

BBA 75 147

## LE SYSTÈME DE TRANSPORT DE $\text{SO}_4^{2-}$ CHEZ *CHLORELLA* PYRENOIDOSA ET SA RÉGULATION

### I. ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA PERMÉATION

M. VALLÉE ET R. JEANJEAN

*Laboratoire de Physiologie Végétale associé au C.N.R.S., C.N.R.S., Route de Mende, Montpellier (France)*

(Reçu le 15 janvier, 1968)

---

#### SUMMARY

*The sulphate transport system of Chlorella pyrenoidosa and its regulation.*

#### *I. Kinetics of permeation*

The kinetics of entry of  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  in *Chlorella pyrenoidosa* harvested during the exponential growth phase has been studied. Sulphate accumulates in the cell against a concentration gradient. The transport is sensitive to dinitrophenol and has high temperature coefficients. The rate of accumulation of  $\text{SO}_4^{2-}$  increases after preincubation of the cells in a medium lacking this ion and decreases when sulphate is present in the external solution. Intracellular sulphate does not exchange with sulphate in the medium. The  $K_m$ 's of the rates of absorption are of the order of  $1.2 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$  and the anions of group VI of the type  $\text{XO}_4^{2-}$  inhibit the entry of sulphate. For one of these ions,  $\text{CrO}_4^{2-}$ , the only one studied more closely, the inhibition has been shown to be competitive. The  $K_i$  is of the order of  $4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ . The decrease and increase of the rates of entry of  $\text{SO}_4^{2-}$  after preincubation in a medium with and without sulphate, respectively, indicate a mechanism of regulation. The variations are too rapid to be attributed to a control at the genetic level. A hypothesis for a feed-back effector formed during sulphate metabolism which appears in the presence of this ion and disappears in its absence is offered to account for these phenomena.

---

#### INTRODUCTION

Les vitesses d'entrée de divers ions dans les cellules végétales peuvent varier selon l'état physiologique de ces dernières. Par exemple, des rondelles de tissus parenchymateux n'absorbent ni  $\text{K}^+$  ni  $\text{Cl}^-$  immédiatement après leur préparation, mais le font à la suite d'un traitement prolongé dans l'eau distillée<sup>1,2</sup>. Les teneurs en soufre des Chlorelles et par conséquent l'entrée nette de l'ion  $\text{SO}_4^{2-}$ , varient considérablement le long du cycle de vie de cet organisme<sup>3,4</sup>. Ces faits suggèrent l'existence dans les cellules de mécanismes régulateurs du transport ionique. Trois hypothèses, qui d'ailleurs ne s'excluent pas mutuellement, peuvent être émises à ce sujet: (1) La régulation a lieu au niveau du métabolisme énergétique. (2) Existence de perméases

subjectes à induction ou à répression suivant certains états physiologiques de la cellule. (3) Existence de mécanismes de rétro-inhibition de l'entrée; les effecteurs seraient en relation avec les voies métaboliques auxquelles participent les ions dont ils règlent l'absorption.

Nous avons pensé que l'étude de l'absorption de  $\text{SO}_4^{2-}$  par des *Chlorelles* nous permettrait de vérifier ces hypothèses. Il nous a paru toutefois indispensable de faire au préalable une étude classique de la cinétique d'entrée de cet ion chez des *Chlorelles* en phase exponentielle. Ce sont essentiellement les résultats de ces recherches qui font l'objet du présent mémoire. Ces recherches nous ont permis en outre de mettre en évidence des phénomènes de régulation qui à première vue ne se situent ni au niveau du métabolisme énergétique, ni à celui de l'expression génétique.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nos expériences ont été faites sur *Chlorella pyrenoidosa* var. Lefèvre.

*Cultures stock.* Les *Chlorelles* sont cultivées stérilement sous éclairage continu (1000 lux environ) à température du laboratoire, dans une solution minérale (milieu C, Tableau I). La culture est diluée une fois par mois.

*Cultures accélérées.* Des flacons de Roux contenant 500 ml de solution minérale stérile (milieu A, Tableau I) sontensemencés à partir de cultures stock. Les récipients sont placés dans un bain-marie à 29°, sous éclairage continu (8000 à 10000 lux), et leur contenu est aéré avec un mélange stérile et humidifié d'air et de  $\text{CO}_2$  (2 % de  $\text{CO}_2$ ). A partir de 48 h les cultures sont diluées quotidiennement (1:10). Le matériel utilisé dans les expériences d'absorption provient de cultures diluées 24 h à l'avance. Ce protocole est repris tous les 7 à 9 jours.

TABLEAU I

COMPOSITION DES DIFFÉRENTS MILIEUX

	A et B*	C
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.1 mM	0.1 g/l
$\text{KNO}_3$		0.1 g/l
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	6.6 mM	
$\text{K}_2\text{HPO}_4$		0.04 g/l
$\text{H}_3\text{PO}_4$	0.33 mM	
$\text{MgSO}_4^*$	0.15 mM	0.03 g/l
KCl	0.3 mM	
$\text{FeCl}_2$	0.01 g/l	0.01 g/l
Sol. de microéléments**	1 ml/l	1 ml/l
pH ajusté avec KOH	6.2	6.5

\* Le milieu B ne contient pas du  $\text{MgSO}_4$ .

\*\* Composition en g/l:  $\text{HBO}_3$ : 2.86;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 1.81;  $\text{ZnCl}_2$ : 0.12;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.064;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 0.049.

*Technique expérimentale.* Les *Chlorelles* sont centrifugées, lavées et le culot est resuspendu à une densité d'environ 0.2–0.8  $\mu\text{l/ml}$  dans des solutions sans sulfate: soit dans milieu B (Tableau I), soit, et c'est la majorité des cas, dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  à  $10^{-4}$  M. Le récipient est placé dans un bain-marie à 29°. La suspension

est éclairée et aérée comme pour les cultures accélérées. Le pH après barbotage du mélange air- $\text{CO}_2$  est ajusté à 5.5. En général il reste constant dans les limites de  $\pm 0.15$  unité pH. Sauf indication contraire, nos expériences débutent après 2 h et demie à 3 h d'incubation dans une solution sans  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Le sulfate radioactif est fourni par le C.E.A., Saclay, sous forme de  $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ . Il est dilué avec  $\text{K}_2\text{SO}_4$  à l'activité spécifique de 10 à 500  $\mu\text{C}$  par  $\mu\text{mole}$  de  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Nous faisons essentiellement deux types d'expériences.

(1) Absorption en fonction du temps. A des temps variables après addition du substrat radioactif, nous prélevons 1 ml de suspension dans un filtre refroidi au préalable, tapissé d'une rondelle millipore (diamètre des pores 0.8  $\mu$ ) recouvert de 5 ml d'eau froide. Après filtration les Chlorelles sont rincées deux fois avec de l'eau à 0°. Les millipores sont collés sur des coupelles et la radioactivité est mesurée avec un compteur Geiger.

(2) Etude des vitesses d'absorption: 2.5 ml de suspension sont ajoutés dans un tube à essai contenant du  $\text{K}_2^{35}\text{SO}_4$ . Le tube est agité dans le bain-marie sans aération. Au bout de 30 sec ou 1 min, 1 ml de suspension est filtré sur millipore comme décrit plus haut.

Sauf indication contraire, la concentration de  $\text{K}_2^{35}\text{SO}_4$  dans le milieu d'absorption est de  $10^{-5}$  M, et l'absorption a lieu à la lumière (8000 à 10000 lux).

*Mesure de la répartition du  $^{35}\text{S}$  absorbé dans différentes fractions cellulaires.* Après un séjour variable dans un milieu contenant  $\text{K}_2^{35}\text{SO}_4$ , 10 ml de Chlorelle sont filtrés sur millipore. Après rinçage les Chlorelles sont suspendues dans 2 ml d'acide trichloracétique à 5 %. 25  $\mu\text{l}$  sont prélevés sur millipore et la radioactivité de ce dernier mesurée au Packard avec 4 ml du liquide de scintillation (5 g de POP et 0.3 g de POPOP par l de toluène). Elle correspond à l'absorption totale. Après 20 min à froid, la suspension est filtrée et la radioactivité du filtrat mesurée de la même manière. Elle correspond au soufre soluble. Une partie du filtrat est additionnée de 2  $\mu\text{moles}$  de sulfate non marqué et le  $^{35}\text{SO}_4$  est précipité avec la benzidine par la méthode de LOISELEUR<sup>5</sup>. Le précipité est filtré sur millipore (diamètre des pores 0.3  $\mu$ ) lavé à l'alcool et sa radioactivité mesurée. Une autre partie du filtrat est traitée avec 4 ml de HCl, 0.1 M, et évaporée à sec à 100°. Le  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  qui correspond aux sulfates libre et hydrolysables est précipité et dosé de la même manière.

Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{moles SO}_4^{2-}/\text{l}$  de cellules. Les volumes sont mesurés après centrifugation dans des tubes à hématocrite gradués. La croissance des Chlorelles dans un milieu sans  $\text{SO}_4^{2-}$  est très lente. Dans des expériences de longue durée les volumes ont été mesurés toutes les 2 à 3 h. Dans nos calculs nous avons supposé une croissance linéaire dans cet intervalle de temps.

## RÉSULTATS

*Evolution des vitesses d'absorption au cours d'une préincubation dans un milieu carencé en  $\text{SO}_4^{2-}$ .* Les vitesses d'entrée de l'ion sulfate après préincubation des Chlorelles dans un milieu dépourvu de cet ion, augmentent considérablement en fonction du temps (Figs. 1 et 2). L'augmentation, rapide pendant les deux premières heures, évolue plus lentement par la suite. Elle dépend entre autres de la composition du milieu et de la lumière. La plupart de nos expériences ont été faites, nous l'avons déjà indiqué, avec du matériel qui est resté 2 h et demie à 3 h dans une solution

de  $\text{CaCl}_2$ ,  $10^{-4}$  M. Nous avons répété plusieurs d'entre elles avec des Chlorelles incubées pendant des temps variables (30 min à 48 h) dans des solutions sans soufre ( $\text{CaCl}_2$  ou milieu B, Tableau I) et cela pour voir si le comportement des Chlorelles vis-à-vis de l'absorption manifestait des différences fondamentales. Nous y reviendrons, mais nous pouvons déjà dire que les différences observées étaient essentiellement d'ordre quantitatif.

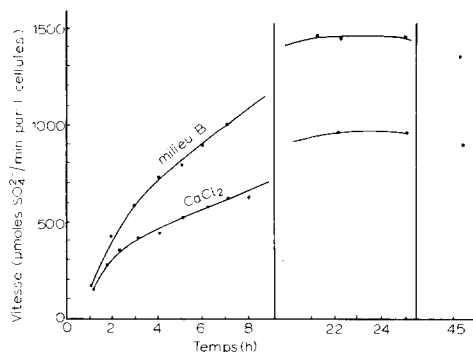


Fig. 1. Vitesses d'entrée en fonction de la durée de préincubation dans un milieu sans sulfate.

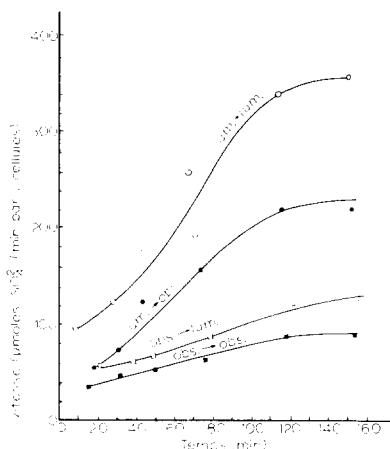


Fig. 2. Influence de la lumière sur l'évolution des vitesses d'absorption dans un milieu sans  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $\text{CaCl}_2$   $10^{-4}$  M) et sur l'absorption elle-même.  $\circ$   $\square$ , Absorption à la lumière;  $\bullet$   $\blacksquare$ , absorption à l'obscurité.

**Absorption en fonction du temps.** La Fig. 3 (courbe supérieure) représente les résultats d'une expérience d'absorption en fonction du temps. La pente de la courbe diminue progressivement pour rester à peu près constante au bout de quelques min. Des courbes analogues ont été obtenues avec du matériel prétraité pendant des temps variables (allant jusqu'à 28 h) soit dans une solution de  $\text{CaCl}_2$ , soit dans le milieu B. La fraction de soufre absorbé, précipitable par l'acide trichloracétique varie le plus souvent en sens inverse avec la durée de carence en  $\text{SO}_4^{2-}$ .

**Retention du soufre absorbé.** La diminution des vitesses est-elle réelle ou seulement apparente comme c'est le cas chez les bactéries? Chez ces dernières en effet, on constate une diminution progressive des vitesses d'absorption, suivie d'arrêt, qui est due à une sortie du substrat accumulé, sortie dont la vitesse croît avec la concentration intracellulaire<sup>6</sup>. Pour vérifier ce point nous avons laissé des Chlorelles pendant 10 min dans une solution de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  non marqué, puis nous avons ajouté  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  pour marquage et nous avons mesuré l'entrée du substrat radioactif avec le temps. Dans un essai témoin, nous avons ajouté  $\text{K}_2\text{SO}_4$  marqué dès le début (Fig. 3). La courbe d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  après traitement avec  $\text{K}_2\text{SO}_4$  non marqué est parallèle à la partie de la courbe témoin représentant l'absorption après 10 min. Deux conclusions s'imposent: (1) la diminution des vitesses d'entrée est réelle; (2) l'ion sulfate, une fois entré n'est pas échangeable.

Ces conclusions sont confirmées par les deux expériences suivantes.

Dans l'une nous avons ajouté à une suspension de Chlorelles,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  non marqué, puis, à des intervalles variables, nous avons prélevé quelques ml dans un tube à essai

contenant  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  pour marquage et nous avons mesuré les vitesses d'absorption. La Fig. 4 montre une diminution des vitesses avec la durée de séjour dans  $\text{K}_2\text{SO}_4$  froid.

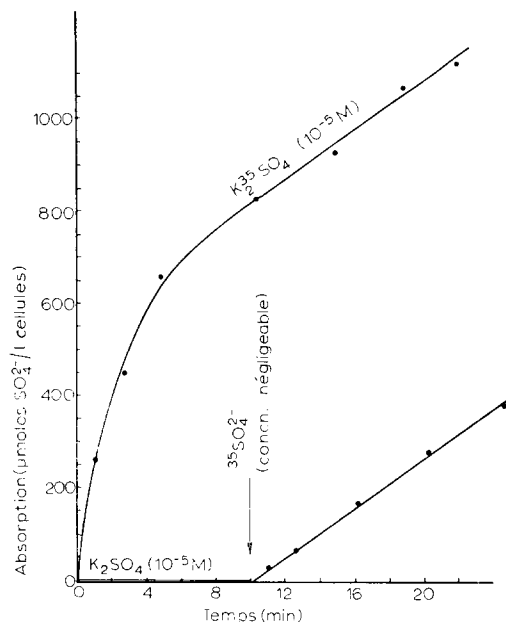


Fig. 3. Courbe A, entrée de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  en fonction du temps; Courbe B, *ibid*,  $^{35}\text{SO}_4$ , uniquement pour marquage, est ajouté après 10 min d'incubation dans une solution de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  non marqué.

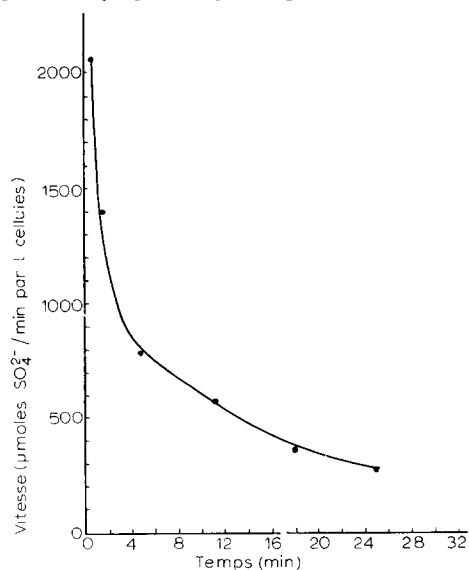


Fig. 4. Vitesses d'accumulation en fonction de la durée d'incubation dans une solution de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  non marqué ( $10^{-4}$  M). A des temps variables après addition de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  non marqué, quelques ml sont prélevés dans un tube à essai contenant du  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ , uniquement pour marquage, et on procède à la mesure des vitesses. Les Chlorelles ont été carencées en sulfate pendant 24 h (milieu B).

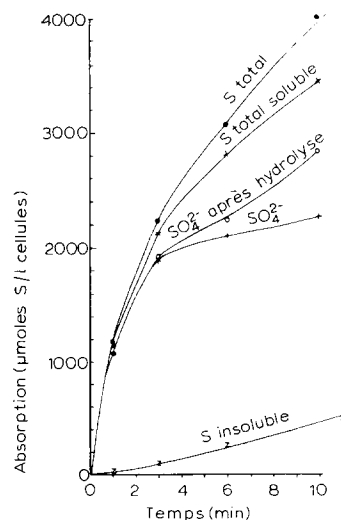


Fig. 5. Répartition du  $^{35}\text{S}$  dans divers extraits cellulaires en fonction de la durée d'absorption. Concn. en  $\text{K}_2^{35}\text{SO}_4$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$  M. Les Chlorelles ont été carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  pendant 6 h (milieu B).

Dans l'autre expérience nous avons lavé (sur le filtre) des Chlorelles qui ont absorbé du  $\text{SO}_4^{2-}$  marqué, avec une solution de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  non marqué, 20 fois plus concentrée que la solution d'absorption. La radioactivité des Chlorelles était la même que celle du témoin lavé à l'eau.

*Teneurs en  $\text{SO}_4^{2-}$  des Chlorelles.* L'absence d'échanges pouvait être due au fait que le sulfate absorbé était immédiatement métabolisé. Nous avons, par conséquent, analysé la répartition de la radioactivité dans diverses fractions cellulaires. Les résultats sont donnés dans la Fig. 5. Une grande partie reste sous forme de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Cette expérience montre également que cet ion est absorbé contre un gradient de concentration: pendant la première minute 1080  $\mu\text{moles}$  de  $\text{SO}_4^{2-}$  sont accumulés par l de cellules, alors que la concentration externe était de  $8 \cdot 10^{-5}$  M (80  $\mu\text{moles/l}$ ). Nos résultats sont confirmés par d'autres chercheurs<sup>7</sup> qui utilisent des méthodes d'analyse différentes des nôtres (chromatographie et électrophorèse).

*Influence de la température et du dinitrophénol.* L'absorption est sensible à la température (Tableau II) et au dinitrophénol.

TABLEAU II

VITESSES D'ENTRÉE À 29° ET À 2° EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN  $\text{K}_2\text{SO}_4$ 

Concentration (M)	$\mu\text{moles SO}_4^{2-}/\text{min}$ par l cellules		$Q_{10}$
	29°	2°	
$3 \cdot 10^{-7}$	59	2.80	3.4
$10^{-6}$	135	6.76	3.06
$3 \cdot 10^{-6}$	185	8.06	3.2
$10^{-5}$	225	10.4	3.1

*Influence de la lumière.* La lumière stimule l'absorption et en sa présence, nous l'avons vu, l'augmentation des vitesses pendant un prétraitement dans un milieu sans  $\text{SO}_4^{2-}$  est plus rapide (Fig. 2). Toutefois, des Chlorelles longuement carencées en soufre (elles atteignent alors les vitesses maximales pour une concentration donnée en  $\text{SO}_4^{2-}$ ) peuvent développer à l'obscurité des vitesses comparables à celles des témoins restés à la lumière.

*Influence de la concentration.* Nous avons effectué de nombreuses expériences sur les vitesses d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  en fonction de la concentration, et cela avec du matériel qui a séjourné pendant des temps variables (de 2.5 h à 30 h) dans les milieux sans  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $\text{CaCl}_2$  ou milieu B). Les graphiques  $v = f(v/\text{concn.})$  (représentation d'Eadie) donnent des droites (Fig. 6). Les  $K_m$  calculés varient entre 0.9 et  $1.5 \cdot 10^{-6}$  M et ceci indépendamment de la durée de carence en sulfate\*.

*Influence de divers ions.* L'effet des ions  $\text{SeO}_4^{2-}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ , et  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  (sels de potassium ou sodium) sur les vitesses d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  a été étudié. Tous inhibent l'absorption (cf. YAMOMOTO ET SEGEL<sup>8</sup>, PARDEE *et al.*<sup>9</sup>). Les graphiques des réciproques des vitesses en fonction de la concentration de ces ions (la concentration de  $\text{SO}_4^{2-}$  étant constante et égale à  $10^{-5}$  M) donnent dans tous les cas des droites (Fig. 7). Pour un de ces ions,  $\text{CrO}_4^{2-}$ , l'inhibition a été étudiée de plus près. Elle est du type compétitif. Le  $K_i$  est de l'ordre de  $4 \cdot 10^{-7}$  M. Les ions phosphate

\* Note ajoutée à l'impression: Les  $K_m$  varient toutefois au cours des deux premières heures de carence<sup>15</sup>. (Reçu le 2 mai, 1968)

$\text{NO}_3^-$  et  $\text{Cl}^-$  à  $10^{-4}$  M n'ont aucun effet tandis que  $\text{Na}_2\text{S}$  à la même concentration et à pH 5.5 diminue les vitesses (60 %).

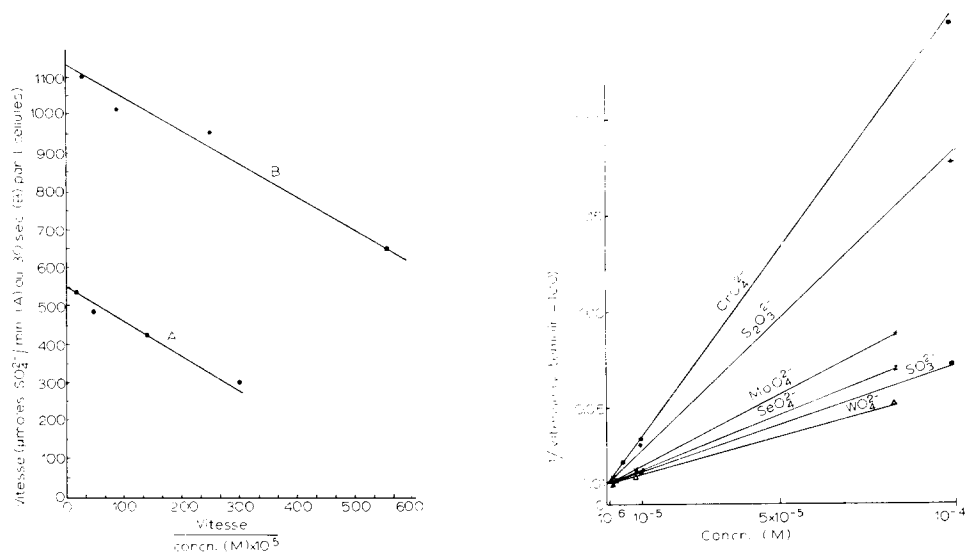


Fig. 6. Vitesses d'entrée en fonction de la concentration en  $\text{SO}_4^{2-}$ . Résultats présentés sous forme  $v = f(v/\text{concn.})$ . A, Chlorelles préincubées pendant 2 h 30 min dans une solution de  $\text{CaCl}_2$ ; B, Chlorelles préincubées pendant 24 h dans le milieu B. Dans les deux cas le  $K_m$  est de  $0.9 \cdot 10^{-6}$  M environ.

Fig. 7. Vitesses d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  en fonction de la concentration de divers ions. Résultats présentés sous forme de  $1/v = f(\text{concn.})$ ,  $v$  = absorption pendant 1 min par 1 de cellules en % du témoin.

## DISCUSSION

L'entrée de l'ion sulfate chez *Chlorella* possède des caractères d'un transport actif. Le  $K_m$  des vitesses d'absorption se situe autour de  $1.2 \cdot 10^{-6}$  M, indiquant une affinité marquée de  $\text{SO}_4^{2-}$  pour son système de perméation.

Le sulfate intracellulaire n'est pratiquement pas échangeable avec celui de l'extérieur. Cette absence d'échanges ou tout au moins d'échanges rapides des solutés intracellulaires est très fréquemment observée dans les cellules végétales<sup>8,10-12</sup>.

La diminution de la vitesse d'entrée en fonction de la durée d'incubation dans un milieu avec  $\text{SO}_4^{2-}$  et son accroissement après carence en sulfate témoignent d'un mécanisme de régulation. Ces phénomènes sont trop rapides pour pouvoir les attribuer à une régulation au niveau génétique.

Un contrôle de l'accumulation de  $\text{SO}_4^{2-}$  par le métabolisme énergétique peut certes expliquer la différence de comportement des Chlorelles à la lumière et à l'obscurité, mais la plupart de nos expériences ont été faites à la lumière. Notons aussi que même à l'obscurité, les vitesses peuvent dans certains cas atteindre leur niveau à la lumière. Nous avons également envisagé diverses autres possibilités d'intervention de l'énergie. Par exemple en supposant l'existence d'un composé spécifique du système de perméation de  $\text{SO}_4^{2-}$ , T, cycliquement transformé en sa forme active Ta, avec consommation d'énergie. La réaction  $T \rightarrow \text{Ta}$  serait limitante. En absence de l'ion sulfate, T serait progressivement transformé en Ta, d'où une augmentation des vites-

ses. En présence de cet ion la concentration en Ta, et par conséquent les vitesses d'absorption, dépendrait de son taux de renouvellement sauf pour les premières minutes. Mais de telles hypothèses, ou bien ne s'accordent que très partiellement aux faits ou bien aboutissent à des conclusions difficilement vérifiables.

La troisième hypothèse que nous avons émise dans l'introduction, contrôle par rétro-inhibition, peut d'une manière générale rendre compte des variations des vitesses et de leur rythme. L'inhibiteur, probablement un composé soufré apparaîtrait chez des *Chlorelles* incubées avec  $\text{SO}_4^{2-}$  et disparaîtrait en son absence dans le milieu extérieur, d'où la diminution et l'augmentation des vitesses respectivement observées dans ces conditions. YAMOMOTO ET SEGEL<sup>8</sup>, DREYFUSS ET PARDEE<sup>13</sup> aboutissent aux mêmes conclusions pour expliquer la régulation de l'entrée de l'ion sulfate chez d'autres micro-organismes. Des expériences visant à vérifier cette hypothèse sont rapportées dans un autre article<sup>14</sup>.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement Monsieur A. KÉPÈS du collège de France de l'intérêt qu'il a pris à ce travail ainsi que Monsieur M. KÖHLER, du Département de Biochimie Macromoléculaire de Montpellier qui nous a si cordialement hébergés dans son laboratoire.

#### RÉSUMÉ

L'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  chez *Chlorella pyrenoidosa* a été étudiée. Elle a lieu contre un gradient de concentration, ses coefficients de température ( $Q_{10}$ ) sont élevés, elle est sensible au dinitrophénol. Les  $K_m$  de l'absorption sont de l'ordre de  $10^{-6}$  M.  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$  et les anions du groupe VI du type  $\text{XO}_3^{2-}$  inhibent l'absorption. Les vitesses d'absorption augmentent au cours d'une préincubation des *Chlorelles* dans un milieu sans  $\text{SO}_4^{2-}$  et diminuent lorsque cet ion est présent; d'autre part  $\text{SO}_4^{2-}$  intra-cellulaire n'est pas échangeable. L'hypothèse selon laquelle un effecteur intra-cellulaire du système d'absorption, probablement un composé soufré, apparaîtrait en présence de cet ion et disparaîtrait en son absence, peut rendre compte des variations des vitesses et de leur rythme.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 F. C. STEWARD, *Ann. Rev. Biochem.*, 4 (1935) 519.
- 2 J. F. SUTCLIFFE, *Symp. Soc. Expt. Biol.*, 8 (1954) 325.
- 3 H. TAMIYA, *Symp. Soc. Expt. Biol.*, 17 (1963) 188.
- 4 D. VRANA ET Z. FENCL, *Fol. Microbiol.*, 9 (1963) 150.
- 5 J. LOISELEUR, *Techniques de Laboratoire*, Masson, Paris, 1954, p. 454.
- 6 A. KÉPÈS, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1966) 70.
- 7 R. T. WEDDING ET M. K. BLACK, *Plant Physiol.*, 35 (1960) 72.
- 8 L. A. YAMOMOTO ET I. H. SEGEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 114 (1966) 523.
- 9 A. B. PARDEE, L. S. PRESTIDGE, M. B. WHIPPLE ET J. DREYFUSS, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3962.
- 10 A. SHRIFT, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 495.
- 11 J. SUTCLIFFE, *J. Exptl. Bot.*, 5 (1954) 319.
- 12 M. VALLÉE, *Thèse Doct. d'Etat*, Université de Paris, 1963.
- 13 J. DREYFUSS ET A. B. PARDEE, *J. Bacteriol.*, 91 (1966) 2275.
- 14 M. VALLÉE ET R. JEANJEAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 150 (1968) 607.
- 15 M. VALLÉE, *Compt. Rend. Acad. Sci.*, sous presse.