

BBA 75 148

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

## II. RECHERCHES SUR LA RÉGULATION DE L'ENTRÉE

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.**II. The regulation of entry*

In a preceding article we described the phenomena concerning regulation of the entrance of  $\text{SO}_4^{2-}$  into Chlorella cells; these phenomena are consistent with the hypothesis that an intracellular effector, probably a  $\text{SO}_4^{2-}$  metabolite, controls the absorption.

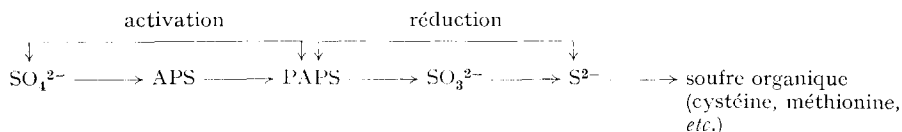
Experiments seeking to identify this effector are reported in the present paper. We have obtained indications that the effector might be a non-reduced sulphur compound. Cysteine and methionine do not seem to repress the absorption of sulphate. These amino acids do inhibit the entrance of this ion in the cells, but only in cells which have been sulphur starved for a short time. The absorption is sensitive to phenylalanine, *p*-fluorophenylalanine and SH inhibitors: *N*-ethylmaleimide, *p*-chloromercuribenzoate and *p*-chloromercuriphenylsulphonate. Intracellular  $\text{SO}_4^{2-}$  and soluble organic S decrease when the cells are preincubated in the absence of  $\text{SO}_4^{2-}$  while the rate of absorption increases. An effect of  $\text{CrO}_4^{2-}$  on the entrance of  $\text{SO}_4^{2-}$  in the cells, in addition to its effect as a competitive inhibitor, has been demonstrated.

## INTRODUCTION

Dans un travail précédent<sup>1</sup> nous avons mis en évidence des phénomènes de régulation de l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  dans Chlorella qui s'accordent avec l'hypothèse selon laquelle un effecteur intracellulaire, probablement un métabolite de  $\text{SO}_4^{2-}$ , contrôlerait l'absorption. Les expériences présentées ci-dessous ont pour but d'identifier cet effecteur hypothétique et par là de vérifier l'hypothèse elle-même.

Abréviations: APS, adénosine 5'-phosphosulfate; PAPS, 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate; APCr, adénosine 5'-phosphochromate; PCMB, acide *p*-chloromercuribenzoïque; CMPS, acide *p*-chloromercuriphenylsulfonique.

La voie métabolique principale de la réduction du sulfate chez *Chlorella* est probablement la suivante<sup>2-4</sup>:



Notons aussi que les *Chlorelles* contiennent des quantités importantes de sulfolipides<sup>5</sup>.

Deux éventualités ont été envisagées: (1) la cystéine ou (et) la méthionine serait l'effecteur; (2) celui-ci serait un composé soufré situé avant la réduction de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Quelques indications en faveur de la deuxième hypothèse ont été obtenues.

#### MÉTHODES ET TECHNIQUES

Elles ont été décrites précédemment<sup>1</sup>: Les *Chlorelles* sont cultivées dans un milieu minéral (Milieu A\*) à la lumière et avec barbotage d'un mélange d'air +  $\text{CO}_2$ . Elles sont récoltées en phase exponentielle, centrifugées, lavées et resuspendues dans un milieu sans soufre ( $\text{CaCl}_2$  à  $10^{-4}$  M ou milieu B\*). La technique utilisée pour l'étude de l'absorption est celle des millipores, avec emploi de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ . Sauf indication contraire, la concentration de  $\text{K}_2^{35}\text{SO}_4$  dans le milieu d'absorption est de  $10^{-5}$  M et les expériences ont lieu à la lumière avec du matériel qui est resté pendant 2 h 30 min à 3 h dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-4}$  M) à pH 5.5.

La répartition du soufre dans différentes fractions cellulaires a été déterminée comme décrit dans bibl. 1 avec quelques différences; notamment le  $\text{SO}_4^{2-}$  a été précipité avec du  $\text{BaCl}_2$ . Pour d'autres détails voir bibl. 1.

#### RÉSULTATS ET DISCUSSION

(1) Vitesses d'entrée de l'ion sulfate dans des *Chlorelles* cultivées avec de la cystéine et de la méthionine comme source de soufre. Deux effets différents de la cystéine et (ou) de la méthionine sur l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  chez des microorganismes ont été rapportés par différents auteurs: (a) Répression de la perméase de  $\text{SO}_4^{2-}$  (bibl. 6,7); (b) inhibition immédiate de l'entrée. Elle ne se manifeste que dans certaines conditions en particulier lorsque le matériel a été cultivé avec du sulfate comme source de soufre<sup>6,8,9</sup>. Nous avons examiné dans quelle mesure ces deux effets se produisent également chez *Chlorella*.

Des *Chlorelles* récoltées en phase exponentielle, ont été ensemencées dans les milieux suivants en raison de 0.16  $\mu\text{l}$  de cellules par ml de milieu.

I. Milieu complet (milieu A); II. Milieu complet + L-cystéine à  $10^{-4}$  M (la concentration en  $\text{SO}_4^{2-}$  a été réduite de 2/3); III. Milieu sans  $\text{SO}_4^{2-}$  (milieu B); IV. Milieu sans  $\text{SO}_4^{2-}$  + L-cystéine à  $10^{-4}$  M; V. Milieu sans  $\text{SO}_4^{2-}$  + L-méthionine à  $10^{-4}$  M.

La croissance dans les milieux I et II était normale. Dans les trois autres, plus

\* Milieu A, en mM:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ : 0.1;  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ : 6.6;  $\text{H}_3\text{PO}_4$ : 0.33;  $\text{MgSO}_4$ : 0.15; KCl: 0.3; microéléments: cf. bibl. 1; pH ajusté avec KOH: 6.2.

Milieu B: identique au milieu A mais sans  $\text{MgSO}_4$ .

lente. Au bout de 21 h, les volumes des Chlorelles étaient: 1.5, 1.40, 0.39, 0.53 et 0.62  $\mu\text{l}/\text{ml}$  de milieu respectivement. Par la suite, la croissance s'est pratiquement arrêtée dans III et IV, mais a repris au bout de 50 h dans V.

Au bout de 21 h de culture une partie des Chlorelles a été centrifugée et resuspendue dans le milieu B. Le Tableau I donne les vitesses d'absorption respectives. On constate qu'indépendamment de la présence d'un acide aminé, les vitesses sont plus

TABLEAU I

VITESSES D'ABSORPTION DE L'ION SULFATE PAR DES CHLORELLES APRÈS 21 h DE SÉJOUR DANS DIVERS MILIEUX

Les Chlorelles sont resuspendues dans milieu B. Les mesures ont été faites 30 min après. Résultats exprimés en  $\mu\text{moles SO}_4^{2-}/\text{min}$  par 1 cellule.

I	II	III	IV	V
Milieu A (normal)	Milieu A + cystéine	Milieu B (sans $\text{SO}_4^{2-}$ )	Milieu B + cystéine	Milieu B + méthionine
215	186	940	878	445

grandes chez les Chlorelles qui ont poussé dans des milieux sans  $\text{SO}_4^{2-}$ . Elles sont élevées pour les Chlorelles cultivées sans  $\text{SO}_4^{2-}$  ou avec de la cystéine comme source de soufre, moyennes pour celles cultivées avec de la méthionine et relativement basses pour celles qui ont poussé dans les milieux contenant  $\text{SO}_4^{2-}$ . La cystéine et la méthionine ne semblent donc pas réprimer le système d'absorption de cet ion. Notons aussi que, dans nos conditions de culture, la cystéine ne favorise pas la croissance des Chlorelles. Avec la méthionine une période d'adaptation relativement longue est nécessaire.

(2) Influence de la *p*-fluorophénylalanine et de la phénylalanine. Les vitesses d'absorption de  $\text{SO}_4^{2-}$  augmentent pendant la préincubation des Chlorelles dans un milieu carencé en sulfate<sup>1</sup>. Cette augmentation nous a paru trop rapide pour pouvoir l'attribuer à une régulation au niveau génétique. Cherchant à confirmer cette conclusion, nous avons suivi l'évolution des vitesses (dans un milieu privé de soufre) en présence de *p*-fluorophénylalanine, analogue de la phénylalanine: les protéines synthétisées seraient dans ce cas des fausses protéines. Ce toxique inhibe l'absorption presque instantanément. La synthèse protéique ne peut donc dans ce cas être mise en cause. La L-phénylalanine donne les mêmes résultats, la L-tyrosine inhibe faiblement tandis que le DL-tryptophane n'a aucun effet (Fig. 1). La Fig. 2 montre que l'inhibition augmente avec la durée de séjour dans une solution de phénylalanine. Il en est de même pour son analogue. La cause de ces effets nous est inconnue. Il serait intéressant d'examiner dans quelle mesure ils sont spécifiques à ces corps aromatiques, s'ils se produisent pour d'autres ions et enfin s'ils sont en relation avec le mécanisme de régulation.

(3) Influence de la cystéine et de la méthionine sur les vitesses d'entrée. La méthionine inhibe l'absorption chez des Chlorelles qui sont restées 15 à 30 min seulement dans un milieu sans  $\text{SO}_4^{2-}$  (Fig. 3).

La cystéine produit des effets analogues mais plus irréguliers. Les résultats obtenus avec des Chlorelles qui ont séjourné plus longtemps dans un milieu sans soufre

(2 à 3 h) sont plutôt variables allant d'une inhibition très nette ( $>50\%$ ) à une absence d'effet. Parfois même, en présence de cystéine nous obtenons des stimulations marquées. Des acides aminés comme la L-sérine, la L-alanine et l'acide djenkolique, n'ont aucune action. La cystéine n'affecte pratiquement pas les vitesses de matériel

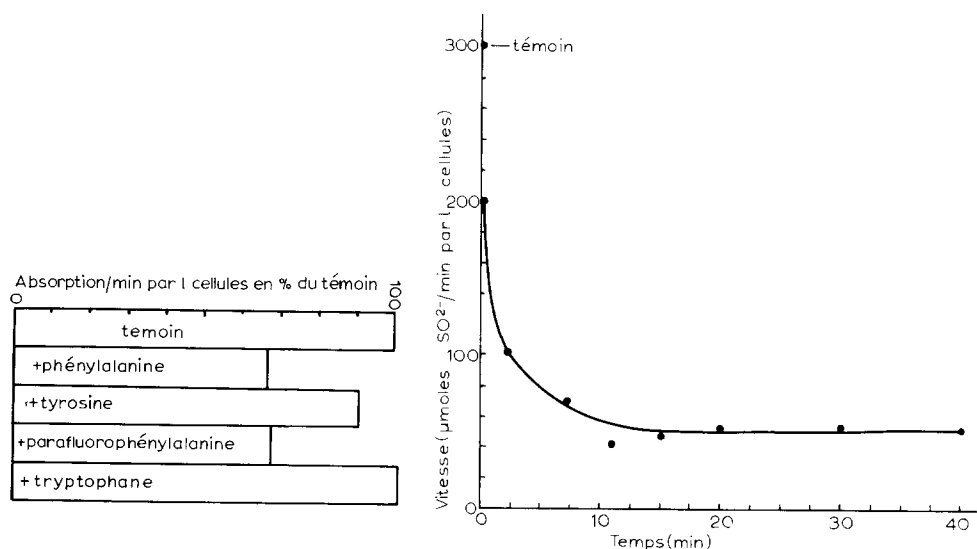


Fig. 1. Influence de divers acides aminés aromatiques ajoutés à temps 0, sur les vitesses d'absorption de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Conc. des acides aminés  $10^{-4}$  M.

Fig. 2. Vitesses d'absorption en fonction de la durée d'incubation dans une solution de phénylalanine à  $10^{-4}$  M.

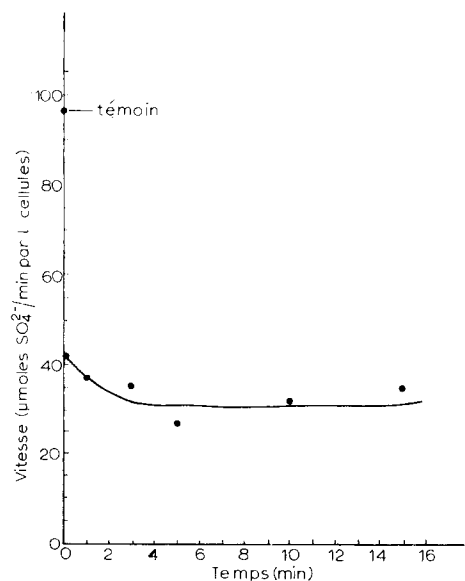


Fig. 3. Vitesses d'entrée en fonction de la durée de séjour dans une solution de méthionine à  $10^{-4}$  M. Chlorelles carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  (dans une solution de  $\text{CaCl}_2$ ) pendant 30 min environ.

carencé longuement ( $< 10\%$ ) même lorsque cet acide aminé est ajouté 15 à 20 min avant le début des mesures.

L'hypothèse émise par ELLIS<sup>9</sup> selon laquelle la cystéine serait un inhibiteur allostérique du système d'entrée du sulfate, peut expliquer les résultats obtenus avec du matériel peu carencé et longuement carencé. La cystéine n'agirait pas sur ce dernier parce que, carencé en  $\text{SO}_4^{2-}$ , donc en soufre, il l'utiliserait dès son entrée pour ses besoins métaboliques (synthèse protéique *etc.*). Cependant, les effets très variables de cet acide aminé et de la méthionine sur des Chlorelles moyennement carencées, les stimulations marquées des vitesses que nous y observons parfois, la valeur élevée de celles-ci chez des Chlorelles cultivées sur ces deux acides aminés nous incitent à penser que les effets de ces acides aminés sur l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  sont plutôt indirects.

Dans les expériences qui suivent, nous avons surtout examiné l'hypothèse selon laquelle l'effecteur serait un composé soufré qui, sur la voie principale du métabolisme de  $\text{SO}_4^{2-}$ , se situerait avant la réduction de ce dernier.

(4) Teneurs en soufre soluble en fonction de la durée d'incubation dans un milieu dépourvu de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Des Chlorelles qui ont poussé pendant 24 h dans milieu A, avec  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ , ont été centrifugées et resuspendues soit dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  à  $10^{-4}$  M, soit dans milieu B. A des temps variables, 10 ml sont filtrés et les teneurs en  $\text{SO}_4^{2-}$  et en soufre organique, ont été déterminées comme décrit précédemment<sup>\*,1</sup>. Un second lot, cultivé et traité de la même manière, mais sans marquage du soufre, a servi aux mesures des vitesses d'absorption.

Les résultats obtenus pour des Chlorelles incubées dans le milieu B sont présentés dans la Fig. 4. On constate qu'aussi bien les taux de  $\text{SO}_4^{2-}$  que ceux de soufre

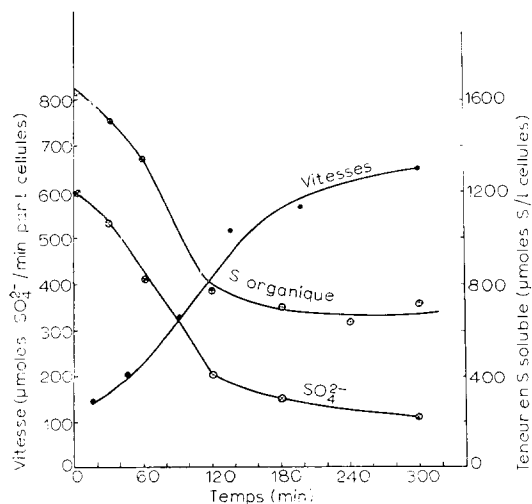


Fig. 4. Teneurs en soufre soluble et vitesses d'entrée en fonction de la durée de séjour dans le milieu B (sans  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Des Chlorelles qui ont poussé pendant 24 h dans milieu A avec  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  ont été centrifugées et resuspendues dans milieu B. A des temps variables, 10 ml sont filtrés et les teneurs en soufre organique et en  $\text{SO}_4^{2-}$  ont été déterminées. Un second lot cultivé et traité de la même manière mais sans marquage du soufre a servi aux mesures des vitesses. Nous avons tenu compte des changements de volume pendant l'incubation, seulement pour les vitesses.

\* Le sulfate est déterminé par précipitation avec du  $\text{BaCl}_2$  à bas pH (environ 1). Il est possible que le précipité entraîne ou précipite d'autres formes anioniques de soufre.

organique soluble dans l'acide trichloroacétique baissent rapidement pendant les deux premières heures, période pendant laquelle l'augmentation des vitesses est plus intense. Il y a donc un parallélisme entre évolution des vitesses et baisse des teneurs en soufre organique soluble ou en  $\text{SO}_4^{2-}$ , indiquant que ces événements sont probablement liés. Nous ne pensons pas toutefois qu'on puisse à partir des résultats obtenus, juger du degré de parenté entre le premier phénomène et chacun des deux autres.

(5) Influence d'inhibiteurs de groupements SH. Un des enzymes impliqué dans la réduction de 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) en  $\text{SO}_3^{2-}$  (cf. schéma plus haut) est sensible aux réactifs de SH (bibl. 10). Si l'effecteur hypothétique du système d'entrée est formé à partir de  $\text{SO}_4^{2-}$  et s'il se situe avant la réduction de cet ion, ces réactifs devraient inhiber; s'il se forme après, on devrait s'attendre soit à une absence d'effet, soit même à une stimulation de l'entrée en fonction de la durée d'incubation avec ces inhibiteurs. YAMOMOTO ET SEGEL<sup>8</sup> utilisant cet argument pour étudier la régulation de l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  dans *Penicillium* n'observent aucun effet de *N*-éthyl maléimide sur l'absorption, bien qu'en sa présence, pratiquement tout le soufre absorbé reste sous forme de sulfate.

Nous avons effectué de nombreuses expériences avec trois réactifs de groupements SH: *N*-éthyl maléimide, acide *p*-chloromercuribenzoïque (PCMB) et acide *p*-

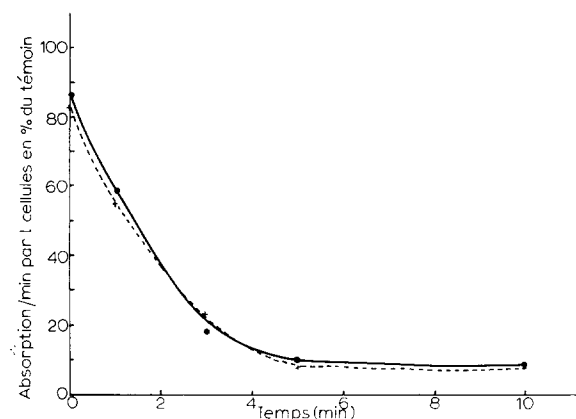


Fig. 5. Vitesses d'absorption en fonction de la durée de séjour dans une solution de *N*-éthyl maléimide (●—●, concn.  $10^{-5}$  M) ou de PCMB (+---+, concn.  $10^{-4}$  M).

TABLEAU II

INHIBITION DES VITESSES D'ENTRÉE DE  $\text{SO}_4^{2-}$  PAR *N*-ÉTHYL MALÉIMIDE OU CMPS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CET ION

Conc. en $\text{SO}_4^{2-}$ (M)	% d'inhibition	
	<i>N</i> -éthyl maléimide ( $10^{-4}$ M)	CMPS ( $3 \cdot 10^{-4}$ M)
$10^{-6}$	48,5	55,5
$3 \cdot 10^{-6}$		52
$10^{-5}$	50,1	39
$3 \cdot 10^{-5}$		38,5
$10^{-4}$	52,6	

chloromercuriphénylsulfonique (CMPS). Tous ces trois agents inhibent l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$ ; l'inhibition augmente avec la durée d'incubation avant addition du substrat marqué (Figs. 5 et 6); elle croît également avec la concentration d'inhibiteur.

En présence de *N*-éthyl maléimide, l'absorption s'arrête au bout de 1 à 3 min, même lorsque sa concentration est suffisamment faible pour ne pas sensiblement inhiber l'absorption pendant la première minute (Fig. 6a). Autrement dit, le substrat ne protège pas. Ceci est confirmé par l'étude des vitesses en fonction de la concentration de  $\text{SO}_4^{2-}$  en présence et absence de *N*-éthyl maléimide. Les pourcentages d'inhibition varient peu avec ce facteur (Tableau II). Dans certaines expériences nous observons même une augmentation.

D'autre part, avec *N*-éthyl maléimide le soufre intracellulaire soluble (marqué) reste principalement sous forme de  $\text{SO}_4^{2-}$ , bien qu'il y ait une incorporation variable selon les expériences, dans la fraction précipitable par l'acide trichloroacétique (Tableau III). Les effets de PCMB et CMPS se ressemblent mais diffèrent de ceux de

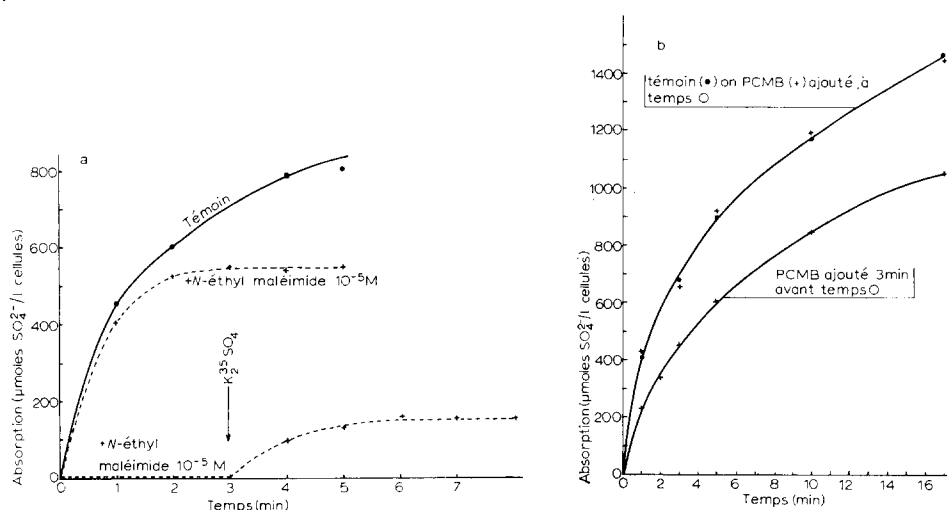


Fig. 6. a et b. Influence de *N*-éthyl maléimide (a) et de PCMB (b) sur l'absorption de  $\text{SO}_4^{2-}$  en fonction du temps.

TABLEAU III

INFLUENCE DE *N*-ÉTHYL MALÉIMIDE ET DE CMPS SUR LA RÉPARTITION DU SOUFRE ABSORBÉ DANS DIFFÉRENTES FRACTIONS CELLULAIRES

Concn.: *N*-éthyl maléimide =  $10^{-4} \text{ M}$ ; CMPS =  $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ .

Inhibiteur	Durée d'absorption (min)	Absorption ( $\mu\text{moles/min par l}$ )	% de l'absorption		
			<i>S</i> précipitable à l'acide trichloroacétique	<i>S</i> organique	$\text{SO}_4^{2-}$
—	1	325	43	2.6	54.4
	5	708	35	10.4	53.6
<i>N</i> -Ethyl maléimide	1	180	5.2	traces	94.8
	5	270	27.1	1.1	71.8
CMPS	1	260	43.25	3.25	53.5
	5	588	43.45	10.3	46.25

*N*-éthyl maléimide en deux points: (1) le substrat protège: la Fig. 6b montre que le PCMB à  $10^{-4}$  M n'a aucune action lorsqu'il est ajouté en même temps que le substrat, mais qu'il inhibe lorsque'on l'ajoute 3 min avant et le Tableau II indique que l'inhibition varie en sens inverse de la concentration; (2) en leur présence la répartition du soufre absorbé dans les différentes fractions cellulaires ne diffère pas beaucoup de celle du témoin (Tableau III). Ces résultats peuvent être interprétés de la manière suivante: le système d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  (la perméase?) contiendrait des groupes SH sensibles: PCMB et CMPS agiraient sur eux (par l'extérieur) sans pénétrer dans les cellules. Ces groupes SH sont en général protégés par leur substrat<sup>11</sup> et c'est ce qui se produit ici. *N*-éthyl maléimide, à part son action sur eux, pénétrerait dans les cellules — nous en avons des preuves puisqu'il intervient dans le métabolisme de  $\text{SO}_4^{2-}$ . L'arrêt total observé après quelques minutes serait dû essentiellement à ce dernier phénomène. SCHIFF<sup>2</sup> observe également une inhibition de l'entrée de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  dans *Chlorella* par l'iodoacétamide, un autre inhibiteur de SH, mais seulement lorsque celui-ci est ajouté avant le substrat. Lorsqu'il est ajouté après, seule varie la répartition des taches radioactives sur les chromatogrammes d'extraits acides. Notons aussi que dans le premier cas les chromatogrammes présentent seulement deux taches, dont l'une correspondrait à  $\text{SO}_4^{2-}$ .

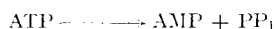
Notre interprétation favorise donc l'hypothèse selon laquelle l'effecteur du mécanisme d'entrée se situerait avant la réduction du sulfate. En ce cas, trois candidats principaux se présentent:  $\text{SO}_4^{2-}$  lui même, adénosine 5'-phosphosulfate (APS) et PAPS. Nous avons pensé que des expériences avec  $\text{CrO}_4^{2-}$  apporteraient quelques éclaircissements sur ce point.

(6) Influence de  $\text{CrO}_4^{2-}$  sur l'absorption de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Les expériences que nous allons présenter sont étayées sur les considérations suivantes.  $\text{CrO}_4^{2-}$  inhibe compétitivement l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  (bibl. 1). D'autre part, des essais préliminaires avec  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  montrent que (1) cet ion est absorbé contre un gradient de concentration; (2) les vitesses d'entrée augmentent au cours d'une préincubation dans un milieu sans soufre et (3) l'ion sulfate inhibe son absorption. Tous ces faits indiquent que ces deux ions utilisent le même système de transport (*cf.* PARDEE *et al.*<sup>12</sup>). Or,  $\text{CrO}_4^{2-}$  n'est pas métabolisé bien qu'il réagisse avec l'enzyme d'activation de  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Pour  $\text{SO}_4^{2-}$  on a:



Pour  $\text{CrO}_4^{2-}$ :



La formation d'adénosine 5'-phosphochromate (APCr) n'est pas exclue mais sa durée de vie serait très courte<sup>13</sup>. Si  $\text{SO}_4^{2-}$  est l'effecteur (cas I) il en serait de même pour  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Dans ce cas, les vitesses d'absorption au cours d'une incubation avec  $\text{CrO}_4^{2-}$  devraient progressivement atteindre des valeurs proches de 0, et s'y maintenir après éloignement de cet ion (par centrifugation et resuspension dans un milieu sans S),  $\text{CrO}_4^{2-}$  n'étant pas métabolisé. Dans le cas où PAPS (ou n'importe quel autre métabolite soufré situé au delà d'APS) serait l'agent régulateur (cas II), les vitesses ne devraient pas être influencées par la durée d'incubation dans du  $\text{CrO}_4^{2-}$ . De plus, une fois  $\text{CrO}_4^{2-}$  éloigné, les vitesses devraient revenir à leur niveau initial. Si APS est l'effecteur (cas III) il se pourrait que l'hypothétique APCr, malgré sa durée de vie très



courte, agisse, quoique faiblement (cela supposerait un voisinage étroit entre sites d'absorption et d'activation). Serait-ce ainsi, on devrait s'attendre à des résultats se trouvant mi chemin entre ceux prévus pour les cas I et II. Si APCr ne se forme pas, ou n'agit pas, les résultats seraient les mêmes que pour le cas II.

Des Chlorelles sont donc incubées dans une solution de chromate: à des temps variables quelques ml sont prélevés pour mesurer des vitesses d'absorption de  $\text{SO}_4^{2-}$ . Au bout de 15 à 30 min les Chlorelles sont centrifugées (lavées lorsque la concentration de  $\text{CrO}_4^{2-}$  est élevée) et resuspendues dans un milieu sans soufre. Par la suite on procède de temps en temps à des mesures des vitesses. Des Chlorelles traitées de la même manière mais avec  $\text{K}_2\text{SO}_4$  non marqué, au lieu de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  servent de témoins. Les tubes à essai où se font les mesures des vitesses contiennent dans ce cas  $^{35}\text{SO}_4$  un quement pour marquage.

Les résultats obtenus dans diverses expériences (l'une d'elle est représentée dans la Fig. 7) peuvent être résumés ainsi.

Les vitesses diminuent toujours en fonction de la durée d'incubation avec  $\text{CrO}_4^{2-}$ , mais cette diminution est relativement faible. Les valeurs les plus basses que nous avons obtenues ne sont jamais inférieures à 45 % de celles correspondant à l'essai avec  $\text{CrO}_4^{2-}$  à temps 0. Après resuspension dans une solution sans  $\text{SO}_4^{2-}$  les vitesses augmentent plus ou moins, mais cette augmentation est toujours inférieure à celle du témoin traité avec  $\text{K}_2\text{SO}_4$  froid.

Les résultats sont donc conformes à une des prévisions du cas III (APS effecteur). Un effet de  $\text{CrO}_4^{2-}$ , autre que celui produit par son inhibition compétitive, nous

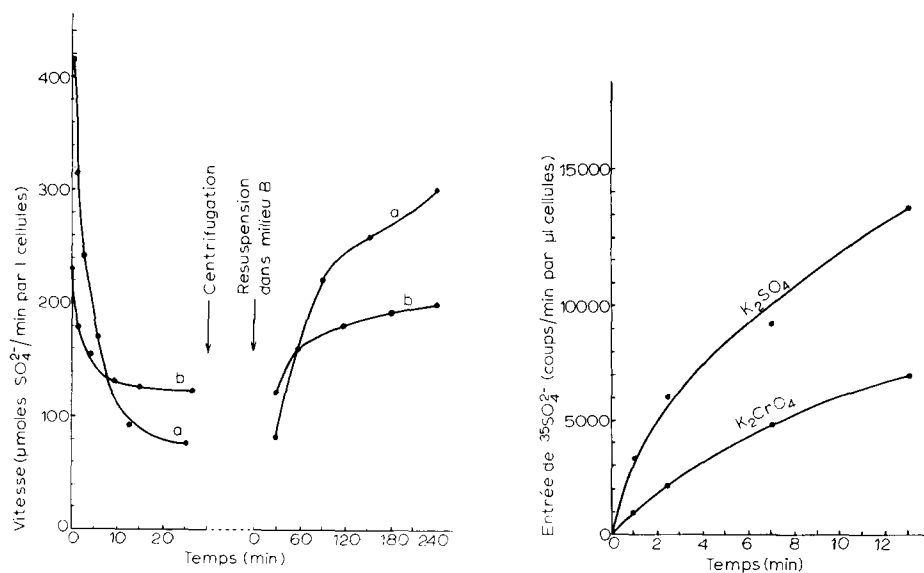


Fig. 7. Courbes à gauche. Vitesses en fonction de la durée d'incubation dans  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $2.5 \cdot 10^{-6}$  M (courbe a) et  $\text{K}_2\text{SO}_4$  froid,  $10^{-5}$  M (courbe b). Les Chlorelles avant le début de l'expérience ont été carencées en  $\text{SO}_4^{2-}$  pendant 4 h dans milieu B. Après 30 min d'incubation les Chlorelles ont été centrifugées et resuspendues dans milieu B. Les courbes à droite correspondent aux vitesses en fonction de la durée de séjour dans ce milieu.

Fig. 8. Entrée de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  en fonction du temps en présence de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ou de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Les solutions de sulfate ou de chromate ( $10^{-5}$  M) contiennent la même quantité de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ .

est suggéré par l'expérience suivante: l'entrée de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  en fonction du temps a été étudiée dans deux lots de Chlorelles. L'un a été suspendu dans une solution de  $\text{K}_2\text{SO}_4$   $10^{-5}$  M avec  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  pour marquage, l'autre dans une solution de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  à la même concentration et avec la même quantité de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ . Les résultats sont présentés dans la Fig. 8. On constate (1) que la vitesse initiale de l'absorption de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  est plus faible dans le deuxième cas, ce qui s'explique facilement: les  $K_m$  de l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  sont égaux à  $10^{-6}$  M environ, tandis que les  $K_i$  de l'inhibition par  $\text{CrO}_4^{2-}$  à  $4 \cdot 10^{-7}$  M (bibl. 1); (2) comme pour le témoin avec  $\text{K}_2\text{SO}_4$  les vitesses d'absorption en présence de  $\text{CrO}_4^{2-}$  diminuent en fonction du temps. Or, il est peu probable que la quantité tout à fait négligeable de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  qui entre dans les cellules déclenche cette diminution si le chromate n'y contribuait. S'agit-il d'APCr ou  $\text{CrO}_4^{2-}$  aurait-il des effets sur le métabolisme qui se traduiraient par une inhibition de l'absorption? Nos résultats ne permettent pas de répondre à cette question.

#### CONCLUSIONS

Les résultats obtenus dans nos expériences visant à identifier l'effecteur du mécanisme d'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  ne semblent pas incompatibles avec l'hypothèse concernant son existence. Toutefois au stade actuel de notre travail n'importe quel composé soufré présent dans les cellules peut servir de candidat. Deux éventualités ont été examinées: (1) la cystéine ou (et) la méthionine serait l'effecteur (hypothèse I); (2) ce dernier serait un composé soufré qui, sur la voie du métabolisme de  $\text{SO}_4^{2-}$ , se trouverait avant la réduction de cet ion (hypothèse II). Les résultats obtenus avec *N*-éthyl maléimide et  $\text{CrO}_4^{2-}$  sont plutôt en faveur de la deuxième hypothèse avec APS comme favori. Mais il faut nous mettre en garde contre la possibilité toujours grande que ces substances exercent des effets autres que ceux que nous leur supposons. Quant aux autres résultats qui témoignent d'un mécanisme de régulation ou semblent être en rapport avec celui-ci, on peut les accorder aussi bien avec l'une qu'avec l'autre hypothèse à condition de faire de nouvelles suppositions. Par exemple l'augmentation plus lente des vitesses à l'obscurité (dans un milieu carencé en  $\text{SO}_4^{2-}$ ) (cf. bibl. 1, Fig. 2) et les effets de la cystéine et de la méthionine peuvent être conciliés avec l'hypothèse II en supposant d'une part une réduction de  $\text{SO}_4^{2-}$  plus intense à la lumière<sup>14</sup>, et d'autre part une inhibition de ce phénomène par la cystéine et la méthionine. Des arguments parallèles peuvent être évoqués en faveur de l'hypothèse I. En définitive, nos résultats ne permettent pas de conclure.

#### REMERCIEMENTS

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

#### RÉSUMÉ

Dans un travail précédent, nous avons mis en évidence des phénomènes de régulation de l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  dans *Chlorella* qui s'accordent avec l'hypothèse selon laquelle un effecteur intracellulaire, probablement un métabolite de  $\text{SO}_4^{2-}$ , contrôlerait l'absorption. Des expériences visant à l'identifier sont rapportées ici. Nous avons

obtenu quelques indications d'après lesquelles l'effecteur serait un composé contenant du soufre non-réduit.

Cystéine et méthionine ne semblent pas reprimer le système d'absorption. Ces acides aminés inhibent toutefois l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$  mais seulement chez du matériel non carencé en cet ion. L'entrée de ce dernier est sensible à la phénylalanine, à la *p*-fluorophénylalanine et aux inhibiteurs de groupements SH: *N*-éthyl maléimide, PCMB et CMPS.

Les taux de  $\text{SO}_4^{2-}$  intracellulaire et de S organique soluble baissent au cours d'une carence en  $\text{SO}_4^{2-}$ , alors que les vitesses d'entrée augmentent. Un effet de  $\text{CrO}_4^{2-}$  (analogue de  $\text{SO}_4^{2-}$ ) sur l'entrée de  $\text{SO}_4^{2-}$ , à part celui d'une inhibition compétitive, a été démontré.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. VALLÉE ET R. JEANJEAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 150 (1968) 599.
- 2 J. A. SCHIFF, *Plant Physiol.*, 34 (1959) 80.
- 3 R. T. WEDDING ET M. K. BLACK, *Plant Physiol.*, 35 (1960) 72.
- 4 J. F. THOMSON, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 18 (1967) 59.
- 5 S. MIYACHI ET S. MIYACHI, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 479.
- 6 J. DREYFUSS, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2292.
- 7 J. DREYFUSS ET K. J. MONTY, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 3781.
- 8 L. A. YAMOMOTO ET I. H. SEGEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 114 (1966) 523.
- 9 R. J. ELLIS, *Biochem. J.*, 93 (1964) 19 P.
- 10 L. G. WILSON, T. ASAHİ ET R. S. BANDURSKI, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1822.
- 11 A. KÉPÈS, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 70.
- 12 A. B. PARDEE, L. S. PRESTIDGE, M. B. WHIPPLE ET J. DREYFUSS, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3962.
- 13 L. G. WILSON ET R. S. BANDURSKY, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 975.
- 14 T. ASAHİ, *Biochim. Biophys. Acta*, 82 (1964) 58.

*Biochim. Biophys. Acta*, 150 (1968) 607-617