

### Sur le transport de l'inositol chez *Schizosaccharomyces pombe*

La levure *Schizosaccharomyces pombe* manifeste un besoin absolu en *myo*-inositol comme facteur de croissance vitaminique. Dans certaines conditions, la croissance est optimum pour une concentration initiale du milieu de 1  $\mu\text{g/ml}$  (culture "normale"). Les cellules sont dites en hypovitaminose et en hypervitaminose lorsque les concentrations initiales sont respectivement inférieures ou supérieures à 1  $\mu\text{g/ml}$  (réf. 1).

Des cellules de *S. pombe* accumulent, essentiellement sous forme de phosphoinositides, des quantités d'inositol jusqu'à 4–5 fois supérieures à celles de cellules "normales" en phase stationnaire: il s'agit de cultures en hypervitaminose, de cultures inhibées par diverses substances agissant ou non comme antagonistes de l'inositol, et de jeunes cultures de 15–21 h en phase logarithmique. En présence d'un antagoniste compétitif, le 2-*C*-méthyl-*myo*-inositol ou isomytilitol, on observe, à côté de quantités normales de phosphoinositides, une teneur importante en phospholipides à isomytilitol. D'une manière générale, la teneur des cellules en cyclitol est plus grande lorsque leur nombre est plus petit<sup>1</sup>.

L'eau intracellulaire de cellules fraîches a été dosée après équilibre en présence d'eau tritiée et de [<sup>14</sup>C]inuline de poids moléculaire 5000–5500. La répartition des radioactivités montre qu'une quantité de cellules fraîches correspondant à 1 mg sec contient 1.61  $\mu\text{l}$  d'eau intracellulaire.

L'entrée de l'inositol dans les cellules (Tableau I) comporte un pH optimum net d'environ 5.0 auquel nous avons travaillé systématiquement. Na<sup>+</sup> est sans effet, contrairement aux observations faites sur le tissu rénal<sup>2,3</sup> et les cellules d'ascite d'Ehrlich<sup>4</sup>.

TABLEAU I

INCORPORATION DE L'INOSITOL DANS DES CELLULES DE *S. pombe*

Les cellules de cultures "normales" de 40–44 h sont conservées à 0° dans un tampon acétate 0.1 M de pH 5.0 contenant du dithiothréitol 0.1 mM et 0.2 % de glucose; dans ces conditions, les propriétés de transport demeurent inaltérées durant plus de 2 h. Pour les expériences, les cellules sont agitées à 29–30° avec 160 fois leur poids sec de tampon Tris-maléate 0.2 M de pH 5.0 contenant par ml 10  $\mu\text{g}$  de [<sup>14</sup>C<sub>6</sub>]inositol et, dans certains cas, 10 mg de glucose. Au bout de temps donnés, on filtre sur Millipore et lave avec NaCl à 0.9 % (durée totale inférieure à 1 min). La radioactivité dans les cellules et dans le milieu est mesurée par scintillation liquide (milieu de Bray avec 3 % de Cab-O-Sil; appareil Packard Tri-Carb 3002).

| Durées<br>d'incorporation<br>(min) | Inositol incorporé ( $\mu\text{g/mg sec}$ ) |                            | Inositol résiduel<br>dans le milieu (%) <sup>*</sup><br>(lors de l'incorporation<br>en présence de glucose) |
|------------------------------------|---|----------------------------|---|
|                                    | En présence<br>de glucose                   | En l'absence<br>de glucose |   |
| 1                                  | 0.06  | 0.00                       | 96  |
| 3                                  | 0.16  | 0.00                       | 89.5  |
| 5                                  | 0.25  | 0.01                       | 84  |
| 10                                 | 0.55  | 0.05                       | 66  |
| 15                                 | 0.94  | —                          | 39  |
| 30                                 | 1.10  | 0.10                       | 28.5  |
| 60                                 | 1.62  | —                          | 0.0   |

<sup>\*</sup> Rapporté à la radioactivité totale.

Une partie de l'inositol radioactif entré est expulsé lorsque les cellules sont agitées en présence d'un nouveau milieu contenant de l'inositol non marqué. L'inositol expulsé représente probablement le cyclitol resté libre\*. Sa proportion diminue considérablement avec la durée d'incorporation: au bout de 30 min, l'inositol non déplaçable, qui est sans doute combiné dans des phosphoinositides, atteint 90 % de l'inositol incorporé\*\*.

Des cellules d'un poids sec de 1 mg ont un volume d'eau intracellulaire de 1.61  $\mu$ l. L'inositol incorporé par ces cellules durant 5 min est de 0.25  $\mu$ g (Tableaux I et II); sa concentration est donc de 0.155  $\mu$ g/ $\mu$ l. Comme 40 % de cet inositol sont échangeables, la concentration interne de cyclitol libre est de 0.06  $\mu$ g/ $\mu$ l alors que la concentration externe est de 0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l: le cyclitol est donc incorporé contre un gradient de concentration, ce qui explique qu'une source d'énergie telle que le glucose favorise l'entrée (Tableau I). La présence d'agents découplant l'oxydation phosphorylante ou d'inhibiteurs de la respiration entrave l'incorporation. Voici, entre parenthèses, les diminutions d'incorporation produites: KCN 10 mM (67.5 %);  $\text{NaN}_3$  2 mM (80 %), 10 mM (100 %); 2,4-dinitrophénol 2 mM (17.5 %), 0.1 M (67.5 %). Par contre, un inhibiteur antagoniste de l'inositol<sup>1</sup>, l'oxyde de 2-C-méthylène-*myo*-inositol, est sans effet à une concentration 1.0 mM qui produit en culture une inhibition de croissance de 100 %.

TABLEAU II

ÉTUDE EN FONCTION DU TEMPS DE L'EFFLUX DE L'INOSITOL

Après incorporation de [ $^{14}\text{C}$ ]inositol, les cellules filtrées sur Millipore sont agitées à 29–30° avec 160 fois leur poids sec de tampon Tris-maléate 0.2 M de pH 5.0 contenant par ml 10 mg de glucose et 10  $\mu$ g d'inositol non marqué.

| Incorporation de 5 min   |                                    | Incorporation de durées variables |   |
|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---|
| Durées de l'efflux (min) | Efflux (%) de l'inositol incorporé | Durées d'incorporation (min)      | Efflux après 30 min (%) de l'inositol incorporé |
| 5                        | 13                                 | 1                                 | 62  |
| 10                       | 20                                 | 5                                 | 40  |
| 15                       | 28                                 | 10                                | 26  |
| 20                       | 35                                 | 30                                | 9.5   |
| 30                       | 39                                 | 60                                | 0.0   |

L'efflux nécessite la présence d'inositol dans le milieu externe (Tableau III). Il s'agit probablement d'un exemple de diffusion d'échange ("exchange diffusion") impliquant un remplacement de l'inositol radioactif interne par l'inositol externe non marqué. La présence de glucose dans le milieu est défavorable à l'efflux qui est considérablement augmenté par introduction additionnelle de 2,4-dinitrophénol. La présence d'une source d'énergie favorise probablement la synthèse des phosphoinositides, ce qui diminue la concentration en inositol libre échangeable. On peut calculer (Tableaux I et II) qu'après une incorporation de 5–30 min, la teneur, par mg

\* Des cellules "normales" en phase stationnaire ne contiennent qu'une quantité négligeable d'inositol libre.

\*\* L'expulsion complète de l'inositol libre exige une durée d'efflux minimale de 30 min (Tableau II).

TABLEAU III

EFFETS DE L'INOSITOL EXTERNE ET DE SOURCES D'ENERGIE SUR L'EFFLUX

Durée de l'incorporation préalable du [ $^{14}\text{C}$ ]inositol: 6 min. Milieu d'efflux: tampon Tris-maléate sodique 0.2 M de pH 5.0 contenant éventuellement, par ml, 10 mg de glucose, 10  $\mu\text{g}$  d'inositol non marqué et 184  $\mu\text{g}$  de 2,4-dinitrophénol. Les cellules sont agitées 30 min à 29–30°C avec 160 fois leur poids sec de tampon.

| Milieu d'efflux       | Efflux (%)<br>de l'inositol<br>incorporé | Milieu d'efflux                               | Efflux (%)<br>de l'inositol<br>incorporé |
|-----------------------|--|---|--|
| – Glucose, – inositol | 5  | + Glucose, – inositol                         | 45                                       |
| + Glucose, – inositol | 0  | – Glucose, + inositol                         | 72                                       |
|                       |  | + Glucose, + inositol,<br>+ 2,4-dinitrophénol | 86                                       |

de cellules sèches, en inositol échangeable reste entre 0.10 et 0.14  $\mu\text{g}$ ; il s'établirait ainsi un équilibre impliquant une vitesse apparente d'entrée approximativement égale à la vitesse de fixation dans les phosphoinositides.

L'entrée de l'inositol obéit à la cinétique de Michaelis–Menten. Par la méthode de Lineweaver et Burk, on a trouvé un  $K_m$  apparent de  $0.26 \pm 0.04$  mM (8)\* et un  $v_{\max}^{**}$  (nmoles/min par mg sec) de  $0.60 \pm 0.08$  (4)\*. Des cellules en divers états vitaminiques conservent le  $K_m$  indiqué, par contre le  $v_{\max}$  en nmoles/min par mg sec varie (la concentration initiale en inositol du milieu de culture est indiquée, entre parenthèses, en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ): hypervitaminose (5.0) 0.09; "normale" (1.0) 0.55; hypovitaminose (0.5) 0.71. Les teneurs en phosphoinositides de ces cellules diminuent dans le même ordre<sup>1</sup>; en d'autres termes, l'entrée est d'autant plus rapide que la teneur en phosphoinositides est plus faible. Ces phospholipides qui sont des composants de membranes règlent peut-être, par un mécanisme encore inconnu, l'entrée de l'inositol.

On constate au moyen de [ $^{14}\text{C}$ ]isomytilitol que l'entrée de ce dernier obéit elle aussi à la cinétique de Michaelis–Menten. Le  $K_m$  apparent est de  $0.41 \pm 0.1$  mM et le  $v_{\max}$  en nmoles/min par mg sec est de  $0.73 \pm 0.03$ ; ces  $K_m$  et  $v_{\max}$  sont très proches de ceux de l'inositol. La représentation graphique de Lineweaver et Burk montre que l'entrée de l'inositol est inhibée compétitivement par l'isomytilitol. Le  $K_i$  de  $0.36 \pm 0.06$  mM (3)\* est égal au  $K_m$  d'entrée de l'isomytilitol. Il devient ainsi probable que l'inositol et l'isomytilitol se fixent sur le même site du transporteur.

Nous remercions vivement le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique de son appui.

Laboratoire de Chimie biologique  
et organique spéciale,  
Université de Genève (Suisse)

J. P. CHENEVAL  
J. DESHUSSES  
T. POSTERNAK

- 1 J. DESHUSSES, J. P. CHENEVAL ET T. POSTERNAK, *Biochim. Biophys. Acta*, 176 (1969) 789.
- 2 G. HAUSER, *Biochim. Biophys. Acta*, 173 (1969) 257.
- 3 G. HAUSER, *Biochim. Biophys. Acta*, 173 (1969) 267.
- 4 R. M. JOHNSTONE ET C. P. SUNG, *Biochim. Biophys. Acta*, 135 (1967) 1052.

Reçu le 23 janvier 1970

\* Moyenne + erreur type (nombre d'expériences); cellules "normales".

\*\* Par vieillissement les cellules conservent leur  $K_m$ , mais leur  $v_{\max}$  s'abaisse.