Baker et J.L. Hall, ed., Longman Sc. & Tech., N.Y.
- MARIGO, G., BONYSSOV, H. et A.M. BOUDET (1986). Accumulation des ions nitrate et malate dans les cellules de *Catharanthus roseus* et incidence sur le pH vacuolaire. *Physiol. vég.* 24(1): 15-23.
- MOURIOUX, G. et R. DOUCE (1981). Slow passive diffusion of orthophosphate between intact isolated chloroplasts and suspending medium. *Plant Physiol.*, 67: 470-473.
- MOYSE, A. (1976). Les types métaboliques des plantes: C₄ et CAM. Comparaison avec les plantes C₃. *Physiol. vég.*, 14(3): 533-550.
- NAIK, M.S. et D.J.D. NICHOLAS (1986). Malate metabolism and its relation to nitrate assimilation in plants. *Phytochemistry*, 25(3): 571-576.
- NISHIMURA, M. et T. AKAZAWA (1975). Photosynthetic activities of spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 55: 712-716.
- O'LEARY, M.H. (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase. An enzymologist's view. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 33: 297-315.
- OSMOND, C.B. et J.A.M. HOLTHUM (1981). Crassulacean acid metabolism. In: *The biochemistry of plants*, 8: 283-328, M.D. Hatch and N.K. Boardman, ed. Academic Press, N.Y.
- PALMER, J.M. (1976). The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 27: 133-157.
- PALMER, J.M. (1984). Oxidation of malate and NADH by plant mitochondria. *Physiol. vég.* 22: 665-673.
- PIERRE, M. (1984). Effets non visibles de la pollution des végétaux par le SO₂. Thèse, Université P. et M. Curie, Paris.
- QUAIL, P.H. (1979). Plant cell fractionation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30: 425-484.
- QUEIROZ, O. (1965). Sur le métabolisme acide des crassulacées. *Physiol. vég.* 3(3): 203-213.
- QUEIROZ, O. (1976). Chronobiologie du système CAM. *Physiol. vég.*, 14(3): 629-639.
- QUEIROZ, O. (1979). Rhythms of enzyme capacity and activity as adaptative mechanisms. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, 6: 126-139, M. Gibbs et E. Latzko, ed. Springs Verlag, Berlin.
- RUFFNER, H.P., BREM, S. et D.M. RAST (1983). Pathway of photosynthetic malate formation in *Vitis vinifera*, a C₃ plant. *Plant Physiol.*, 73: 582-585.
- RUSTIN, P., MOREAU, F., et C. LANCE (1980). Malate oxidation in plant mitochondria via malic enzyme and the cyanide-insensitive electron transport pathway. *Plant Physiol.* 66: 457-463.
- SCHNARRENBERGER, C., GROB, D., BURKHARD, C.J. et M. HERBERT (1980). Cell organelles from crassulacean acid metabolism (CAM) plants. II Compartmentation of enzymes of the crassulacean acid metabolism. *Plants*, 147: 477-484.
- SCHWITZGUEBEL, J.P. et P.A. SIEGENTHALER (1984). Purification of peroxisomes and mitochondria from spinach leaf by Percoll gradient centrifugation. *Plant Physiol.* 75: 670-674.
- SIMON, P. (1985). Calcium, calmoduline et chloroplaste: Etude de la NADkinase. Thèse No 2178, Université de Genève.
- TABEKE, I., OTSUKI, Y. et S. AOKI (1968). Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant Cell Physiol.*, 9: 115-124.
- VALAT, M. (1992). Etude, dans la feuille de l'épinard (*Spinacia oleracea*), des isozymes de la malate deshydrogénase: régime lumineux et floraison. Thèse No 2531, Université de Genève.
- VIDAL, J., RIO, M.C. et P. GODAL (1977). Etude de l'évolution de la malate deshydrogénase à NADP durant le verdissement des feuilles de *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Sc. Lett.* 8: 243-249.
- WALKER, D.A. (1976). Plastids and intracellular transport. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, 3: 85-136. C.R. Stocking and U. Heber, ed. Springer Verlag, Berlin.
- WHARTON, D.C. et A. TZAGOLOFF (1967). Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. In: *Methods in enzymology* X: 245-250. S.P. Colowick and N.O. Kaplan, ed. Academic Press, N.Y.
- WILLMER, C.M. (1981). Guard cell metabolism. In: *Stomatal physiology*, 81-102, Jarvis et Mansfield ed. Cambridge Univ. Press.

- WILLMER, C.M. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and stomatal operation. *Physiol. vég.* 21: 943-953.
- WISKICH, J.T. (1977). Mitochondrial metabolite transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 45-69.
- WOO, K.C., JOKINEN, M. et T. CANVIN (1980). Reduction of nitrate via the dicarboxylate shuttle in a reconstituted system of supernatant and mitochondria from spinach leaves. *Plant Physiol.*, 65: 433-436.

Manuscrit reçu le 15 juillet 1992.