

BBA 75794

EFFETS DES CATIONS EXTERNES SUR L'ACTIVITÉ DES CHLORURES CYTOPLASMIQUES DOSÉS PAR L'ÉLECTRODE Ag-AgCl INTRODUITE DANS LA CELLULE DE NITELLA

J. LEFEBVRE ET C. GILLET

Département de Biologie végétale, Facultés Universitaires, 61, rue de Bruxelles, Namur, B-5000 (Belgique)

(Reçu le 13 juillet, 1971)

SUMMARY

Effects of external cations on the chloride activity in the Nitella cytoplasm measured by means of an intracellular Ag-AgCl microelectrode

1. The chloride electrochemical potential difference and the membrane potential have been measured by means of microelectrodes in the cytoplasm of *Nitella flexilis*. It is proved that after 15 min an Ag-AgCl microelectrode inserted into *Nitella* is completely covered by the mobile cytoplasm. Cells pretreated in Ca^{2+} -free medium are used throughout the experiments. The cells are dipped in KCl or NaCl solutions where either K^+ or Na^+ concentration was varying but the ionic strength kept constant by using choline chloride as substitution cation.

2. It was found that the chloride activity in the cytoplasm is higher in 1 mM KCl solution (25 mM) than in 1 mM NaCl solution (14 mM). But this chloride activity decreases with lowering K^+ concentration or increasing Na^+ concentration in the bathing medium. A low temperature strongly decreases the chloride activity in both solutions.

3. It is shown that these results cannot be quantitatively explained by flux exchange only, whether between intracellular compartments or between these and the external medium ($P_{\text{Cl}}/P_{\text{K}}$ found equal to $5 \cdot 10^{-3}$). It is suggested by calculating an activity coefficient in two different ways and with reference to previous work on Charophyceae that a large part (about 50 %) of the chlorides is adsorbed on the cytoplasmic colloids. It is proposed that this adsorption is controlled by structural modifications due to the competition between cations for exchange sites.

INTRODUCTION

Par suite de sa nature polyélectrolytique, le cytoplasme a la propriété d'adsorber et de sélectionner des ions diffusibles. Le cytoplasme contient à la fois des sites de fixation pour cations et anions. Chez *Chara australis*, COSTER *et al.*¹, ont montré que lors d'un potentiel d'action, le cytoplasme qui se comporte principalement comme un échangeur de cations, devient transitoirement un échangeur d'anions. Au cours d'oscillations spontanées du potentiel de membrane chez *Nitella*², les variations périodi-

ques de la différence de potentiel électrochimique des chlorures peuvent être rapprochées de variations critiques dans la forme et les propriétés adsorbantes des colloïdes cytoplasmiques. D'autre part, grâce aux traceurs radioactifs, le cytoplasme apparaît comme un système multiphasique dynamique³. Les ions diffusibles peuvent s'y échanger entre la phase générale et des compartiments déjà présents (organites) ou entre celle-ci et des structures continuellement en voie de formation et de remaniement (vésicules, reticulum endoplasmique). Dans cette note, nous étudions la variation de l'activité des chlorures dans le cytoplasme, par une méthode électrochimique, au cours d'expériences où, seule, varie la concentration en potassium ou en sodium du milieu extérieur. Cette étude est possible car l'électrode sensible utilisée, une fois introduite dans la cellule de *Nitella*, est recouverte entièrement après un court laps de temps par le cytoplasme mobile.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Les cellules utilisées sont les cellules internodales de l'algue d'eau douce *Nitella flexilis* (L) Ag. var. *flexilis*, f. *flexilis* R.D.W. Cette espèce a été récoltée dans un étang d'Ardenne et cultivée au laboratoire en conditions standardisées. Avant les essais, la cellule internodale isolée est prétraitée pendant 15 h dans une solution sans Ca^{2+} (KCl 1 mM, NaCl 0.1 mM, ou bien KCl 0.1 mM, NaCl 1 mM, suivant que l'effet de K^+ ou de Na^+ est testé). Chaque expérience porte sur 10 cellules.

Dispositif expérimental

Le dispositif utilisé est inspiré de celui de BRADLEY ET WILLIAMS⁴. Le potentiel de membrane (E_{ov}) est mesuré aux bornes de deux microélectrodes remplies de KCl 3 M dont une plonge dans la vacuole, l'autre dans la solution extérieure. Elles sont reliées à un électromètre (Keithley 603) par l'intermédiaire de deux piles au calomel. La différence de potentiel électrochimique des chlorures (ΔE_{Cl}) est enregistrée aux bornes de 2 électrodes Ag-AgCl disposées de la même façon. Ces deux potentiels sont continuellement mesurés dans la même cellule pendant le remplacement successif des diverses solutions testées.

Solutions utilisées

Deux séries de 5 solutions ont été utilisées. Ce sont pour la première: KCl 1.00, 0.56, 0.32, 0.18 et 0.10 mM; et pour la seconde: NaCl dans les mêmes concentrations. On ajoute à chacune de ces solutions une quantité adéquate de chlorure de choline de façon à garder constantes la force ionique totale et la concentration en chlorures (1.1 mM). On estime que l'ion choline ne pénètre pas dans la cellule, sinon très lentement et qu'il n'affecte pas la perméabilité de la membrane.

RÉSULTATS

(a) Localisation de l'électrode Ag-AgCl dans la cellule

La Fig. 1 montre que le potentiel de l'électrode d'Ag, introduite dans la cellule de *Nitella*, augmente rapidement puis se stabilise. Il n'y a pas, après 5 min, de variations qui trahiraient un changement de la phase dans laquelle la pointe sensible

plonge. L'observation de l'électrode *in situ*, n'est pas aisée car la couche de chloroplastes empêche très souvent une vue nette de la totalité de la surface de celle-ci. Toutefois en introduisant les électrodes au niveau de la bande hélicoïdale, dépourvue de plastides, et en colorant le suc vacuolaire par le rouge neutre, on peut se rendre

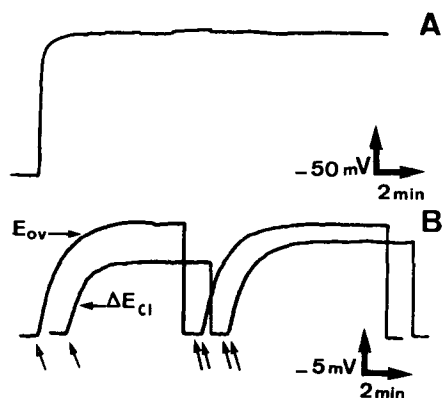


Fig. 1. A. Enregistrement du potentiel de l'électrode d'Ag à partir du moment où elle est introduite dans la cellule internodale de *Nitella flexilis*. Milieu extérieur: KCl 1 mM *plus* chlorure de choline 0.1 mM. B. Enregistrements de la variation de la différence de potentiel électrochimique des chlorures et du potentiel de membrane de *Nitella flexilis* après des changements successifs de la concentration en K^+ du milieu extérieur. 1 flèche: passage de la solution KCl 1 mM *plus* chlorure de choline 0.1 mM à KCl 0.56 mM *plus* chlorure de choline 0.54 mM. 2 flèches: passage de cette dernière solution à KCl 0.32 mM *plus* chlorure de choline 0.78 mM. Notez que les deux plumes de l'enregistreur sont décalées d'un espace correspondant à 1 min.

compte que même la partie de l'électrode Ag-AgCl située au niveau de la vacuole est entourée par du cytoplasme alors que l'extrémité de la micropipette de verre remplie de KCl 3 M plonge dans la vacuole. Après 15 min, on constate que le cytoplasme mobile recouvre d'un manchon d'environ 2 à 3 μm d'épaisseur la totalité de l'électrode Ag-AgCl. Cette différence de situation entre les 2 électrodes peut s'expliquer en partie par la manière dont celles-ci sont introduites dans la cellule. La pénétration de l'électrode d'Ag se fait beaucoup plus lentement pour éviter que la pointe métallique, moins résistante que le verre, ne se plie. Dans ces conditions, comme l'a démontré SKIERCZYŃSKA⁵, le tonoplaste très élastique ne se rompt pas. Nous estimons donc qu'au moment où nous enregistrons la différence de potentiel électrochimique, soit 15 min après l'introduction des électrodes, l'électrode Ag-AgCl est recouverte de cytoplasme mobile. Sa localisation correspond donc à celle du cytoplasme.

(b) *Valeurs du potentiel de membrane et de la différence de potentiel électrochimique*

Le potentiel mesuré est égal à la somme du potentiel du plasmalemme et de celui du tonoplaste. Ce dernier est constant^{6,7}; la vacuole étant de 10 mV en moyenne plus positive que le cytoplasme⁸. Les valeurs du potentiel de plasmalemme, E_{co} sont donc obtenues en soustrayant 10 mV du potentiel mesuré.

La Fig. 2 donne les valeurs de $\exp(E_{co}F/RT)$ pour les différentes concentrations en $[K^+]_0$ ou en $[Na^+]_0$ testées. La relation entre le potentiel du plasmalemme, E_{co} , et $[K^+]_0$ est nettement linéaire. Il est plus difficile de postuler la même linéarité entre E_{co} et $[Na^+]_0$, car la pente est ici beaucoup plus faible. $[Na^+]_0$ a relativement peu d'influence sur ce potentiel.

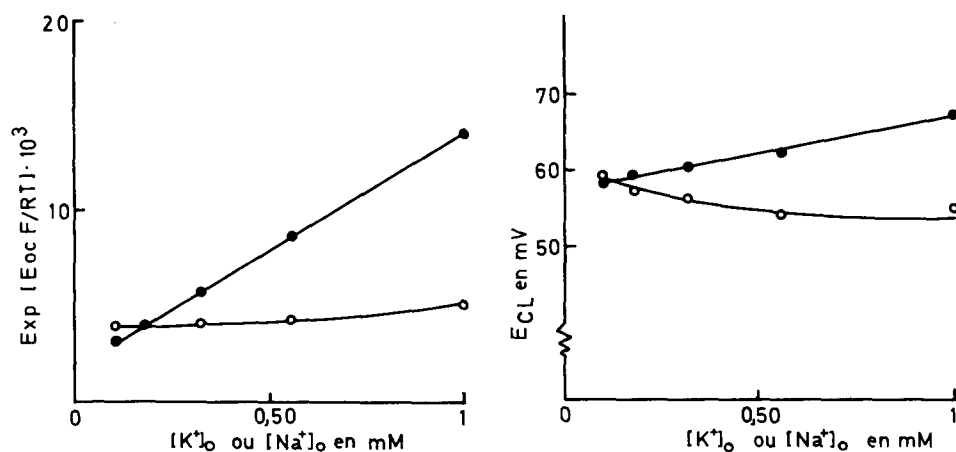


Fig. 2. Variation du potentiel du plasmalemmes chez *Nitella* en fonction de la concentration en K^+ (●—●) ou en Na^+ (○—○) du milieu extérieur. Valeurs moyennes pour 10 cellules.

Fig. 3. Variations du potentiel d'équilibre (de Nernst) des chlorures cytoplasmiques de *Nitella* en fonction de la concentration en K^+ (●—●) ou en Na^+ (○—○) du milieu extérieur. La concentration en chlorures de ce milieu reste constante (1.1 mM), le cation de substitution est la choline.

TABLEAU I

EFFET DE LA CONCENTRATION DU MILIEU EXTÉRIEUR EN K^+ OU EN Na^+ SUR LE POTENTIEL DU PLASMALEMME E_{co} , LA DIFFÉRENCE DE POTENTIEL ÉLECTROCHIMIQUE ΔE_{Cl} ET L'ACTIVITÉ DES CHLORURES DANS LE CYTOPLASME $[Cl^-]_i$ CHEZ *Nitella flexilis*

$[Cl^-]_o$ reste constant: 1.1 mM; le cation de substitution est la choline.

Concentration en K^+ ou en Na^+ du milieu extérieur (mM)	KCl			NaCl		
	E_{co}	ΔE_{Cl}	$[Cl^-]_i$	E_{co}	ΔE_{Cl}	$[Cl^-]_i$
1.00	-98	-175	25	-124	-189	14
0.56	-110	-181	19	-128	-192	13
0.32	-121	-191	17	-129	-195	15
0.18	-130	-200	17	-130	-198	16
0.10	-137	-205	16	-130	-199	17

Les valeurs du potentiel d'équilibre des chlorures de part et d'autre du plasmalemmes sont notées sur la Fig. 3. Elles ont été calculées d'après l'équation $E_{Cl} = E_{co} - \Delta E_{Cl}$ où E_{Cl} est le potentiel d'équilibre des chlorures (ou de Nernst) et ΔE_{Cl} est la différence de potentiel électrochimique des chlorures. Les valeurs de ce dernier paramètre sont données dans le Tableau I. D'après la Fig. 3, on constate que E_{Cl} a tendance à diminuer avec $[K^+]_o$ ou à augmenter avec la diminution de $[Na^+]_o$.

Il est possible de calculer l'activité des chlorures dans le cytoplasme au cours des expériences puisque

$$E_{Cl} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i}$$

où $[Cl^-]_o$ et $[Cl^-]_i$ représentent respectivement l'activité des chlorures dans la phase externe et celle, inconnue dans la phase cytoplasmique. Nous avons déterminé

expérimentalement la valeur de RT/zF en testant préalablement les électrodes utilisées dans des solutions connues de chlorure de choline. De cette façon, on tient compte de l'effet du gros ion organique sur l'électrode Ag-AgCl⁹. Les valeurs de $[Cl^-]_i$ sont notées au Tableau I. Elles diffèrent nettement de la concentration des chlorures vacuolaires (80 ± 18 mM) mesurés par électrode titrimétrie dans le même matériel.

Lorsque les solutions KCl 1 mM *plus* chlorure de choline 0.1 mM et NaCl 1 mM *plus* chlorure de choline 0.1 mM sont refroidies à 3°, on constate que l'activité des chlorures cytoplasmiques s'abaisse respectivement à 7 mM et 4 mM.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

(1) Calcul du coefficient de perméabilité du plasmalemmes aux chlorures

Si le potentiel de membrane de *Nitella* est fonction de la diffusion passive des ions K^+ , Na^+ et Cl^- et de l'activité de pompes ioniques neutres, on peut écrire, en adaptant l'équation de Goldman aux cellules plongées dans les solutions de KCl:

$$\exp \left[\frac{E_{co}F}{RT} \right] = \frac{P_K[K^+]_0 + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_0} \quad (1)$$

$$= \frac{1}{[K^+]_i + \alpha[Na^+]_i + \beta[Cl^-]_0} [K^+]_0 + \frac{\beta[Cl^-]_i}{[K^+]_i + \alpha[Na^+]_i + \beta[Cl^-]_0}$$

P_K , P_{Na} , P_{Cl} sont les coefficients de perméabilité de la membrane à K^+ , Na^+ et Cl^- ; $\alpha = P_{Na}/P_K$ et $\beta = P_{Cl}/P_K$.

On obtient ainsi l'équation d'une droite; les résultats de la Fig. 2 permettent de calculer $[K^+]_i + \alpha[Na^+]_i + \beta[Cl^-]_i = 82$ mM et $\beta[Cl^-]_i = 0.138$ mM.

Comme ces valeurs sont en fait les activités, on obtient, en remplaçant $[Cl^-]_i$ par 25 mM (*cf.* Tableau I), $\beta = 5.5 \cdot 10^{-3}$, pour $[K^+]_0 = 1.0$ mM. Cette valeur est un peu plus élevée que celle trouvée habituellement dans la littérature ($1 \cdot 10^{-3}$ à $2 \cdot 10^{-3}$). Elle est toutefois suffisamment faible pour que les points de la Fig. 2 s'ordonnent apparemment d'une façon linéaire alors que $[Cl^-]_i$ varie de 25 à 16 mM avec $[K^+]_0$. D'autre part, si nous remplaçons les différents termes de $[K^+]_i + \alpha[Na^+]_i + \beta[Cl^-]_0$ par leurs concentrations respectives telles qu'elles sont données¹⁰ pour *N. flexilis* cultivée dans un milieu assez proche du nôtre ($[K^+]_0 = 0.1$ mM; $[Na^+]_0 = 0.2$ mM; $[Ca^{2+}]_0 = 0.5$ mM; $[Cl^-]_0 = 1.3$ mM), cette expression égale 126 mM. En comparant ce résultat avec 82 mM, valeur trouvée par régression sur la Fig. 2, on peut en conclure que le coefficient d'activité pour les ions monovalents dans le cytoplasme de *Nitella* serait de 0.65.

(2) Etat des chlorures dans le cytoplasme

Nous avons réuni dans le Tableau II, les valeurs du contenu en chlorures du cytoplasme mobile chez différentes espèces de Charophycées. Suivant la technique de dosage utilisée, celles-ci correspondent soit à l'activité de ces ions, soit à leur concentration. Les résultats de BRADLEY ET WILLIAMS⁴ et de LEFEBVRE ET GILLET^{2,12} sont mis entre parenthèses parce que la localisation exacte de l'électrode n'est pas connue. Toutefois, on peut admettre aussi chez *Nitella translucens*, un recouvrement possible de l'électrode d'AgCl par le cytoplasme mobile. Il s'agit en effet de la même technique et du même type d'électrode.

Il ressort de ce tableau que l'activité des chlorures pour les différentes espèces

de Charophycées étudiées est assez semblable (valeur moyenne: 12 mM) et nettement inférieure à leur concentration. Si nous prenons, d'après le Tableau II, 43 mM comme valeur moyenne de la concentration des chlorures cytoplasmiques, le coefficient d'activité moyen serait de 0.28. Cette valeur très faible ne cadre pas avec celle que nous avons calculée (0.65) dans le paragraphe précédent ni avec celle (0.75) proposée par SPANSWICK¹⁶ ni avec la valeur la plus basse (0.43) postulée par FINDLAY *et al.*¹⁷, chez l'algue marine Griffithsia où la concentration ionique totale est pourtant plus élevée. Il semble donc logique d'admettre qu'une certaine quantité des chlorures totaux (la moitié de ceux-ci pour un coefficient d'activité égal à 0.65) se trouve sous une forme inaccessible à l'électrode Ag-AgCl.

TABLEAU II

CONTENU EN CHLORURES DU CYTOPLASME MOBILE CHEZ DIVERSES CHAROPHYCEAE

Activité ou concentration en mM. La solution extérieure contient Cl^- 1.3 mM et comme cation prépondérant Na^+ 1 ou 2 mM.

Espèces	$[\text{Cl}^-]_i$		Auteurs
	Activité	Concentration	
<i>Chara corallina</i> (= <i>C. australis</i>)	10		COSTER ¹¹
<i>Nitella flexilis</i>		36	KISHIMOTO ET TAZAWA ¹⁰
	(9)		LEFEBVRE ET GILLET ²
	14		Ce travail
<i>Nitella translucens</i>	(18)		BRADLEY ET WILLIAMS ⁴
	(11)		LEFEBVRE ET GILLET ¹²
		65	SPANSWICK ET WILLIAMS ¹³
	87*		HOPE <i>et al.</i> ¹⁴
<i>Tolypella intricata</i>		23-31	LARKUM ¹⁵

* D'après les auteurs¹⁴: contamination possible par le suc vacuolaire. Nous ne tenons pas compte de cette valeur.

Deux explications peuvent rendre compte de cela. La première est d'admettre suivant les conceptions de LING¹⁸ et de TROSHIN¹⁹, qu'une grande partie des chlorures serait adsorbée au niveau des colloïdes cytoplasmiques de Nitella. Il existerait donc un équilibre dynamique entre chlorures libres et adsorbés tel que $\text{Cl}^- + \text{R}-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{R}-\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$ où $\text{R}-\text{NH}_3^+$ représente un groupe aminé des protéines cytoplasmiques. Cette explication concorde avec les résultats concernant la variation de $[\text{Cl}^-]_i$ au cours d'un potentiel d'action¹ ou lors d'oscillations spontanées du potentiel de membrane². La seconde explication est d'admettre suivant les conceptions de BENNETT²⁰ et de MACROBBIE²⁴ que le cytoplasme est un système multiphasique dynamique. Les chlorures s'y échangent entre différents compartiments déjà présents ou néoformés par la synthèse de membranes. Une partie des chlorures serait ainsi isolée par rapport à la phase générale. Cette explication repose principalement sur la cinétique d'échange d'ions marqués entre le cytoplasme et la vacuole.

(3) Echange entre chlorures libres et adsorbés

On constate dans le Tableau I que l'activité des chlorures cytoplasmiques est plus forte dans la solution 1 mM KCl que dans 1 mM NaCl. Cette différence a tendance

à disparaître à mesure que les concentrations extérieures en K^+ ou Na^+ diminuent. Il est assez malaisé de comprendre cette variation d'activité des chlorures cytoplasmiques simplement sur la base d'échange de chlorures entre le cytoplasme et l'extérieur ou entre le cytoplasme et la vacuole.

Considérons la diminution (6 mM; Tableau I) de l'activité des chlorures cytoplasmiques lorsque $[K^+]_0$ passe de 1 à 0.56 mM. Elle se produit à peu près en 240 sec (Fig. 1). Comme le volume moyen des cellules utilisées est de $1.7 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$, que le cytoplasme en occupe la dixième partie²¹ et que la surface cellulaire moyenne est de 0.165 cm^2 une telle variation nécessite un efflux net d'environ $25 \text{ pM} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$. De même, l'augmentation (1 mM) de l'activité des chlorures cytoplasmiques lorsque $[Na^+]_0$ varie dans les mêmes limites serait de $4 \text{ pM} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$. Ces valeurs ne sont pas compatibles avec les flux mesurés par traceurs. L'efflux au niveau du plasmalemmes varie au maximum entre $0.17 \text{ pM} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ (réf. 22) et $3.2 \text{ pM} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ (réf. 23); l'influx varie entre 1 et $2 \text{ pM} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ (réf. 24). Au niveau du tonoplaste, il semble bien que le flux des chlorures soit couplé avec celui des cations²⁵. On s'explique alors mal comment en diminuant $[K^+]_0$, le flux de chlorures vers la vacuole augmenterait. D'autre part, la diminution importante de l'activité des chlorures au froid est, jusqu'à présent, difficilement conciliable avec un échange entre compartiments intracytoplasmiques à moins que de postuler pour les membranes intracytoplasmiques des valeurs des coefficients de perméabilité très différentes de celles actuellement connues pour le plasmalemmes²⁶.

Il semble donc que l'on doive s'orienter vers une explication rendant compte à la fois de la différence d'activité constatée en présence de $[Na^+]_0$ et de $[K^+]_0$ et de la variation en sens opposé de celle-ci quand ces cations varient de façon identique. Cette solution, tenant compte des phénomènes d'adsorption précités, est d'admettre que les ions Cl^- sont d'autant moins adsorbés que les ions K^+ sont plus abondants par rapport aux ions Na^+ dans l'espace cytoplasmique non organisé. On pourrait ainsi envisager une compétition entre les ions K^+ et Na^+ pour certains sites de fixation de la matrice cytoplasmique entraînant lors de l'adsorption de K^+ un remaniement de la forme telle que les sites d'échanges pour Cl^- soient en partie masqués. Les possibilités de modification structurale d'un échangeur par remplacement cationique sont connues et ont déjà été étudiées dans des systèmes inertes²⁷. L'action du froid serait due à une adsorption plus intense des chlorures à la suite d'un remaniement de la forme des macromolécules cytoplasmiques.

RÉSUMÉ

La différence de potentiel électrochimique des chlorures et le potentiel de membrane ont été mesurés dans le cytoplasme de *Nitella flexilis*. Des colorations spécifiques ont montré que l'électrode d'Ag-AgCl bien qu'introduite dans la vacuole se trouve, après 15 min, entièrement recouverte de cytoplasme mobile. Les cellules prétraitées dans un milieu dépourvu de Ca^{2+} sont plongées dans des solutions de KCl ou de NaCl où la concentration de K^+ ou de Na^+ varie. La force ionique totale est maintenue constante par addition de chlorure de choline utilisé comme cation de substitution.

On observe que l'activité des chlorures dans le cytoplasme est plus élevée dans la solution KCl 1 mM (25 mM) que dans la solution NaCl 1 mM (14 mM). Elle décroît

cependant avec la diminution de la concentration en K^+ ou avec l'augmentation de la concentration en Na^+ dans le milieu extérieur. Dans les deux solutions, l'abaissement de la température provoque une chute de l'activité des chlorures. Ces résultats ne peuvent s'expliquer quantitativement sur la seule base des modifications de flux entre les compartiments cellulaires ou entre ceux-ci et le milieu extérieur (P_{Cl}/P_K calculé égal à $5 \cdot 10^{-3}$). Le coefficient d'activité calculé par deux méthodes différentes et des références aux travaux précédents sur les Charophyceae suggèrent qu'une large part (environ 50 %) des chlorures sont adsorbés sur des colloïdes cytoplasmiques. Cette adsorption serait contrôlée par des modifications structurales dues à la compétition entre les cations au niveau des sites d'échange.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. G. L. COSTER, J. C. SYRIATOWICZ ET L. N. VOROBIEV, *Aust. J. Biol. Sci.*, 21 (1968) 1069.
- 2 J. LEFEBVRE ET C. GILLET, *Biochim. Biophys. Acta*, 203 (1970) 575.
- 3 E. A. C. MACROBBIE, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 22 (1971) 75.
- 4 J. BRADLEY ET E. J. WILLIAMS, *J. Exp. Bot.*, 18 (1967) 241.
- 5 J. SKIERCZYŃSKA, *J. Exp. Bot.*, 19 (1968) 407.
- 6 G. P. FINDLAY ET A. B. HOPE, *Aust. J. Biol. Sci.*, 17 (1964) 62.
- 7 R. M. SPANSWICK, J. STOLAREK ET E. J. WILLIAMS, *J. Exp. Bot.*, 18 (1967) 1.
- 8 J. LEFEBVRE ET C. GILLET, *Bull. Soc. R. Bot. Belg.*, 102 (1968) 61.
- 9 G. J. JANZ, in D. J. IVES ET G. J. JANZ, *Reference Electrodes*, Academic Press, New York, 1961, p. 179.
- 10 U. KISHIMOTO ET M. TAZAWA, *Plant Cell Physiol.*, 6 (1965) 507.
- 11 H. G. L. COSTER, *Aust. J. Biol. Sci.*, 19 (1966) 545.
- 12 J. LEFEBVRE ET C. GILLET, *Experientia*, 26 (1970) 482.
- 13 R. M. SPANSWICK ET E. J. WILLIAMS, *J. Exp. Bot.*, 15 (1964) 193.
- 14 A. B. HOPE, A. SIMPSON ET N. A. WALKER, *Aust. J. Biol. Sci.*, 19 (1966) 355.
- 15 A. W. D. LARKUM, *Nature*, 218 (1968) 447.
- 16 R. M. SPANSWICK, *Nature*, 218 (1968) 357.
- 17 G. P. FINDLAY, A. B. HOPE ET E. J. WILLIAMS, *Aust. J. Biol. Sci.*, 22 (1969) 1163.
- 18 G. N. LING, *J. Gen. Physiol.*, 43 (1960) 149.
- 19 A. S. TROSHIN, *Problems of Cell Permeability*, Pergamon Press, Oxford, 1 éd., 1966, p. 549.
- 20 H. S. BENNETT, *J. Biochem. Biophys. Cytol.*, 2 (1956) 94.
- 21 P. SALTMAN ET T. CHRISTENSEN, *Nature*, 191 (1961) 825.
- 22 H. G. L. COSTER ET A. B. HOPE, *Aust. J. Biol. Sci.*, 21 (1968) 243.
- 23 D. S. MAILMAN ET L. J. MULLINS, *Aust. J. Biol. Sci.*, 19 (1966) 385.
- 24 E. A. C. MACROBBIE, *Quart. Rev. Biophys.*, 3 (1970) 251.
- 25 E. A. C. MACROBBIE, *Aust. J. Biol. Sci.*, 19 (1966) 371.
- 26 J. HOGG, E. J. WILLIAMS ET R. J. JOHNSTON, *Biochim. Biophys. Acta*, 150 (1968) 640.
- 27 R. M. BARRER ET J. D. FALCONER, *Proc. R. Soc. London Ser. A*, 236 (1956) 227.