

ATPase MEMBRANAIRE DE VACUOLES LYSOSOMALES: LES LUTOIDES DU LATEX d'*HEVEA BRASILIENSIS*

JEAN D'AUZAC

Laboratoire de Physiologie Végétale, Université des Sciences et Techniques du Languedoc,
34060 Montpellier-Cedex, France

(Received 29 April 1977)

Key Word Index—*Hevea brasiliensis*; Euphorbiaceae; ATPase; membrane; vacuole; tonoplast; lysosome; acid phosphatase.

Abstract—Membranes of the lutoids present in the latex of *Hevea brasiliensis* possess an ATPase which is separable from adsorbed residual acid phosphatase. The pH optimum of the ATPase is 7.75 in Tris-HCl and is displaced to 6.5 in K-phosphate buffer. A divalent cation is obligatory ($Mg = Mn > Ca$). ATP-Mg is the natural substrate of the enzyme. Monovalent cations have practically no action on the enzyme. It is, however, activated by anions, both inorganic (Cl^- , HCO_3^-) and organic (malate, aspartate, tartrate). The enzyme has a higher specificity for ATP than for GTP, CTP or UTP and is non-competitively inhibited by ADP. The enzyme is temperature sensitive and a break in the Arrhenius plot occurs at about 20°, characteristic of membrane-bound enzymes. SH-group poisons inhibit enzyme activity as do classical uncouplers at high concentrations (about 10^{-3} M). A hypothesis is formulated whereby the membrane-bound lutoid ATPase functions as a proton pump in order to maintain the acid pH of a vacuolar and lysosomal compartment.

INTRODUCTION

Les lutoïdes qui représentent 10 à 15% du latex d'*Hevea brasiliensis* constituent un vacuome lysosomal poly-dispersé [1, 2]. Ces organelles accumulent *in vitro* contre un gradient de concentration des acides organiques [3-6], des aminoacides basiques étant exaltée par l'ATP [3, 6, 7, minéraux [8]. L'accumulation des acides organiques et des aminoacides basiques étant exaltée par l'ATP [3, 6, 7, 9] on a recherché et mis en évidence une ATPase liée à la membrane lutoïdique malgré la présence d'une activité phosphatase acide [10].

Bien que la phosphatase acide des lutoïdes soit localisée dans le sérum intra-lutoïdique [1] une part de cette activité se retrouve toujours liée à la fraction membranaire [10]. Afin de caractériser l'ATPase il a été nécessaire d'inhiber la phosphatase soit par le molybdate soit par le phosphate car à pH 7,5 l'activité phosphatasique représente encore 30% de l'activité au pH optimum (5,5) [10]. Rappelons que cette membrane de type tonoplastique contient une NADH-cytochrome *c*-réductase [11], est caractérisée par une teneur élevée en acide phosphatidique ($\approx 80\%$) et une abondance relative en acide gras saturés [12].

Les travaux concernant les ATPases membranaires tonoplasmiques ou lysosomales sont peu nombreux [13, 14] aussi avons nous tenté d'apporter ici quelques précisions sur les propriétés de ce type d'ATPase.

RESULTATS

Elimination de la phosphatase acide résiduelle

Afin d'étudier les propriétés de l'ATPase nous avons cherché à éliminer au maximum la phosphatase acide liée à la membrane. Ayant utilisé des tampons à faible molarité, l'EDTA, KCl ou $MgCl_2$; un milieu Glycine-

Tableau 1. Action de différents milieux de lavage sur le rapport ATPase/phosphatase des membranes lutoïdiques

Milieu de lavage	ATPase	Phosphatase	ATPase
	(UI)	(UI)	Phosphatase
TEA 20 mM, pH 7.5	0.092	0.040	2.3
TEA 20 mM, pH 7.5	0.117	0.030	3.9
EDTA 10 mM	0.101	0.078	1.3
TEA 20 mM, pH 7.5	0.106	0.081	1.3
$MgCl_2$ 50 mM	0.119	0.017	6.7
TEA 20 mM, pH 7.5	0.105	0.011	9.2
KCl 400 mM			
Glycine-NaOH 20 mM			
pH 9.5			
Glycine-NaOH 20 mM			
pH 9.5 EDTA 10 mM			

Les lutoïdes lyophilisés sont suspendus dans le milieu indiqué (100 ml/g), homogénéisés puis centrifugés (40000 g \times 10 min). Ce traitement est répété trois fois. Tous les milieux contiennent du mercaptoéthanol (MSH): 5 mM. Le dernier milieu est le GEM utilisé dans la plupart des expériences suivantes. (TEA : triethanolamine-HCl).

ATPase/Phosphatase augmente (Fig. 1). NaOH-EDTA-Mercaptoéthanol (GEM) s'est avéré conduire au meilleur rapport ATPase/Phosphatase (Tableau 1). L'EDTA employé seul (10 à 50 mM) est insuffisant pour désorber la phosphatase et il conduit à une activation d'au plus 50% de l'activité ATPase dès 5 mM. 8 lavages successifs en milieu GEM amènent une diminution progressive des membranes et des activités enzymatiques sédimenables tandis que le rapport ATPase/Phosphatase augmente (Fig. 1).

Les traitements aux ultrasons sont inefficaces et il a été nécessaire d'avoir recours au désoxycholate de Na

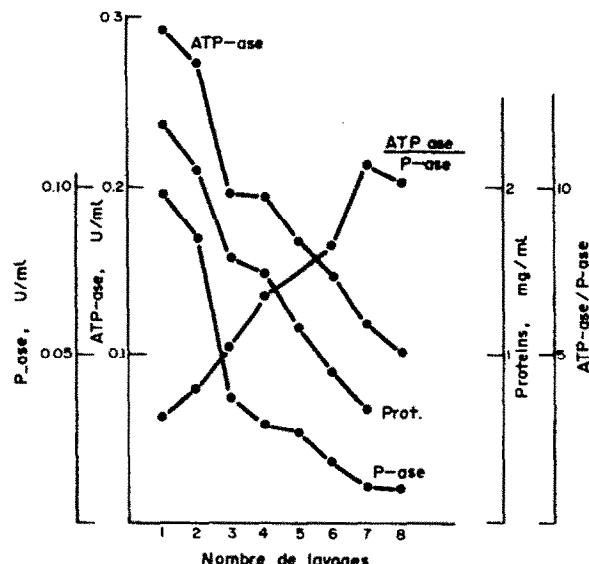


Fig. 1. Récupération des activités ATP-ase et phosphatase en fonction du nombre de lavages de la fraction membranaire. Les membranes sont lavées en milieu GEM (voir méthodes) ATP-ase et phosphatases sont dosées à pH 8.

Tableau 2(a). Elimination de la phosphatase acide par traitement des membranes au désoxycholate (DOC). (a) Influence du milieu durant le traitement au DOC

Milieu de traitement	Activité enzymatique %
Témoin	100
1% DOC	25
1% DOC + MgCl ² 5 mM	59
1% DOC + MgCl ² 10 mM	68
1% DOC + EDTA 10 mM	26

Après trois lavages successifs en milieu GEM le sédiment membranaire est resuspendu (10 ml/g) dans TEA pH 7.5: 10 mM, MSH: 5 mM. Il est alors incubé 30 min à 20° en présence de DOC (1% du lyophilisat initial) puis dilué avec le milieu de dosage de l'ATPase et l'activité enzymatique est exprimée en % du témoin.

Tableau 2(b). Effet du rapport DOC/lutoïdes sur les activités enzymatiques

DOC %	ATPase		
	ATPase (UI)	Phosphatase (UI)	Phosphatase
0	0.345	0.032	10.8
0.5	0.210	0.022	9.5
1.0	0.200	0.006	38.6
2.0	0.200	0.003	84.7

Après un lavage tel que décrit en 2(a), les membranes sont incubées en présence de MgCl₂ (10 mM) et de trois concentrations de DOC. 1.5 ml de l'incubat déposé sur 11 ml du milieu suivant: TEA pH 7.5: 10 mM, Saccharose 5%, MgCl₂ 10 mM, MSH 5 mM. Après une centrifugation (20000 g moy. × 30 min) le sédiment purifié est homogénéisé (10 ml/g) dans un milieu: TEA pH 7.5 10 mM, EDTA 10 mM, MSH: 5 mM et une aliquote sert aux dosages.

Tableau 2(c). Méthode simplifiée de purification

Protéine mg/ml	ATP-ase		Phosphatase		ATPase Phosphatase
	U/ml	UI	U/ml	UI	
0.77	0.182	0.236	0.003	0.004	61

Après un seul lavage (2(a)) les membranes sont homogénéisées en présence de DOC (2% du lyophilisat) et MgCl₂ 10 mM, incubés 30 min à 20° et finalement centrifugé de la même façon qu'en 2(b).

(DOC). Le Tableau 2a, montre que MgCl₂ préserve partiellement l'ATPase de l'action dénaturante du DOC. La quantité optimale de DOC par rapport au lyophilisat lutoïdique a été déterminé et le Tableau 2b montre qu'il est possible d'éliminer quasi-totalement l'activité phosphatase acide résiduelle. Une méthode simplifiée peut-être utilisée (Tableau 2c). On peut en conclure que l'ATPase ainsi séparée est constitutive des membranes lutoïdiques alors que la phosphatase présente provient d'une adsorption partielle.

Propriétés de l'ATPase membranaire

Le pH optimum a été déterminé dans un tampon Tris-maléate. La courbe relativement plate montre un optimum à pH 7.75. Différents systèmes de tampon tels Triethanolamine-HCl (TEA-HCl), Tris-HCl, Hepes-NaOH conduisent pratiquement au même optimum. Par contre un tampon phosphate de K déplace l'optimum à pH 6.6. L'utilisation de plusieurs systèmes tampons différents fait apparaître des différences appréciables d'activité de l'ATPase.

Le K_m pour l'ATP a été déterminé avec divers tampons et à deux pH (6.5-7.75). Dans tous les cas où le rapport ATP/Mg²⁺ est de 0.5 le K_m obtenu est de 0.4 à 0.8 mM. En présence d'EDTA l'ATPase est totalement inactive: un cation divalent est indispensable. La Fig. 2 montre l'inégal efficacité de Mn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺. Si l'on considère la concentration normale de ses ions dans le serum cytoplasmique du latex [2] il est clair que Mg²⁺ est l'activateur physiologique. Classiquement l'optimum d'activité est obtenu pour ATP/X²⁺ voisin de 1.

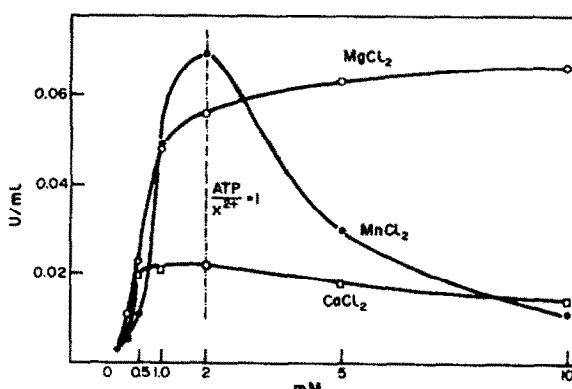


Fig. 2. Activation de l'ATPase par trois cations divalents. Les incubations sont réalisées en Tris-HCl pH 7.75: 50 mM, ATP: 2 mM, molybdate d'ammonium 0.1 mM.

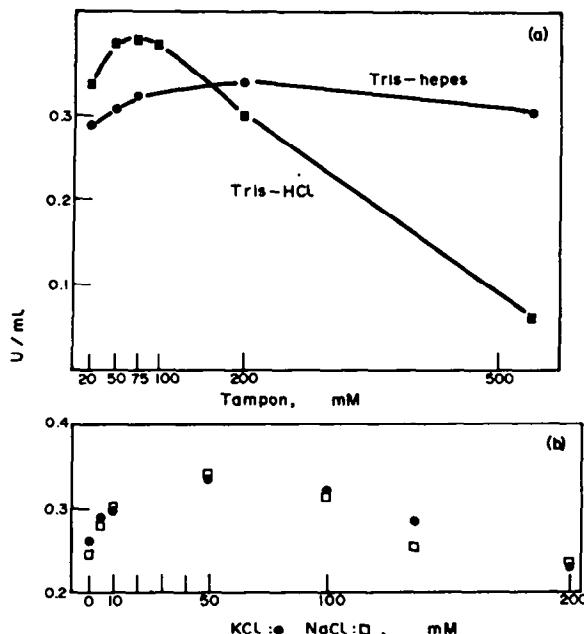


Fig. 3(a). Influence de la nature et de la concentration du tampon sur l'activité ATPasique. Tampon pH 7.75, ATP: 2 mM, $MgCl_2$: 4 mM, molybd.d'NH₄: 0.1 mM.

Fig. 3(b). Influence de la concentration en chlorure sur l'activité ATPasique. Tampon Tris-Hepes pH 7.75: 25 mM + KCl ou NaCl milieu identique à Figure 3(a).

La nécessité de la présence de cations monovalents (K^+ et Na^+) est habituelle chez de nombreuses ATPases animales, elle est plus discutée dans le règne végétal. L'activité de certaines ATPases végétales dépend d'un rapport K^+/Na^+ optimum, d'autres sont sensibles à la force ionique du milieu, certaines sont sensibles aux cations minéraux et organiques, quelques-unes enfin sont activées par les anions [13-22]. Dans notre cas, on a tout d'abord recherché l'influence de la molarité du tampon sur l'activité ATPase. C'est ainsi que l'on a comparé le tampon Tris-HCl à des tampons Tris-Hepes et Tris-MOPS. Ces deux derniers systèmes conduisent au même résultat et seuls les deux premiers tampons sont considérés dans la Fig. 3a. Seul le Tris-HCl a une action sensible sur l'activité ATPase. Dans un tampon Tris-Hepes (25 mM) on a ajouté de 5 à 200 mM de NaCl ou KCl (Fig. 3b). La comparaison de ces deux courbes laisse à penser que c'est l'anion Cl^- qui est efficace pour modifier l'activité ATP-asique. Tandis que Na^+ et K^+ sont également inactifs. L'absence de synergisme entre Na^+ et K^+ a été vérifiée (résultats non rapportés).

Le Tableau 3 montre une activation systématique de l'ATPase par les divers sels minéraux ou organiques utilisés à l'exception du nitrate et de l'iodure de potassium. L'effet particulier de ces deux anions a déjà été observé dans d'autres milieux [14, 22].

Deux lots de lutoïdes ont été utilisés et les membranes ont été purifiées ou non en présence de DOC, on voit que les membranes traitées au DOC sont moins sensibles à l'activation. La Fig. 4 illustre l'action activatrice de $KHCO_3$ en fonction de la concentration et l'importance du mode de traitement de la membrane sur cette activation. Des courbes similaires ont été obtenues avec des sels organiques différents.

Tableau 3. Action de différents anions sur l'activité ATP-ase

	Lot A		Lot B	
	-DOC	+DOC	-DOC	+DOC
KCl	142	117	137	122
Na malate	166	121	149	122
Na succinate	142	106	123	111
Na-K tartrate	136	117	125	111
Na aspartate	158	123	141	127
Na citrate	112	136	105	79
Na fumarate	139	103	117	122
K phosphate	123	103	114	114
NaCl	122	117	139	122
KBr	100	81	102	111
KI	23	28	32	32
KNO ₃	15	13	10	21
KHCO ₃	158	149	151	126
NH ₄ Cl	151	106	149	133
Lysine	165	104		111
Valeur absolue du témoin (U/ml)	0.217	0.183	0.241	0.106

Tous les composés ont été utilisés à la concentration de 50 mM et leur pH ajusté à 7.75 avec NaOH ou Hepes. Chaque incubation (2 ml) a été ajusté à pH 7.75 \pm 0.02 par des quantités de Tris ou d'Hepes inférieur à 0.01 ml. Constitution du milieu d'incubation: Tris-Hepes pH 7.75: 25 mM, ATP: 2 mM, $MgCl_2$: 4 mM, molybdate d'NH₄: 0.1 mM. Deux lots différents de lutoïdes ont été employés (A et B). La moitié de chacun a été purifiée en présence de DOC (1%), l'autre moitié n'a pas été traitée au DOC.

La spécificité de l'enzyme vis à vis de l'ATP, GTP, CTP et UTP est dans le rapport 100, 59, 20, 11. L'infléchissement des courbes d'activité ATPasique en fonction du temps d'incubation suggère une inhibition par un produit de la réaction. Pi possède un effet inhibiteur puissant sur la phosphatase acide lutoidique [10, 23] alors qu'il n'inhibe pas l'ATPase [10]. Par contre l'ADP est un inhibiteur de type non compétitif; le Ki ADP est de 0.4 mM.

L'activité de l'enzyme en fonction de la température a été étudiée entre 10 et 45°. L'optimum se situe vers 40-45°.

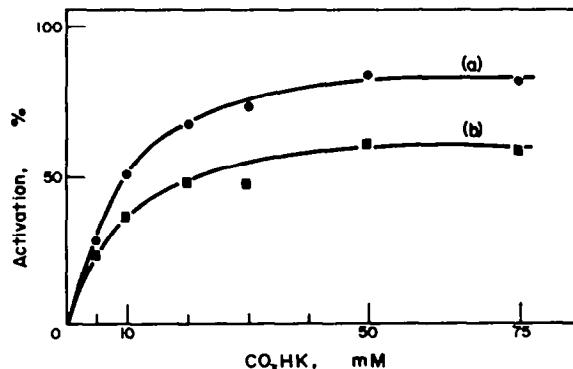


Fig. 4. Activation par $KHCO_3$ de l'ATPase. Les membranes ont été purifiées en milieu GEM (A) ou en présence de TEA-HCl pH 7.75: 20 mM, MSH 5 mM (B). Les incubations ont été faites en présence de Tris-Hepes pH 7.75: 50 mM, ATP, Mg. Mo: concentrations habituelles.

Tableau 4. Action d'inhibiteurs variés sur l'ATPase

Inhibiteurs	Concentration M	Activité : variation en % du témoin
Reactifs des —SH		
N-éthylmaléimide	1.10 ⁻⁵	-27
	5.10 ⁻⁵	-46
p-chloromercuribenzoate	1.10 ⁻⁵	-64
	5.10 ⁻⁵	-74
Mersalyl	1.10 ⁻⁵	-66
	5.10 ⁻⁵	-74
Découpleurs		
Carbonylcyanide	5.10 ⁻⁴	-25
p-Trifluoromethoxyphénylhydrazone (FCCP)	1.10 ⁻³	-46
Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)	5.10 ⁻⁴	+ 4
Dicyclohexyl-carbodiimine (DCCD)	1.10 ⁻³	-28
(DCCD)	5.10 ⁻³	-35
2,4 Dinitrophénol	1.10 ⁻³	-46
	5.10 ⁻³	-14
	1.10 ⁻²	-21

Milieu d'incubation: Tris-Hepes pH 7.75; 50 mM, ATP: 2 mM, MgCl₂: 4 mM, molybdate d'NH₄: 0.1 mM. Le CCCP, FCCP et DCCD ont été dissous dans un volume d'éthanol équivalent à celui ajouté au témoin. Les résultats (moyenne de 3 expériences) sont exprimés en inhibition par rapport au témoin.

Le Q_{10} (15–25°) est 2.7 (moyenne de 4 expériences) et le Q_{10} (30–40°) est de 1.8 (moyenne de 6 expériences). La représentation selon Arrhenius fait apparaître une rupture dans la courbe correspondant à la température critique qui se situe entre 20 et 24° (moyenne de 4 expériences). L'énergie d'activation de l'enzyme est de l'ordre de 21.000 J mol⁻¹ au-delà du point de transition et de 42.000 J mol⁻¹ en deçà.

L'étude de l'action de divers inhibiteurs montre que l'ATPase est sensible aux réactifs des groupes —SH. Le p-chloromercuribenzoate et le mersalyl inhibent à 50% l'activité pour des concentrations un peu inférieures à 10⁻⁵ M. La N-Ethylmaléimide est nettement moins efficace (Tableau 4). Les découpeurs ne sont que peu efficaces pour inhiber l'ATPase lutoïdique; le FCCP et le DCCD inhibent à 50% vers 10⁻³ M tandis que le 2,4 dinitrophénol et le CCCP sont encore moins efficaces (Tableau 4).

DISCUSSION

Il a été possible dans ce travail de séparer une activité ATPase d'une activité phosphatase acide, laquelle vient très souvent perturber les interprétations particulièrement lorsque l'on travaille sur des microsomes d'origine vacuolaire [22].

Les travaux sur les ATPases vacuolaires sont très peu nombreux. Il faut citer ceux réalisés sur des vacuoles isolées de protoplastes de feuilles et de pétales [13] et ceux effectués sur une fraction microsomale de navet pouvant être d'origine tonoplastique [22]. Si l'on compare avec nos résultats, on voit que dans les trois cas l'ATPase est préférentiellement Mg-dépendante. L'ATPase des microsomes de navet [22] est activée par les anions et non par les cations. L'ATPase tonoplasmique des vacuoles de pétales n'est stimulée que par les cations, tandis que

celle des feuilles est stimulée par les anions et les cations [13]. L'ATPase lutoïdique est activée davantage par les anions que les cations rejoignant ainsi l'ATPase microsomale du navet [22] et une ATPase microsomale des racines d'orgues [21].

On serait ainsi amené à rejoindre des hypothèses posées ou implicites [14, 22] selon lesquelles les ATPases plasmiques et tonoplasmiques différaient par leur sensibilité aux ions: les ATPases plasmiques, favorisant l'absorption des cations monovalents, seraient sensibles à ces mêmes cations; les ATPases tonoplasmiques seraient plus particulièrement activées par les anions. Ces dernières enzymes disposées sur la face externe du tonoplasme participeraient à l'accumulation intravacuolaire des anions. En fait ni le malate ni l'aspartate ne s'accumulent dans les lutoïdes contre un gradient de concentration à la différence du citrate [3, 4, 6] et de la lysine [6, 7], cependant tous sont activateurs de l'ATPase.

Il convient de rappeler que pour des ATPases racinaires de céréales, l'activation par des sels minéraux ou organiques a été reliée à l'élévation de la force ionique du milieu [19] et que des sels de cations organiques (Tris et choline) sont parfois activateurs d'ATPases plasmiques [24, 25].

D'une façon générale il semble bien admis que l'activité d'enzymes liées à un polyélectrolyte dépend de la force ionique du milieu et qu'un changement dans cette force ionique peut induire par exemple un déplacement du pH optimum [26, 27]. C'est à un tel phénomène que l'on peut raisonnablement attribuer le déplacement, dans la zone acide, du pH optimum en tampon phosphate de K.

On peut par ailleurs attacher une importance particulière à l'activation de l'ATPase lutoïdique par HCO₃⁻. En effet, dans le règne animal et notamment pour la muqueuse gastrique [28–30], les lysosomes du foie de rat [31], l'utérus de rat [32] et le rein de souris [33], l'hypothèse est faite qu'une ATPase-Mg dépendante et activée par HCO₃⁻ intervient dans l'acidification d'un compartiment. Dans notre milieu les différentes décarboxylations d'origine respiratoire ou liées à la synthèse du polyisoprène sont que le latex est riche en CO₂ [34]; par ailleurs le serum intralutoïdique est acide [35]; l'ATPase lutoïdique pourrait alors intervenir, comme pompe à protons, dans le maintien de l'acidité de ce compartiment vacuo-lysosomal. En faveur de cette dernière hypothèse rappelons qu'il a été montré que si des lutoïdes sont incubés en présence d'ATP on assiste à une acidification du serum intralutoïdique [9].

Si l'on admet que, lorsque l'hydrolyse de l'ATP est liée à un gradient de protons, les découpeurs augmentent l'activité ATPasique [36] on pourra s'étonner de la faible action montrée ici par cette classe de composés. Rappelons seulement qu'il faut atteindre des concentrations relativement élevées de 2,4 DNP et de NH₄Cl pour réduire l'absorption du citrate et de la lysine [3, 6, 7, 9] et que par ailleurs l'originalité de la membrane lutoïdique (80% d'acide phosphatidique) [12] peut expliquer la différence d'activité des découpeurs classique par des problèmes de perméabilité.

En conclusion on est amené à formuler deux hypothèses différentes sur le rôle physiologique de l'ATPase mise en évidence sur les membranes des vacuoles lysosomales que sont les lutoïdes: (a) activée par des anions, l'ATPase interviendrait dans l'accumulation intravacuolaire de

ces composés ; (b) l'ATPase membranaire fonctionnerait comme pompe à proton pour maintenir le gradient de protons entre un compartiment vacuo-lysosomal et le cytoplasme. Ce gradient de protons serait le moteur d'au moins certaines des accumulations vacuolaires. La deuxième hypothèse nous semble plus vraisemblable dans l'état actuel des travaux.

PARTIE EXPERIMENTALE

La récolte du latex, la séparation et la purification des lutoïdes et leur lyophilisation en Côte d'Ivoire a été précédemment décrite en détails [10]. Le lyophilisat de lutoïdes reçu au laboratoire est suspendu dans 100 ml de milieu de lavage par g de poids sec et homogénéisé au Potter. La fraction membranaire constitue le sédiment après une centrifugation 40000 g × 10 min. Le milieu de lavage employé le plus souvent (GEM) est ainsi constitué : glycine-NaOH pH 9.5, 20 mM, EDTA : 10 mM, mercaptoéthanol (MSH) : 5 mM. Plusieurs homogénéisations et centrifugations successives sont effectuées avant de reprendre le dernier sédiment dans 10 ml de TEA-HCl 10 mM pH 7.5, 10 mM EDTA, 5 mM MSH par g de lyophilisat.

La mesure de l'ATPase est effectuée par incubation de 30 min à 30° dans un milieu 50 mM Tris-HCl pH 7.5, ATP : 2 mM, MgCl₂ : 4 mM, molybdate d'ammonium 0.1 mM. Ce dernier est destiné à inhiber toute trace d'activité phosphatase acide résiduelle [10, 23]. L'ADP formé est mesuré par voie enzymatique [10] ou bien le Pi libéré est dosé selon la technique de Post et Sen [37]. L'activité phosphatase acide est déterminée en utilisant le *p*-nitrophénolphosphate (10 mM) dans le même tampon et aux mêmes, pH que pour l'ATPase. Les activités ATPase et phosphatase sont exprimées en unités par ml (U/ml) ou en UI. Les protéines membranaires sont dosées selon la méthode de Lowry [38] avec la serum albumine bovine comme étalon. Afin d'éviter une opalescence due aux phospholipides et aux particules de caoutchouc résiduelles l'échantillon est ajouté à 10 volumes de CHCl₃-MeOH (2:1), abandonné de 2 à 4 hr avant d'être centrifugé 10 min à environ 5000 tours/min. Le sédiment est partiellement dissous dans NaOH 2N puis centrifugé ; les particules de caoutchouc flottent à la surface et le serum clair inférieur est utilisé pour le dosage de Lowry.

Remerciements—Nous tenons à remercier les laboratoires de Physiologie végétale de l'Institut des Recherches sur le Caoutchouc et de la Faculté des Sciences d'Abidjan pour l'aimable fourniture de matériel lyophilisé. Ce travail a bénéficié de l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (contrat no 72.209 : Membranes biologiques—structures et fonctions).

REFERENCES

1. Pujarniscle, S. (1968) *Physiol. Vég.* **6**, 27.
2. Ribaillier, D., Jacob, J. L. et d'Auzac, J. (1971) *Physiol. Vég.* **9**, 423.
3. d'Auzac, J. et Lioret, C. (1974) *Physiol. Vég.* **12**, 617.
4. Montardy, M. C. et Lambert, C. (1977) *Phytochemistry* **16**, 677.
5. Coupé, M. et Lambert, C. (1977) *Phytochemistry* **16**, 455.
6. d'Auzac, J., Brzozowska, J., Hanower, P., Lambert, C. et Lioret, C. (1976) *Echanges ioniques transmembranaires chez les végétaux*, colloque international du CNRS, Juillet 1976, sous presse.
7. Hanover, P., Brzozowska, J. et Niamien Ngoran (1977) *Phytochemistry*.
8. Ribaillier, D. (1972) Thèse Doctorat d'Etat A.O. 7716 Abidjan.
9. Lambert, C. (1975) *Compt. Rend. Sér. D* **281**, 1705.
10. d'Auzac, J. (1975) *Phytochemistry* **14**, 671.
11. Moreau, F., Jacob, J. L., Dupont, J. et Lance, C. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **396**, 116.
12. Dupont, J., Moreau, F., Lance, C. et Jacob, J. L. (1976) *Phytochemistry* **15**, 1215.
13. Lin, W., Wanger, G. J., Siegelman, H. W. et Hind, G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **465**, 110.
14. Hodges, T. L. (1976) *Transport in Plants II Part A*, p. 260. Springer-Verlag, Berlin.
15. Hansson, G. et Kylin, A. (1969) *Z. Pflanzenphysiol.* **60**, 220.
16. Kylin, A. et Gee, R. (1970) *Plant Physiol.* **45**, 169.
17. Lai, Y. F. et Thompson, J. E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **223**, 94.
18. Karlsson, J. et Kylin, A. (1974) *Physiol. Plantarum* **32**, 136.
19. Ratner, A. et Jacoby, B. (1973) *J. Exp. Botany* **24**, 231.
20. Fisher, J. et Hodges, T. K. (1969) *Plant Physiol.* **44**, 385.
21. Balke, N. E., Sze, H., Leonard, R. T. et Hodges, T. K. (1974) *Membrane Transport in Plants* p. 301. Springer-Verlag, Berlin.
22. Rungie, J. M. et Wiskich, J. T. (1973) *Plant Physiol.* **51**, 1064.
23. Jacob, J. L. et Sontag, N. (1974) *Biochimie* **56**, 1315.
24. Leonard, R. T. et Hodges, T. K. (1973) *Plant Physiol.* **52**, 6.
25. Hendrix, D. L. et Kennedy, R. M. (1977) *Plant Physiol.* **59**, 264.
26. Goldman, R., Goedstein, L. et Katchalski, E. (1971) *Biochemical Aspects of Reactions on Solids Supports* pp. 1-78. Academic Press, New York.
27. Laidler, K. J. et Sundaram (1971) *Chemistry of the Cell Surface* p. 255. Academic Press, New York.
28. Mozsik, G., Nagyn, L., Tarnok, F., Vizi, F. et Jutas, J. (1974) *Experientia* **30**, 1024.
29. Soumarmom, A., Lewin, M., Cheret, A. M. et Bonfils, S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **339**, 403.
30. Lee, J., Simpson, G. et Scholes, P. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 825.
31. Iritani, N. et Wells, N. N. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **164**, 357.
32. Iritani, N. et Wells, N. N. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **436**, 863.
33. Mego, J. L., Farlo, R. M. et Barnes, J. (1972) *Biochem. J.* **129**, 763.
34. d'Auzac, J. Thèse Doctorat d'Etat (1965) no 5447, Paris.
35. Southorn, W. A. et Edwin, E. (1968) *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* **21**, 187.
36. Lin, W. et Hanson, J. B. (1974) *Plant Physiol.* **54**, 250.
37. Post, R. L. et Sen, A. K. (1967) *Methods Enzymol.* **10**, 762.
38. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.