

PHOTOPERIODISME ET ACTIVITE ENZYMATIQUE (PEP CARBOXYLASE ET ENZYME MALIQUE) DANS LES FEUILLES DE *KALANCHOE BLOSSFELDIANA*

ORLANDO QUEIROZ

C.N.R.S., Laboratoire du Phytotron, 91 Gif-sur-Yvette, France

(Received 7 February 1969)

Résumé—Dans les feuilles jeunes de *Kalanchoe blossfeldiana*, les jours courts induisent une rapide augmentation de l'activité de la PEP carboxylase et de l'enzyme malique, qu'accompagne le développement d'un rythme circadien d'activité, propre à chacune de ces enzymes. Cette action est annulée par un bref éclairement rouge donné au milieu de la nuit longue. Une hypothèse de travail propose, pour ce processus, un mécanisme basé sur l'activation de la synthèse de PEP carboxylase par le système du phytochrome et sur une régulation de son activité par l'acide malique.

Abstract—In young leaves of *Kalanchoe blossfeldiana*, short days induce a rapid rise in PEP carboxylase and malic enzyme activities together with the establishment of a circadian rhythm of activity. This action is inhibited by red light given as a night-break. As a working hypothesis for this process, we propose a mechanism based on the activation of PEP carboxylase synthesis by the phytochrome system and feedback regulation of its activity by malic acid.

INTRODUCTION

L'IMPORTANTE fluctuation journalière de la teneur en acides organiques, particulièrement en acide malique, remarquée tout d'abord dans les feuilles de Crassulacées, mais observée également chez plusieurs espèces non crassulentes, a été l'objet de nombreux travaux et de mises au point importantes.¹⁻³ Ce "Métabolisme Acide des Crassulacées" peut être schématiquement décrit comme étant une forte accumulation d'acide malique dans les feuilles pendant la nuit, suivie, à la lumière, d'une baisse sensible de teneur en cet acide. Dès que le rôle du CO₂ en tant que substrat direct pour la synthèse d'acide a été compris, un certain nombre de travaux utilisant le ¹⁴CO₂ ont permis d'établir comme voie de synthèse immédiate la β -carboxylation du phosphoenolpyruvate (PEP) suivie de la réduction de l'oxaloacétate en malate. Le rôle d'enzymes responsables a ainsi été attribué à la PEP carboxylase (EC 4.1.1.31) et à la malique déshydrogénase à NADH₂ (EC 1.1.1.37), pour la synthèse d'acide malique, et, pour sa dégradation à l'enzyme malique à NADP (EC 1.1.1.40).⁴

Dès 1954, Gregory, Spear et Thimann⁵ observèrent que le cultivar Tom Thumb de *Kalanchoe blossfeldiana* montrait, en régime de jours courts, une aptitude à la fixation nocturne et à l'émission diurne de CO₂, inexistante en jours longs, et n'apparaissant pas en jours courts accompagnés d'interruption de la nuit. L'étude de ce déterminisme photopériodique caractérisé a été plus récemment reprise et développée au Phytotron de Gif: le nombre croissant de jours courts (pendant une durée d'expérience de 5 semaines) provoque une augmentation exponentielle de la teneur en acide malique, dosé en fin de nuit, ainsi qu'une amplification

¹ S. L. RANSON et M. THOMAS, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **11**, 81 (1960).

² J. WOLF, *Handb. Pflanzenphysiol.* XII-2, 809, Springer-Verlag, Berlin (1960).

³ A. MOYSE, *Travaux dédiés à Lucien Plantefol*, 21, Masson et Cie, Paris (1965).

⁴ D. A. WALKER, *Biochem. J.* **74**, 216 (1960).

⁵ F. G. GREGORY, I. SPEAR et K. V. THIMANN, *Plant Physiol.* **29**, 220 (1954).

de ses oscillations journalières; par contre, l'interruption de la nuit longue par un court éclairement rouge empêche cette action.^{6,7} Ces résultats obtenus avec *Kalanchoe blossfeldiana* suggéraient d'une part l'hypothèse d'une commande photopériodique du niveau de synthèse des enzymes responsables, ou de leur activité, et d'autre part, le fonctionnement de mécanismes de régulation justifiant les oscillations de métabolite constatées.

Plusieurs travaux ont rendu compte, indépendamment du facteur photopériodisme, de l'existence d'oscillations circadiennes dans l'activité de certaines enzymes ou groupes d'enzymes. Il en est ainsi des phosphatases, étudiées par Ehrenberg sur *Kalanchoe blossfeldiana*,⁸ plus tard par Sanwal et Krishnan⁹ chez les *Cactus* et récemment par Mishra et Mohanty sur *Vigna catjan*:¹⁰ ces auteurs trouvèrent pour les phosphatases une activité maximum au milieu de la journée, ce qu'ils ont associé, citant Rao,¹¹ à la baisse de teneur en acides organiques susceptibles d'inhiber l'activité des enzymes. D'autre part, Sanwal et Krishnan, dans le travail cité,⁹ constatèrent une augmentation d'activité de l'aldolase à l'obscurité, ce qu'ils ont suggéré être une réponse adaptative conduisant à une plus forte synthèse de PEP, accepteur de CO₂ dans les réactions d'acidification nocturne. Par ailleurs, les rythmes circadiens et les mécanismes oscillatoires des transaminases et autres enzymes du métabolisme des acides aminés ont été étudiés dans le foie de rat.^{12,13}

Beaucoup moins nombreuses sont, par contre, les études concernant les variations d'activité enzymatique en réponse à des changements de traitement photopériodique. Et, bien que Walker¹⁴ et Stiller,¹⁵ comme le soulignent Beevers et coll.,¹⁶ n'aient pas remarqué ce type de variations pour les enzymes directement associées à la synthèse de malate chez les Crassulacées, l'observation récente¹⁷ de l'apparition, dans les cotylédons de *Pharbitis nil* placé en nuits longues, d'ARNm de constitution différente de celle observée en nuits longues interrompues, renforce l'hypothèse de l'existence de telles modifications dans le contingent enzymatique responsable de séquences du métabolisme sensibles à la photopériode.

C'est dans ce cadre que se place le travail rapporté ici, lequel concerne les variations d'activité des enzymes de synthèse et de dégradation de l'acide malique mesurées dans l'extrait soluble total de jeunes feuilles de *Kalanchoe blossfeldiana* Tom Thumb cultivés en jours longs puis placés en jours courts avec ou sans interruption de la nuit. Le point de vue sous lequel cette étude a été conduite était la mise en évidence d'éventuels changements de potentialité enzymatique de ces feuilles sous l'action cumulative des jours courts, changements qui justifiaient les variations de concentration d'acide malique déjà observées. En d'autres termes, la question était de savoir si l'action du système photosensible de type phytochrome, de l'état duquel dépend le taux de synthèse de l'acide malique par carboxylation nocturne, modifiait le niveau de la "population" des enzymes concernées ou, au contraire, affectait la capacité d'utilisation par les tissus d'enzymes toujours disponibles.

⁶ O. QUEIROZ, *Physiol. Vég.* **3**, 203 (1965).

⁷ O. QUEIROZ, *Physiol. Vég.* **4**, 323 (1966).

⁸ M. EHRENBERG, *Planta* **43**, 528 (1954).

⁹ G. G. SANWAL et P. S. KRISHNAN, *Nature* **188**, 664 (1960).

¹⁰ D. MISHRA et B. MOHANTY, *Planta* **75**, 239 (1967).

¹¹ J. J. RAO, *Proc. Indian Acad. Sci.* **62B**, 149 (1965).

¹² V. R. POTTER, R. A. GEBERT et H. C. PITOT, *Advan. Enzymol. Regul.* **4**, 247 (1966).

¹³ M. CIVEN, R. ULRICH, B. M. TRIMMER et C. B. BROWN, *Science* **157**, 1563 (1967).

¹⁴ D. A. WALKER, Ph.D. Thesis, Newcastle-upon-Tyne Univ. (1956).

¹⁵ M. L. STILLER, Ph.D. Thesis, Purdue Univ. (1959).

¹⁶ H. BEEVERS, M. L. STILLER et V. S. BUTT, *Plant Physiol.* **IVB**, (éd. F. C. STEWARD), p. 119, Academic Press, Londres et New York (1966).

¹⁷ K. YOSHIDA, K. UMEMURA, K. YOSHINAGA et Y. OOTA, *Plant Cell Physiol.* **8**, 97 (1967).

RÉSULTATS

Le premier point dont il faut tenir compte est la différence d'ordre de grandeur de l'activité des trois enzymes considérées (Tableau 1): l'activité de la PEP carboxylase et de l'enzyme malique, de l'ordre de quelques unités d'enzyme par mg de matière sèche (UE/mg PS), est toujours tellement plus faible que l'activité de la malique déshydrogénase que celle-ci ne doit, *à priori*, jouer aucun rôle régulateur dans la séquence de réactions. On peut par contre s'attendre à une régulation au niveau de la PEP carboxylase dans la mesure où elle intervient dans un branchement métabolique important, lui assignant probablement un rôle anaplérotique.¹⁸ Chez *Escherichia coli*, une telle régulation semble assurée par l'action de produits terminaux, comme l'acide malique ou aspartique, ainsi que par l'acetylcoenzyme A,¹⁹ alors que les enzymes extraites de feuilles d'épinard n'ont pas montré les mêmes caractéristiques;²⁰ d'autre part la régulation de la PEP carboxylase par l'acide malique agissant comme produit terminal a été établie dans les racines de maïs.²¹

TABLEAU 1. EXEMPLE D'ACTIVITÉ DES ENZYMES INTERVENANT DANS LA SYNTHÈSE ET LA DÉGRADATION DE L'ACIDE MALIQUE

Enzyme	Activité en UE/mg PS*		
	JL	35e JC + NI	35e JC
PEP carboxylase	0,20	0,45	3,43
Malique déshydrogénase	68,70	76,50	250,00
Enzyme malique	0,26	1,44	0,99

* Mesurée à 18 h, au début de l'expérience, en jours longs (JL) et après 35 jours courts (JC) donnés avec ou sans interruption de la nuit (NI).

Dans les extraits non purifiés de *Kalanchoe blossfeldiana*, l'acetylcoenzyme A n'a montré aucune action sur l'activité de la PEP carboxylase; par contre celle-ci est inhibée par l'acide malique en tant que produit terminal de la séquence enzymatique, à des concentrations qui, comparativement, ne modifient pas sensiblement l'activité de la malique déshydrogénase seule.²² La non-réversibilité d'action de cette dernière a également été vérifiée. Il semblait donc vraisemblable de voir l'augmentation en acide malique due aux jours courts se répercuter en retour sur l'activité de la séquence de synthèse, au niveau de la PEP carboxylase. La Fig. 1 met en évidence que l'action cumulative des jours courts, sur l'activité de cette enzyme présente un double aspect: augmentation progressive des valeurs et développement d'un rythme circadien qui évolue avec le nombre de jours courts. Plus précisément il est à constater que:

L'activité va en augmentant dans l'ensemble du cycle nyctéméral, lentement d'abord, de plus en plus vite ensuite à mesure qu'augmente le nombre de jours courts;

Simultanément, il y a développement d'un périodisme circadien dans lequel l'écart

¹⁸ H. L. KORNBERG, *Essays in Biochemistry*, 2 (éd. P. N. CAMPBELL et G. D. GREVILLE) p. 1, Academic Press, Londres (1966).

¹⁹ J. L. CANOVAS et H. L. KORNBERG, *Biochem. Biophys. Acta* 96, 169 (1965).

²⁰ K. IZUI, K. IWATANI, T. NISHIKIDO et H. KATSUKI, *Biochem. Biophys. Acta* 139, 188 (1967).

²¹ I. P. TING, *Plant Physiol.* 42, S-3 (1967).

²² O. QUEIROZ, *Physiol. Vég.* 6, 117 (1968).

entre la plus forte et la plus faible valeur de la journée va en augmentant, tandis qu'il y a un déplacement apparent de ces points d'activité maximum et minimum: ceux-ci sont situés, en jours longs et pendant les premiers jours courts, respectivement à 9 h et à 18 h; mais l'augmentation d'activité à 18 h étant de plus en plus rapide par rapport à celle qui a lieu à 9 h, le maximum d'activité se place par la suite vers 18-19 h, c'est-à-dire en fin de jour ou début de nuit, et le minimum vers 9 h, fin de la nuit, ou peut-être encore plus tôt, dans la 2^{ème} moitié de la nuit.

Parallèlement à cette action sur la PEP carboxylase, le passage d'un régime de jours longs à un régime de jours courts provoque en ce qui concerne l'enzyme malique (Fig. 1) une augmentation globale d'activité qui tend à plafonner dès le 10^{ème} jour court, avec un maximum qui s'établit vers 9 h et un minimum vers 18 h.

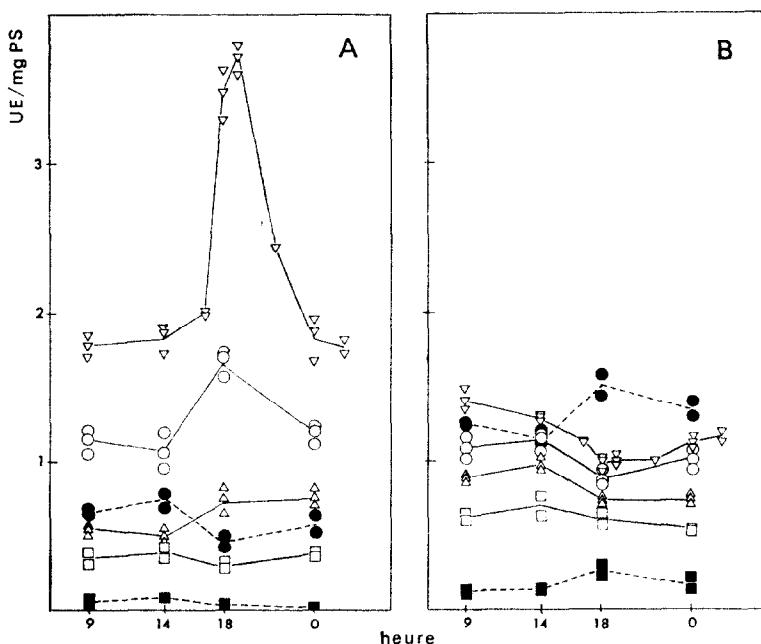


FIG. 1. ACTIVITÉ, EN UNITÉS D'ENZYME PAR mg DE MATIÈRE SÈCHE, DE LA PEP CARBOXYLASE (A) ET DE L'ENZYME MALIQUE (B), AU DÉPART DE L'EXPÉRIENCE, EN JOURS LONGS (■), AU 10^e (□), 18^e, (△), 27^e (○) ET 37^e (▽) JOURS COURTS, AINSI QU'AU 37^e JOUR COURT AVEC NUIT INTERROMPUE (●).

Ces dosages, effectués en présence de teneurs saturantes de substrat, donnent donc une mesure de la *capacité enzymatique nette*, c'est-à-dire des possibilités enzymatiques des tissus aux différentes heures du jour, suivant le nombre de jours courts reçus. Il est intéressant de considérer dans ces conditions l'évolution du rapport de la capacité de synthèse à la capacité de dégradation d'acide malique (Fig. 2): il apparaît que la capacité de synthèse, d'abord globalement plus faible, prend, plus ou moins rapidement selon l'heure du jour, le dessus sur la capacité de dégradation, pour devenir nettement beaucoup plus forte qu'elle à 18 h et pendant le début de la nuit.

L'ensemble de cette action des jours courts est complètement empêché si ceux-ci sont accompagnés d'interruption de la nuit par un court éclairage rouge. Il est à remarquer, cependant, que les plantes soumises à cette interruption de la nuit ne restent pas, pour ce qui

est de l'activité des enzymes considérées, dans un état strictement équivalent à celui des plantes en jours longs: une certaine activité de la PEP carboxylase se développe, avec un maximum nettement marqué à 18 h, tandis que l'enzyme malique acquiert une activité plus forte, à peine moins grande que celle atteinte en jours courts, avec un maximum situé vers 18 h. Il semble donc que le régime photopériodique de jours courts avec nuit interrompue soit, du point de vue de ces réactions enzymatiques, différent d'un régime de jours longs, et crée une plus forte capacité de dégradation d'acide malique. Ceci est d'ailleurs confirmé par des mesures de crassulence des feuilles: cette dernière augmente très vite avec le nombre de jours courts, alors qu'en régime de nuit interrompue elle devient significativement plus faible que celle de feuilles de plantes maintenues en jours longs de 16 heures. Il est vraisemblable que la

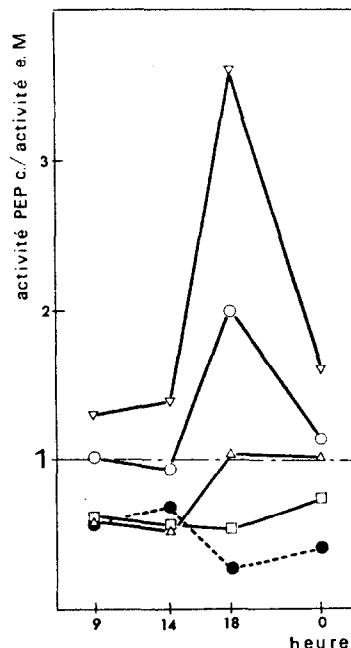


FIG. 2. RAPPORT DE L'ACTIVITÉ DE LA PEP CARBOXYLASE À L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME MALIQUE AU 10e (□), 18e (△), 27e (○), ET 37e (▽) JOURS COURTS,AINSII QU'AU 37e JOUR COURT AVEC NUIT INTERROMPUE (●).

différence de nombre d'heures d'éclairement joue ici un rôle, indépendamment de considérations de photopériodisme au sens strict.

Une interprétation globale de ces résultats, obtenus sur la fraction cellulaire soluble totale, nous amène à proposer, comme hypothèse de travail, l'existence d'un mécanisme d'action du photopériodisme sur cette chaîne de réactions enzymatiques qui pourrait s'appuyer schématiquement, en première analyse, sur les étapes suivantes:

1. Le régime de jours courts agirait, par le truchement du système percevant le photopériodisme (système du phytochrome) sur le niveau d'activité de la "population" de PEP carboxylase: avec le nombre de jours courts reçus par la plante, la concentration en enzyme active augmente de plus en plus vite (l'activité dosée à 18 h, au début de la nuit, est une fonction exponentielle du nombre de jours courts—ce qui est à rapprocher du fait que la teneur en acide malique, dosée en fin de nuit, augmente elle aussi exponentiellement en fonction du

nombre de cycles.⁷⁾ La question posée au départ semble donc pouvoir être tranchée, du moins pour ce qui est de la PEP carboxylase: le potentiel enzymatique disponible est différent dans les feuilles en jours courts de celui des feuilles en jours courts avec nuit interrompue (ou en jours longs). Par contre, les résultats ne permettent pas de décider s'il s'agit, en jours courts, d'une augmentation de synthèse d'enzyme, *de novo*, ou d'une activation de molécules déjà présentes. On peut seulement noter que l'augmentation d'activité, étant graduelle, sur un espace de temps très long, et non abrupte, paraît suggérer une évolution adaptative du taux de synthèse. Quoi qu'il en soit, les considérations que l'on peut faire sur le processus en jeu sont actuellement strictement spéculatives. Il convient seulement de rappeler l'existence chez *Pharbitis nil*¹⁷ d'ARNm de constitution différente suivant la photopériode à laquelle les plantes sont soumises;

2. L'augmentation de l'activité de la séquence de réactions aboutissant à la formation d'acide malique entraînant une augmentation de teneur en ce dernier, l'éventualité d'une régulation par "feedback" au niveau de la PEP carboxylase pourrait être considérée. Cette hypothèse s'appuie sur des arguments de deux ordres: expérimentalement, la possibilité d'inhibition de la PEP carboxylase par l'acide malique a été confirmée, comme il a déjà été dit; théoriquement, ce type de régulation entraîne l'apparition d'oscillations dans l'activité de l'enzyme et, par voie de conséquence, dans les teneurs du produit terminal,²³⁻²⁵ qui est ici l'acide malique.

Un problème peut alors être ici soulevé: les oscillations circadiennes observées résultent-elles de synchronisations dues au couplage de réactions catalytiques ou sont-elles la manifestation d'un rythme endogène? Il n'est pas impossible qu'une telle alternative soit en fait surtout de caractère méthodologique, tout au moins au niveau du fonctionnement de séquences de réactions enzymatiques. Il est très remarquable que des études sur les réactions enzymatiques périodiques²⁶ ou sur le mécanisme des oscillations autoentretenues dans les systèmes de réactions catalytiques,²⁶⁻²⁸ aboutissent à des tracés très proches de ceux enregistrés à partir de travaux sur les horloges internes. D'ailleurs, une telle distinction tend à disparaître des études, comme celle de Goodwin,²⁵ qui recherchent un mécanisme fondamental pour les phénomènes oscillatoires au niveau moléculaire.

Dans le travail présent, qui n'a jamais été envisagé comme une étude d'horloge interne, la "compensation" de l'action de la température vis à vis du rythme n'a pas été étudiée systématiquement.²² Il faut cependant remarquer que Wilkins²⁹ a établi l'existence d'un rythme endogène d'émission de CO₂ chez *Bryophyllum* et que, dans le matériel utilisé ici, des expériences préliminaires (résultats non publiés), ont montré que si des plantes soumises à un régime de jours courts sont transférées en lumière continue, un rythme d'émission de CO₂ persiste quelque temps (72 à 96 h), correspondant au pic normalement observé en début de journée.

Un dernier point qui mérite discussion dans le tracé des courbes d'évolution d'activité de la PEP carboxylase (Fig. 1) est la forme que tend à prendre le pic d'activité, vers 18 h. Au fur et à mesure qu'augmente le nombre de jours courts reçus, l'amplitude d'oscillation augmente et l'activité change de manière très abrupte d'une valeur très basse à sa valeur la plus forte; de

²³ C. S. PITTENDRIGH, V. G. BRUCE et P. KAUS, *Proc. Natl Acad. Sci.* **44**, 965 (1958).

²⁴ R. A. SPANGLER et F. M. SNELL, *Nature* **191**, (1961).

²⁵ B. C. GOODWIN, *Temporal Organisation in Cells*, Academic Press, Londres et New York (1963).

²⁶ J. A. CHRISTIANSEN, *Advan. Enzymol.* **23**, 83 (1961).

²⁷ J. HIGGINS, *Proc. Natl Acad. Sci.* **51**, 989 (1964).

²⁸ C. WALTER, R. PARKER et M. YČAS, *J. Theoret. Biol.* **15**, 208 (1967).

²⁹ M. B. WILKINS, *J. Exp. Botany* **10**, 377 (1959).

même, après le pic, la baisse d'activité est très rapide. Garfinkel³⁰ a montré qu'un tel comportement peut exister dans un système métabolique complexe dépendant d'un nombre élevé d'activateurs et d'inhibiteurs. Walter, Parker et Ycas²⁷ ont développé l'étude d'un modèle basé sur des fonctions périodiques, permettant d'introduire une logique binaire dans les séquences de réactions enzymatiques et susceptible de rendre compte de telles variations brusques. Mais dans un tel modèle, la valeur moyenne de l'oscillation reste constante, ce qui n'est pas le cas pour l'évolution d'activité de la PEP carboxylase, qui va en augmentant. Et finalement ce comportement (y compris la dissymétrie du pic, qui s'établit plus rapidement qu'il ne disparaît) est davantage approché par une fonction de type Van der Pol, modifiée³¹ (utilisée dans les études de rythmes endogènes), si l'on considère que l'action cumulative (envisagée dans le 1°) du système du phytochrome, dont l'état présente lui-même des variations circadiennes, puisse jouer le rôle de "Zeitgeber";

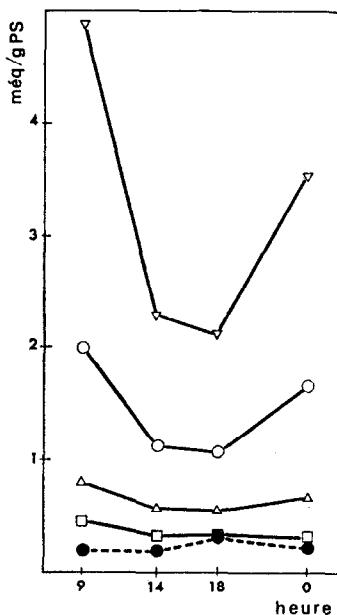


FIG. 3. VARIATION DE LA TENEUR EN ACIDE MALIQUE AU 10e (□), 18e (△), 27e (○), ET 37e (▽) JOURS COURTS, AINSI QU'AU 37e JOUR COURT AVEC NUIT INTERROMPUE (●).

3. Les oscillations de la teneur en acide malique (maximum en fin de nuit, minimum en fin de jour) (Fig. 3), induiraient à leur tour des oscillations dans l'activité de l'enzyme malique, dont il est le substrat (le taux de disparition d'acide malique à la lumière est strictement proportionnel à la teneur atteinte en fin de nuit⁷). Le déphasage entre les variations journalières d'activité de la PEP carboxylase et de l'enzyme malique tendrait à confirmer qu'une même cause ne les provoque pas toutes deux directement.

Sous le déterminisme fondamental schématisé dans ces trois étapes, l'activité effective des enzymes directement responsables de la synthèse et de la dégradation d'acide malique se déroulerait dans les conditions localement créées par la plus ou moins grande quantité

³⁰ D. GARFINKEL, *J. Biol. Chem.* **241**, 286 (1966).

³¹ R. WEVER, *Circadian Clocks* (éd. J. ASCHOFF), p. 47, North-Holland, Amsterdam (1965).

d'acide malique présent selon les heures,²⁸ par la valeur du pH cellulaire qui en résulterait, favorisant tantôt l'une tantôt l'autre des enzymes,²⁸ et éventuellement par le degré de diffusion du CO₂ et de compartimentation du métabolisme.

La poursuite de ce travail visant à confirmer ou à infirmer l'hypothèse de mécanisme présenté ci-dessus doit porter essentiellement, d'une part sur la recherche du niveau du processus de synthèse de la PEP carboxylase qui est éventuellement modifié par les jours courts, ainsi que sur la régulation de cette enzyme, d'autre part sur la réalisation de modèles *in vitro* concernant la première étape proposée.

En tout état de cause, les résultats acquis soulignent que la possibilité d'une action du photopériodisme, et même d'une action de type cumulatif, peut constituer un facteur non négligeable dans le fonctionnement et la régulation de chaînes de réactions du métabolisme intermédiaire chez les plantes.

MATERIEL ET METHODES

Les plantes utilisées proviennent d'un clone. Les boutures sont cultivées en jours longs de 16 h pendant environ 6 semaines et placées ensuite soit en jours courts de 9 h, soit en jours courts accompagnés d'interruption de la nuit par un éclairage rouge non trophique donné de 01 h 15 à 01 h 45 par un tube fluorescent Philips TL 40 W 15. Dans la journée, l'éclairage est assuré dans toutes les conditions, par les plafonds lumineux standardisés du phytotron de Gif, qui permettent au niveau des plantes une énergie d'environ 115 000 ergs/cm²/sec. Les températures sont de 27° de 9 h à 18 h et de 17° de 18 h à 9 h quelle que soit la longueur du jour donnée, pour éviter, lors du passage de jours longs en jours courts, la complication supplémentaire qu'introduirait un changement simultané de thermopériode.

Les mesures portent sur les jeunes feuilles de rang 2 à compter du l'apex, prélevées alors que le rang 1 est constitué par la paire de petites feuilles encore plus ou moins appliquées verticalement l'une contre l'autre. Lors de la vérification de la répétabilité des expériences, il convient de s'assurer que la différence des valeurs du rapport (PF-PS)/PS ne dépasse pas $\pm 5\%$ pour des mesures comparatives correspondant à un nombre donné de jours courts. Une feuille de chaque paire sert au dosage des acides organiques, par chromatographie sur colonne,⁶ tandis que la seconde feuille de la paire subit l'extraction en vue des dosages d'activité enzymatique. Le tampon d'extraction contient par ml, 10 μ moles de glutathion, 5 μ moles de MgCl₂, 1 mg de polyéthylène glycol et du tampon tris-HCl en concentration, calculée d'après un échantillon des feuilles, nécessaire pour obtenir un pH de 7,4 dans le broyat. Celui-ci est obtenu en moins de 10 secondes, dans un broyeur de type Ten Broek. Tampon et broyeur sont préalablement refroidis. Les broyat est alors soumis à des centrifugations successives à 120 000 g jusqu'à activité négligeable du surnageant en malique déshydrogénase (qui témoigne de l'épuisement de l'échantillon, cette enzyme montrant, dans ces extraits, une activité au moins plusieurs dizaines de fois plus forte que celle des autres enzymes en étude). Toutes les manipulations d'extraction sont effectuées à 2°.

Les réactions, étudiées sur *le surnageant total*, sont suivies dans un spectrophotomètre Beckman DK 2 équipé de stabilisateur de température et dispositif d'enregistrement pour l'étude des cinétiques des réactions: les variations linéaires de densité optique, à 340 nm, correspondant à l'oxydation du NADH₂ ou à la réduction du NADP, sont suivies pendant au moins 15 minutes. La proportionnalité entre la pente de la variation et la concentration en enzyme est toujours vérifiée. La composition des milieux réactionnels permet l'activité enzymatique maximum dans les conditions de température et de pH utilisées (24° et pH 7,4).

Les résultats sont corrigés d'après les activités des oxydases des pyridine-nucléotides mesurées en absence de substrats et sont exprimées en "unités d'enzyme" par mg de matière sèche (l'unité d'enzyme étant définie comme l'activité enzymatique provoquant une variation de densité optique de 0,01 par minute).

Le milieu réactionnel pour le dosage de la malique déshydrogénase (EC 1.1.1.37) contient, pour 3,0 ml de volume final, en μ moles, 5 de $MgCl_2$, 5 d'oxaloacétate, 0,27 de $NADH_2$, et solution d'enzyme correspondant à 0,01–0,03 mg de matière sèche de feuilles. La PEP carboxylase (EC 4.1.1.31) est dosée par couplage avec la réduction d'oxaloacétate qu'elle produit, réduction effectuée par la malique déshydrogénase; le milieu contient, pour 3,0 ml, en μ moles, 5 de $MgCl_2$, 5 de NaF, 2 de PEP, 0,27 de $NADH_2$, 0,5% (v/v) de CO_2 (dosé manométriquement et comprenant le CO_2 dissous dans les réactifs et le CO_2 éventuellement apporté sous forme de bicarbonate), et solution d'enzyme correspondant à 1–2 mg de matière sèche de feuilles. L'étude d'une possible action de l'acétyl-CoA a utilisé le même milieu additionné, en μ moles, soit de 0,3 d'acétyl-CoA, soit de 0,35 de CoASH, 3 d'ATP et 5 d'acétate. L'enzyme malique (EC 1.1.1.40) est dosé en présence de 5 μ moles de $MgCl_2$, 3 μ moles d'acide malique, 0,36 μ moles de NADP et solution d'enzyme correspondant à 1–2 mg de matière sèche de feuilles.