Étude de quelques inhibiteurs de croissance de Schizosaccharomyces pombe Lindner

Autor(en): **Schopfer, William H. / Deshusses, Jacques / Wustenfeld, Daisy**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences [1948-1980]**

Band (Jahr): **22 (1969)**

Heft 3

PDF erstellt am: **28.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-739161

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

ÉTUDE DE QUELQUES INHIBITEURS DE CROISSANCE DE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE LINDNER *

PAR

† William H. SCHOPFER, Jacques DESHUSSES, Daisy WUSTENFELD et Théodore POSTERNAK

SUMMARY

Studies of some growth inhibitors of Schizosaccharomyces pombe Lindner. The growth of *Schizosaccharomyces pombe* Lindner strain liquefaciens Osterwalder CBS, was found to be inhibited by 16 out of 21 new substances examined. In 13 of these, the inhibition was accompanied by modifications of the cell morphology. It was possible to distinguish two basic effects: *a)* elongation without nuclear division (« MO » type); *b)* formation of 2-3 mononuclear compartments due to the presence of 1-2 transverse walls (type « IM »). Azaguanine and β-propionolactone give rise to a morphology of the type « MO »; a superposition of the two basic effects is shown by other inhibitors, i.e. the presence of elongated compartments.

2 (4)-C-methylene-*epi*-inositol oxide (EO) at high doses inhibits growth and at the same time produces elongation of the « MO » type. This effect is prevented, not by *epi*-inositol, but by *myo*-inositol.

The action of five inhibitor couples has been studied. A slight deinhibition is produced by suitable proportions of penicillin and azaguanine. Isomytilitol treatment together with either penicillin or azaguanine produces an « IM » type morphology.

The dehinbition of cultures treated by 5-fluoro-uracil is accomplished in diminishing order of effectiveness by uracil, uridylic acid, thymine and uridine; thymidine is nearly inactive. In the case of inhibition by azaguanine, almost complete deinhibition by guanine only takes place when the inhibitor dose is lower than 0.1-0.2 μg/ml; guanylic acid is a less efficient deinhibitor, but its effect is nevertheless greater than that of guanosine.

Certain biochemical aspects of these inhibitions have been discussed.

RÉSUMÉ

Sur vingt et une nouvelles substances étudiées, seize ont exercé une forte action inhibitrice de croissance sur *Schizosaccharomyces pombe* Lindner, race liquefaciens Osterwalder CBS. Dans treize cas, l'inhibition s'accompagne de modifications de la morphologie cellulaire. On peut dis-

* Abréviations: MI, *myo*- ou *méso*-inositol; MO, oxyde de 2-C-méthylène-*myo*-inositol ou *méso*-oxyde; EO, oxyde de 2 (4)-C-méthylène-*épi*-inositol ou *épi*-oxyde; IM, 2-C-méthyl-*myo*-inositol ou isomytilitol; Azg, 8-azaguanine; 5-FU, 5-fluoro-uracile; β-Ppl, β-propionolactone; 2,4-DNP, 2,4-dinitro-phénol; Ac.IA, acide indolyl-acétique; Pcl, pénicilline; AcC, actinomycine C; U.I., unité internationale; GMP, acide guanylique; UMP, acide uridylique.

tinguer deux effets fondamentaux: *a)* élongation sans division nucléaire (type « MO »); *b)* formation de 2-3 compartiments uninucléés résultant de la présence de 1-2 parois transversales (type « IM »). L'azaguanine et la β-propionolactone produisent une morphologie du type « MO »; d'autres inhibiteurs provoquent une superposition des deux types: présence de compartiments allongés.

L'oxyde de 2 (4)-C-méthylène-épi-inositol (EO) produit à forte dose une inhibition accompagnée d'une élongation du type « MO »; son action est supprimée non par l'épi-inositol, mais par le myo-inositol.

L'étude de l'action de cinq couples d'inhibiteurs a été effectuée. Il se produit une légère désinhibition par des proportions convenables de pénicilline et d'azaguanine. Une association de l'isomytilitol avec la pénicilline ou l'azaguanine provoque l'apparition de la morphologie « IM ».

La désinhibition de cultures traitées par le 5-fluoro-uracile est effectuée, par ordre d'action décroissante, au moyen de l'uracile, de l'acide uridylique, de la thymine et de l'uridine; la thymidine est presque inactive. Dans le cas d'inhibition par l'azaguanine, une désinhibition presque complète par la guanine n'a lieu que lorsque la dose d'inhibiteur est inférieure à 0,1-0,2 μg/ml; l'acide guanylique est un désinhibiteur moins efficace, mais son action est supérieure à celle de la guanosine.

Certains aspects biochimiques de ces inhibitions ont été discutés.

INTRODUCTION

Un mémoire antérieur (SCHOPFER, POSTERNAK et WUSTENFELD, 1962) avait trait au rôle du *méso*-inositol ou *myo*-inositol (MI) (I) dans la biologie de *Schizosaccharomyces pombe* Lindner. On sait que cette levure se multiplie non par bourgeonnement, mais par fission transversale. Le MI représente pour elle un facteur de croissance essentiel. Deux substances, le 2-C-méthyl-*myo*-inositol ou isomytilitol (IM) (II) et l'oxyde de 2-C-méthylène-*myo*-inositol ou *méso*-oxyde (MO) (III) agissent sur ce micro-organisme comme des inhibiteurs de croissance compétitifs de l'inositol. Leur action s'accompagne de modifications morphologiques remarquables étudiées en détail par SCHOPFER, POSTERNAK et WUSTENFELD (1962). Rappelons que sous l'action de MO, il se produit un allongement cellulaire considérable sans division du noyau. L'effet de IM se traduit par contre par la formation d'une, ou plus fréquemment de deux parois transversales; il en résulte ainsi deux ou trois compartiments enflés contenant chacun un noyau: l'inhibiteur empêche ici la séparation des cellules filles sans entraver la division cellulaire.

Dans d'autres mémoires (DESHUSSES, CHENEVAL et POSTERNAK, 1969; DESHUSSES, BERTHOUD et POSTERNAK, 1969; PARANJAPYE, DESHUSSES et POSTERNAK, 1969), nous avons décrit des aspects biochimiques de l'action de ces substances: composition des lipides et des parois, respirations cellulaires. Nous avons examiné également à cet égard des cellules cultivées en présence de quantités suboptimales (hypovitaminose) et superoptimales (hypervitaminose) d'inositol et enfin des cellules soumises à l'action d'autres substances inhibitrices dont l'effet n'est pas supprimé par des quantités supplémentaires de MI. L'action de ces autres inhibiteurs s'accompagne ici encore de modifications morphologiques. Le présent mémoire est consacré à une étude de caractère plus biologique de ces effets.

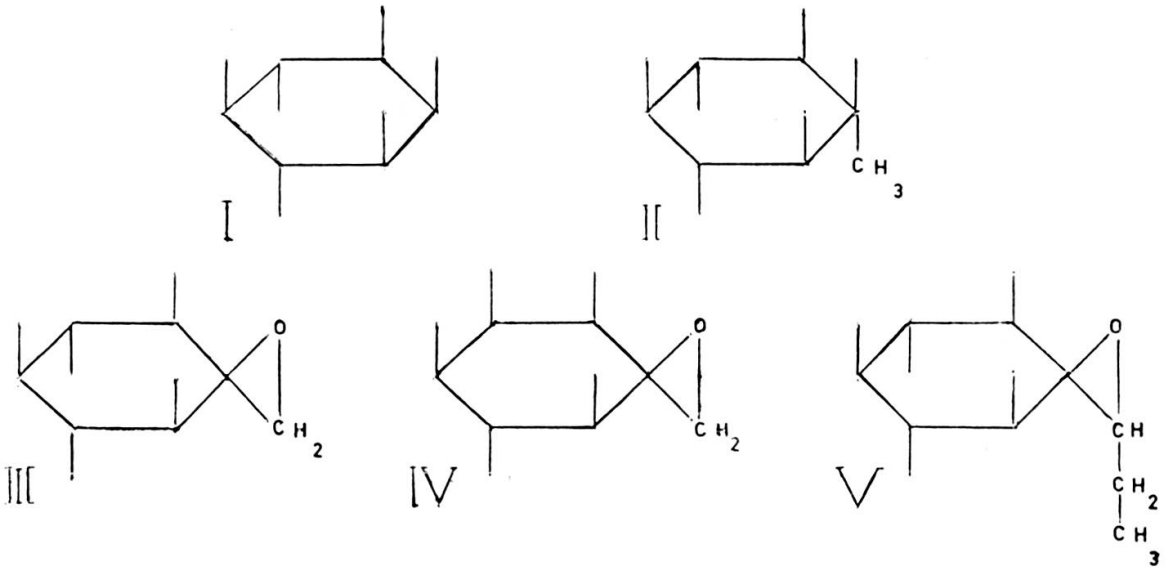

FIG. 1. — Formules stéréochimiques du *myo*- ou *méso*-inositol I, de l'isomytilitol II, du *méso*-oxyde III, de l'*épi*-oxyde IV et de l'oxyde de 2-C-propylidène-*myo*-inositol V. Les traits verticaux avec extrémités libres indiquent l'orientation des groupes OH; les atomes H fixés au carbone ont été supprimés.

MÉTHODES

CULTURES DES MICRO-ORGANISMES

La levure *Schizosaccharomyces pombe*, souche Lindner, race liquefaciens Osterwalder CBS a été cultivée à 29° sur le milieu de Pennington dans les conditions décrites par SCHOPFER, POSTERNAK et WUSTENFELD (1962) et par PARANJAPYE, DESHUSSES et POSTERNAK (1964). Les cultures ont été effectuées généralement dans des fioles coniques en verre d'Iéna contenant 10 ml de milieu, sans agitation, sauf spécification contraire. Les croissances sont comparées à celles de « cultures normales » sur le milieu standard contenant 1 μg MI/ml. Les solutions de Pénicilline G (Specia) et d'Actinomycine C (Sanamycine Bayer) ont été obtenues à partir des flacons commerciaux par dilution avec de l'eau stérile. Les solutions des inhibiteurs thermosensibles ont été stérilisées par filtration sur filtre Millipore ou Jéna G5. L'oxyde d'éthylène et la β-propionolactone ont été dissous directement dans de l'eau stérile. Ces solutions stériles ont été ajoutées au milieu de culture autoclavé préalablement 15 minutes à 115° et refroidi. Dans le cas du γ-hexachlorocyclohexane, la substance était ajoutée en solution alcoolique; la concentration maximum était limitée par la faible solubilité dans l'eau à 10 μg/ml. Le chloramphénicol était introduit directement à l'état solide dans le milieu de culture stérilisé; ici encore, la concentration maximum est limitée par la faible solubilité du produit dans l'eau. Le volume final était toujours de 10 ml et les concentrations finales des composants autres que les inhibiteurs étaient identiques à celles des cultures normales.

Dans tous les essais, les inhibiteurs et les substances déshinbitrices sont ajoutés au début de la culture, lors de l'inoculation. Dans le cas de la β-propionolactone, il a fallu parfois procéder différemment (voir « DISCUSSION »).

MESURES DU DÉVELOPPEMENT

Les mesures de croissance ont été effectuées généralement par turbidimétrie au moyen du photomètre Klett-Summerson muni du filtre n° 54. Cette méthode a été contrôlée avec des cellules de cultures de *S. pombe* normales, ou encore avec des cellules de cultures anormales traitées par IM

ou MO, ou contenant soit des quantités de MI initiales inférieures à 1 μg/ml (hypovitaminose), soit des quantités initiales supérieures à 1 μg/ml (hypervitaminose). Malgré les modifications morphologiques profondes qui se produisent dans certaines cultures anormales, les densités optiques observées étaient approximativement proportionnelles au poids des cellules sèches. Dans ces conditions, il est évident que les croissances indiquées expriment non pas des nombres de cellules dans les cultures, mais des poids globaux de cellules.

Mesures des inhibitions

Comme dans nos études précédentes, nous avons déterminé le taux d'inhibition, c'est-à-dire la concentration en inhibiteur nécessaire pour réduire la croissance de 50% par rapport à des cultures non inhibées contenant 1 μg MI/ml. Quand l'inhibiteur agit comme antagoniste d'un facteur de croissance du milieu, on peut établir l'indice d'inhibition, c'est-à-dire le rapport mol. inhibiteur/facteur produisant une inhibition de 50%. La désinhibition s'effectue par introduction dans le milieu, à côté de l'inhibiteur dont la concentration reste constante, d'un taux croissant de facteur; l'obtention d'un développement correspondant à 50% de celui d'une culture normale exige une concentration en facteur qui est le taux de désinhibition; le rapport mol. des concentrations inhibiteur/facteur représente alors l'indice de désinhibition.

RÉSULTATS

Effets de l'agitation

Dans certains cas, nous avons étudié comparativement les croissances dans des fioles coniques agitées et non agitées. En hypovitaminose, au bout de 12 heures, on observe pour des cultures contenant de 0,1 à 0,3 μg de MI par ml une inhibition de 15% plus forte dans les cultures agitées; cette différence disparaît au bout de 24 heures. Dans le cas de cultures « normales » l'agitation est par contre sans effet. En présence de IM, les inhibitions sont constamment plus fortes dans les cultures agitées que dans les cultures non agitées. C'est par contre l'inverse qui se produit en présence de MO (tableau 1). On voit que l'aération plus poussée due à l'agitation peut avoir des effets divers. Toutefois, en aucun cas on n'observe de différences nettes de morphologie cellulaire entre les cultures agitées et non agitées.

Action d'analogues de MO

Schopfer, Posternak et Wustenfeld (1962) avaient indiqué l'inhibition produite par un stéréoisomère de MO, l'oxyde de 2 (4)-C-méthylène-*épi*-inositol ou *épi*-oxyde (EO) (IV). Cette substance avait été examinée sous forme racémique et sous forme dextrogyre avec des résultats analogues. L'étude a été reprise au moyen de la forme racémique. En confirmation des résultats antérieurs, on constate que le taux d'inhibition est considérablement plus élevé qu'avec MO: alors que ce taux est de 70 μg/ml dans le cas de MO, les inhibitions sont respectivement de 60% et de 78% à des concentrations en EO de 1,0 mg/ml et de 1,5 mg/ml. Même à des inhibitions inférieures, on constate, sous l'effet de EO, un allongement cellulaire moyen considérable.

TABLEAU 1. — *Effet de l'agitation sur les inhibitions*

Inhibiteur en µg/ml	Inhibitions en %			
	Cultures non agitées		Cultures agitées	
	24 h	44 h	24 h	44 h
Méso-oxyde				
0	0	0	0	0
60	60,0	50,8	53,3	40,2
68	69,6	55,8	61,9	50,4
76	67,4	60,7	66,4	60,2
84	75,3	69,4	74,7	63,3
Isomytilitol				
0	0	0	0	0
18	55,5	39,3	63,9	51,5
22	62,1	46,8	68,1	56,6
26	57,4	55,3	73,5	67,2
30	67,4	55,8	80,9	71,1

EO est préparé à partir de l'*épi*-inosose (POSTERNAK et FALBRIARD, 1960) qui s'obtient par oxydation nitrique de MI; il n'est pas exclu que, lors de cette oxydation, il ne se forme comme produit accessoire du *méso*-inosose qui donnerait ensuite naissance à du MO. Si ce dernier était présent comme impureté à raison d'environ 8 %, il pourrait produire l'inhibition observée avec les préparations de EO. Un échantillon d'épi-inosose utilisé pour la synthèse de EO, a été examiné par chromatographie en phase gazeuse; sa teneur en *méso*-inosose est au plus de 0,17 %. Une contamination par MO n'explique donc pas l'action de cette préparation de EO qui est bien due à la substance elle-même et non à une impureté.

Des essais de déshinbition de EO par MI ont été effectués. La figure 2 indique les résultats obtenus. On voit que EO agit comme un inhibiteur compétitif de MI. Il faut noter que tous les essais de désinhibition par l'*épi*-inositol ont été négatifs.

Un homologue de MO, l'oxyde de 2-C-propylidène-*myo*-inositol (V) n'a pas produit d'inhibition de croissance jusqu'à une concentration de 0,5 mg/ml. On constate toutefois un certain allongement cellulaire.

Action d'inhibiteurs non compétitifs de l'inositol

Dans le tableau 2 sont indiqués divers inhibiteurs de croissance. Leur effet, à l'exception de celui de IM et de MO, n'est pas supprimé par des quantités supplémentaires d'inositol. Dans le cas du chloramphénicol, le taux d'inhibition indiqué n'est qu'apparent, car (voir « Méthodes ») une partie de la substance n'est sans doute

pas en solution. Dans le même tableau figurent également les types morphologiques cellulaires observés. Les figures 3 et 4 indiquent les formes obtenues sous l'action respectivement de la pénicilline et de l'azaguanine.

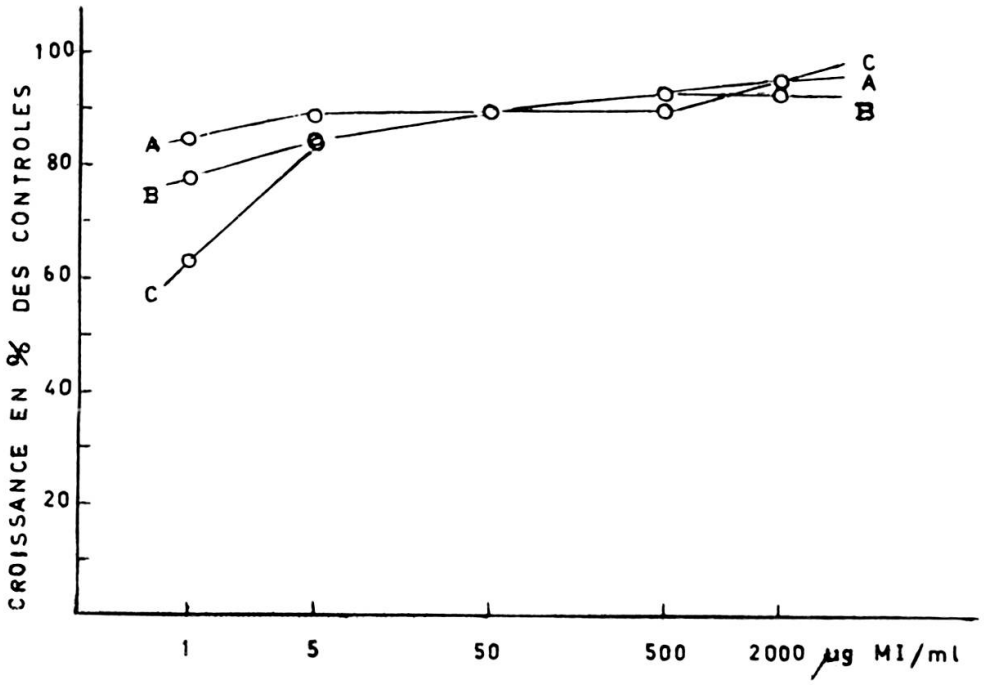

FIG. 2. — Courbes de désinhibition par l'inositol (MI) de cultures inhibées par différentes concentrations en *épi*-oxyde (EO); en µg EO/ml: A 500, B 700, C 1000.

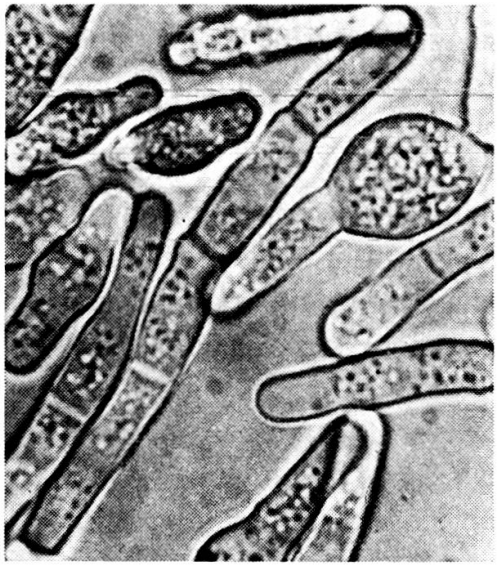

FIG. 3. — Cellules « à pénicilline » vivantes (40.000 U.I./ml et 48 h de culture). 2000 ×.

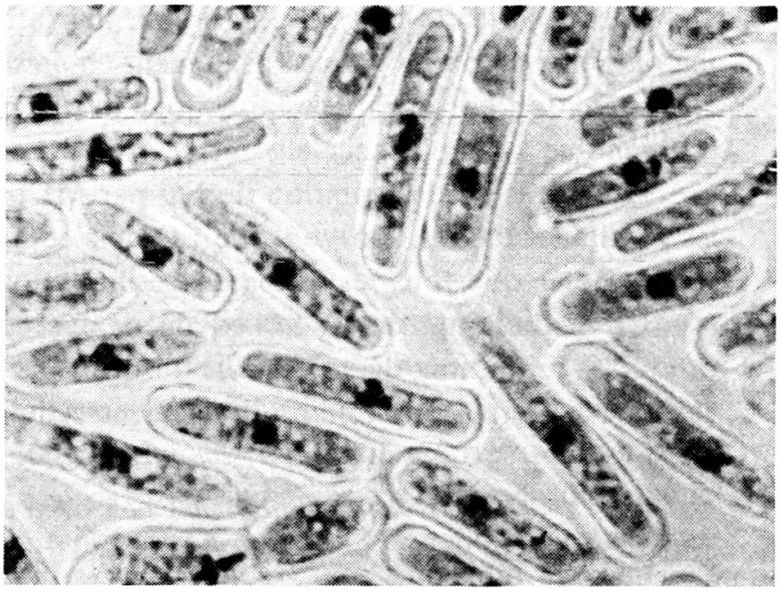

FIG. 4. — Cellules « à azaguanine » (0,6 µg/ml et 48 h de culture). Frottis, Giemsa, 3000 ×.

TABLEAU 2. — *Action de diverses substances inhibitrices sur S. pombe*

Inhibiteurs	Durée des cultures en h	Taux d'inhibition en µg/ml ou en U.I./ml	Types morphologiques cellulaires pour des inhibitions d'environ 50% Cellules:
Isomytilitol (IM)	44	24	Deux-trois compartiments enflés et mononucléés (type IM)
Méso-oxyde . .	44	60-70	Allongées mononucléées (type MO)
β-Ppl	24	145	Allongées (type MO)
	44	72	Id.
Azaguanine . .	44	0,37	Allongées (type MO)
5-FU	44	0,28	Allongées avec étranglements; parfois deux-trois compartiments
Actinomycine C	44	6,5	Deux-trois compartiments allongés, parfois enflés
Pénicilline G . .	44	23.000 U.I.	Deux-quatre compartiments allongés, parfois en forme de citron
2,4-DNP . . .	44	25	Normales
Ac. IA	44	400	Normales fortement agglomérées
Na_2SeO_3 . . .	44	800	Normales
$NH_2OH . HCl$.	44	140	Généralement à deux compartiments allongés
$NaNO_2$	44	125	Id.
As_2O_3	44	35	Deux-trois compartiments allongés
KCN	44	35	Deux-trois compartiments allongés, parfois enflés
Chloramphénicol	24	5.000	Allongées; parfois deux-trois compartiments
	44	6.500	Id.

TABLEAU 3. — *Action de nouvelles substances inhibitrices sur S. pombe*

Inhibiteurs	Durée des cultures en h	Concentrations des inhibiteurs en µg/ml	Inhibitions observées en %	Types morphologiques cellulaires
NaN_3	44	10	91	Cellules à deux-trois compartiments moyennement allongés, parfois enflés
Oxyde d'éthylène . . .	24	1000	71	Cellules allongées et irrégulièrement déformées avec parfois deux-trois compartiments
	44	1000	36	
γ-Hexachlorocyclohexane	24	10	45	Cellules légèrement allongées, parfois compartimentées
	44	10	2	

Le tableau 3 indique quelques autres inhibiteurs pour lesquels le taux d'inhibition n'a pas été déterminé. Dans le cas du γ-hexachlorocyclohexane, on n'a pu opérer, vu la faible solubilité de la substance, à des concentrations supérieures à 10 μg/ml.

Actions d'aza-dérivés de bases puriques et pyrimidiques

Les cultures ont été effectuées sur le milieu habituel contenant 1 μg MI/ml. Le tableau 4 indique les inhibitions obtenues au moyen de trois aza-dérivés puriques et de deux aza-dérivés pyrimidiques, en fonction de leurs concentrations.

TABLEAU 4. — *Inhibitions (en %) causées par divers aza-dérivés (sauf indications contraires, cultures de 44 h)*

Inhibiteurs	Concentrations des inhibiteurs en μg/ml				
	1	5	10	50	100
8-azaguanine	77,1	82,5	95,5	95,5	94,0
1,3-diméthyl-8-azaxanthine	6,0	6,0	8,3	9,8	8,3
6-azathymine	0	2,4	0	0	0
6-aza-uracile	1,6	4,0	5,7	8,0	10,5
8-aza-adénine (20 h) . . .	7,7	26,3	33,5	38,5	—
(44 h) . . .	—	—	3,2	4,5	—

On voit (tableau 4) que de tous les aza-dérivés examinés, seule l'azaguanine exerce un fort effet inhibiteur, même à des concentrations extrêmement faibles: son taux d'inhibition n'est que de 0,35 μg/ml.

Nous avons déjà indiqué (tab. 2 et fig. 4) l'élongation des cellules traitées par l'azaguanine. En ce qui concerne les autres aza-dérivés, on observe, aux concentrations indiquées, une morphologie cellulaire normale avec l'azaxanthine, la 1,3-diméthyl-azaxanthine, l'aza-adénine et l'azathymine. Dans le cas de l'aza-uracile, la morphologie est normale à des concentrations inférieures à 50 μg/ml; à 100 μg/ml, on observe une agglomération de cellules de forme normale; il se produit rarement des colonies du type isomytilitol.

Action combinée de deux inhibiteurs

L'étude de cette action combinée a été effectuée par des expériences « en damiers ». La concentration d'un des inhibiteurs étant maintenue constante, on effectue des essais avec des concentrations croissantes de l'autre inhibiteur.

Sans entrer dans des détails, indiquons que dans le cas des combinaisons d'inhibiteurs 2), 3), 4) et 5), on n'observe pas de synergisme d'action. D'autre part, après traitement simultané par deux inhibiteurs, l'effet observé est supérieur à celui de

chacune des substances agissant isolément; par contre, cet effet est toujours inférieur à la somme des deux inhibitions individuelles.

TABLEAU 5. — *Action combinée de deux inhibiteurs*

Inhibiteurs (avec domaines de concentration utilisés en μg/ml ou en U.I./ml)	Types morphologiques cellulaires
1. Pcl (0-60.000 U.I.) + Azg (0-2 μg) . .	Cellules allongées, parfois compartimentées
2. IM (0-100 μg) + Azg (0-2 μg)	Cellules compartimentées (type IM)
3. IM (0-20 μg) + Pcl (0-20 000 U.I.) . .	Id.
4. MO (0-200 μg) + Azg (0-2 μg) . . .	Cellules allongées (type MO)
5. Pcl (0-60 000 U.I.) + MO (0-200 μg) .	Id.

Dans le cas de la combinaison 1) (pénicilline+azaguanine) on observe dans certaines conditions une désinhibition nette. La concentration en azaguanine de 0,4 μg/ml est maintenue constante; elle correspond en l'absence de pénicilline à une inhibition de 47,7%. L'addition de quantités croissantes d'antibiotique produit pour commencer une désinhibition qui passe par un maximum (31,4% d'inhibition) lorsque la concentration en pénicilline est de 10.000 U.I./ml. Une désinhibition légère se produit en outre lorsqu'une culture contenant 10.000-12.000 U.I./ml est additionnée de 0,2 μg Azg/ml (tabl. 6 et fig. 5). La figure 6 indique la morphologie obtenue sous l'action simultanée de l'isomytilitol et de la pénicilline: cellules du type « IM ».

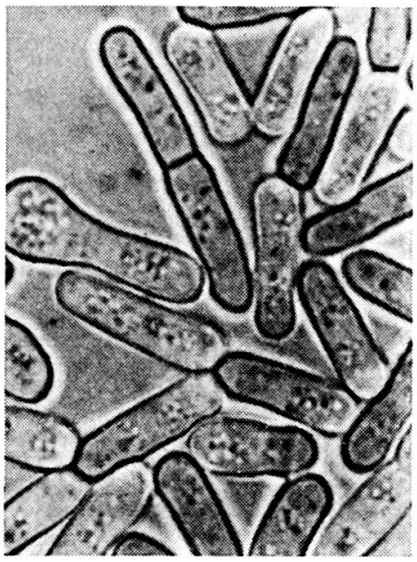

FIG. 5. — Cellules vivantes traitées simultanément par l'azaguanine (0,6 μg/ml. et par la pénicilline (10.000 U.I./ml). 48 h de culture. 2000 ×.

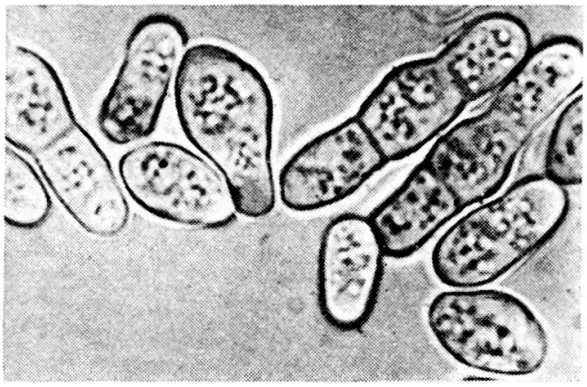

FIG. 6. — Cellules vivantes traitées simultanément par l'isomytilitol (8 μg/ml) et par la pénicilline (4000 U.I./ml). 48 h de culture. 2000 ×.

TABLEAU 6. — *Inhibitions en % sous l'action simultanée de la pénicilline et de la 8-azaguanine (cultures de 48 h)*

Pénicilline en U.I./ml	Azaguanine en µg/ml 0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	2,0
0 . . .	0	18,0	47,7	73,1	82,8	95,3	97,7
2.000 . . .	6,3	21,8	41,5	73,1	80,9	87,1	90,7
4.000 . . .	13,4	20,4	33,6	66,4	82,1	84,2	91,0
6.000 . . .	19,5	23,5	36,4	65,2	80,5	85,2	91,4
8.000 . . .	23,5	24,4	32,1	60,2	80,9	85,9	91,8
10.000 . . .	29,6	26,6	31,4	56,4	80,1	87,5	92,6
12.000 . . .	32,9	30,5	36,8	60,2	86,8	90,2	94,5
14.000 . . .	37,5	39,2	40,4	60,2	84,4	90,7	94,5
16.000 . . .	39,2	40,6	41,5	55,5	81,3	90,0	93,9
18.000 . . .	46,2	41,5	44,5	53,5	78,9	90,5	94,6
20.000 . . .	49,9	47,7	50,0	57,1	80,9	91,0	95,6
25 000 . . .	56,4	55,5	57,9	66,8	85,8	93,4	97,0

Désinhibitions de cultures inhibées par le fluoro-uracile et l'azaguanine

On a recherché si l'inhibition produite par les deux composés 5-fluoro-uracile et 8-azaguanine, qui sont peut-être incorporés dans les DNA et RNA, pouvait être supprimée par addition au milieu des bases « normales » correspondantes, uracile (ou thymine) et guanine ou par les nucléosides et nucléotides qui en dérivent.

Dans les tableaux 7, 8 et 9, les désinhibitions sont indiquées relativement à des cultures contrôles contenant les mêmes concentrations en désinhibiteur que dans les expériences de désinhibition.

On constate (tableau 7) que lorsque la concentration en azaguanine est supérieure à 0,1-0,2 µg/ml, une désinhibition complète par la guanine n'est plus possible:

TABLEAU 7. — *Inhibitions en % en présence de taux variables d'azaguanine et de guanine (cultures de 44 h)*

Guanine en µg/ml	Azaguanine en µg/ml 0	0,025	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00
0	0	5	10	20	60	79	74
0,025 . . .	0	6	8	17	57	78	—
0,05	0	5	8	14	52	77	—
0,10	0	6	7	12	43	74	—
0,20	0	4	8	11	17	67	—
0,50	0	5	8	7	9	45	—
2,00	0	0	4	6	7	22	—
4,00	0	—	—	—	—	—	18
6,00	0	—	—	—	—	—	18
10,00	0	—	—	—	—	—	19

environ 20% de l'inhibition subsistent dans les conditions employées. L'action des désinhibiteurs est la suivante par ordre décroissant d'efficacité: guanine, acide guanylique, guanosine (tableau 8). Dans le cas d'inhibitions par le fluoro-uracile, l'efficacité des désinhibiteurs décroît dans l'ordre suivant: uracile, acide uridylique, thymine, uridine et thymidine (tableau 9).

TABLEAU 8. — *Inhibitions en % en présence de 8-azaguanine additionnée ou non de guanine ou de guanosine ou d'acide guanylique (cultures de 44 h)*

Partout par ml 0,3 μg (2,0 . 10^{-6} mole) de 8-azaguanine			
Désinhibiteurs	Concentrations des désinhibiteurs en 10^{-6} mole/ml		
	0	0,33	1,32
Guanine	69	49	34
Guanosine	69	62	61
Ac. guanylique	69	64	39

TABLEAU 9. — *Inhibition en % en présence de 5-fluoro-uracile, additionné ou non d'uracile ou de thymine, ou de leurs nucléosides et nucléotides (cultures de 44 h)*

Partout par ml 0,3 μg (2,3 . 10^{-6} mole) de 5-fluoro-uracile				
Désinhibiteurs	Concentrations des désinhibiteurs en 10^{-6} mole/ml			
	0	0,47	1,88	7,52
Uracile	77,5	67,2	54,2	14,1
Uridine	77,5	73,6	73,2	66,1
Ac. uridylique	77,5	68,9	64,2	46,5
Thymine	77,5	—	—	62,6
Thymidine	77,5	—	—	72,9

DISCUSSION

Parmi les vingt-et-une nouvelles substances essayées comme inhibiteurs de croissance de notre souche de *S. pombe*, les suivantes se sont montrées inactives (sont indiquées entre parenthèses les concentrations maximales essayées): streptomycine (10 mg/ml); acide thioglycolique (3,12 mg/ml); sulfanilamide (7 mg/ml); nitrate d'uranyle (7 mg/ml); NaCl (200 mg/ml); oxyde de 2-C-propylidène-*myo*-inositol (0,5 mg/ml). Seize substances ont montré par contre des activités variées.

Vu la grande activité du *méso*-oxyde III, nous avons essayé d'autres substances contenant un groupement époxydique. Dans un mémoire précédent (SCHOPFER, POSTERNAK et WUSTENFELD, 1962) sont décrits quelques essais avec des stéréoisomères: l'oxyde de 2 (4)-C-méthylène-*épi*-inositol ou *épi*-oxyde racémique, ou la forme dextrogyre dans laquelle le groupe méthylène est en position 2. L'action des deux variétés optiques était identique. Nous confirmons ici que l'*épi*-oxyde est un inhibiteur beaucoup plus faible que le *méso*-oxyde: à une concentration de 1 mg/ml, l'inhibition est de 60% alors que, dans les mêmes conditions, il suffit d'une concentration de 70 μg/ml de *méso*-oxyde pour une inhibition de 50%; par interpolation, on obtiendrait pour EO un indice d'inhibition d'environ 850, beaucoup plus élevé donc que l'indice 70 trouvé pour MO. Le fait intéressant est que l'inhibition pae EO est presque complètement supprimée par addition au milieu de nouvelles doses de *myo*-inositol. L'*épi*-inositol, qui est pourtant la substance de base de EO est par contre sans effet. L'oxyde de 2-C-propylidène-*myo*-inositol V est un homologue supérieur du *méso*-oxyde III; aux concentrations essayées, il s'est montré sans effet. Tout ceci indique la stéréospécificité remarquable du composé III. Des essais ont également été effectués avec la substance la plus simple, l'oxyde d'éthylène, qui manifeste une activité à des doses élevées au bout de 24 heures (71% d'inhibition pour 1 mg/ml). Cette action diminue au bout de 44 heures, ce qui s'explique sans doute par une destruction hydrolytique spontanée de l'inhibiteur (tableau 3). Pour autant qu'ils sont actifs comme inhibiteurs, tous ces dérivés époxydiques produisent des modifications morphologiques analogues: allongement cellulaire, généralement sans formation de parois transversales.

La β-propionolactone est détruite, elle aussi, par hydrolyse à basse température. Par interpolation, on calcule que sa constante de vitesse d'hydrolyse, en milieu neutre à 29°, est de 5.10^{-3}/min, ce qui correspond à une demi-durée de vie de 2 h 20 (LONG et PURCHASE, 1950). C'est la raison pour laquelle, après addition d'une dose unique de cet inhibiteur, l'action est environ deux fois plus faible après 44 heures qu'après 24 heures. Si l'on ajoute, par contre, la substance à des intervalles de temps réguliers par doses partielles, on obtient, pour une dose totale donnée, une action considérablement plus élevée.

Rappelons que les modifications morphologiques obtenues au moyen des inhibiteurs compétitifs sont les suivantes: cellules très allongées, mononuclées, de même diamètre que les cellules normales (type MO); cellules à 2-3 compartiments mononucléés, enflés (type IM). Sous l'action des nouveaux inhibiteurs essayés, on obtient des modifications du type MO en présence de la β-propionolactone et de l'azaguanine. Sous l'effet du 5-fluoro-uracile, de l'actinomycine C, du chloramphénicol, de la pénicilline, de NH_2OH, de $NaNO_2$, de As_2O_3 et de KCN, on observe des modifications qui peuvent être décrites comme une superposition des types MO et IM: existence de compartiments qui sont plus ou moins allongés. En présence des autres inhibiteurs du tableau 2, les formes cellulaires restent normales; il se produit une agglomération particulièrement forte dans le cas de l'acide indolyl-acétique.

Comme l'indique le tableau 4, divers azadérivés de bases puriques et pyrimidiques ont été essayés comme inhibiteurs. Sont pratiquement dépourvus d'action l'azaxanthine, l'aza-uracile et la 1,3-diméthyl-azaxanthine. La 8-aza-adénine est faiblement active durant les premières 24 heures de culture; après 44 heures, on n'observe plus d'inhibition. La 8-azaguanine, par contre, exerce une forte action inhibitrice (tableau 4).

La supression de l'effet des inhibiteurs dérivant de la guanine et de l'uracile a été tentée par introduction des bases normales, de leurs nucléosides et de leurs nucléotides. Comme il fallait s'y attendre, la guanine agit comme désinhibiteur en présence d'azaguanine. Nous constatons toutefois que lorsque la quantité de cette dernière est supérieure à 0,1-0,2 μg/ml, la désinhibition n'est pas complète: même en présence de fortes quantités de guanine, elle ne dépasse pas 81-82% dans nos conditions d'expériences (tableau 7). La situation rappelle celle qui a été observée lors de l'action du γ- et du δ-hexachlorocyclohexane sur *Neurospora crassa* inositolles: lorsque la concentration en inhibiteur est supérieure à une certaine limite, les cellules sont partiellement endommagées de façon irréversible (FULLER, BARRAT et TATUM, 1950; HITZ, 1963). Une désinhibition peut également être obtenue au moyen du GMP et, beaucoup plus faiblement, par la guanosine (tableau 8). Dans le cas de ces deux désinhibiteurs il est intéressant que le nucléotide soit plus efficace que le nucléoside. On se représente en effet que les esters phosphoriques sont transportés difficilement à travers des membranes cytoplasmiques.

Le 5-fluoro-uracile est, lui aussi, un inhibiteur actif (tableau 9). Dans nos conditions expérimentales, une désinhibition presque complète est réalisable au moyen de l'uracile. Ici encore, nous observons une action plus faible de l'UMP et encore beaucoup plus faible de l'uridine. Quant à la thymine, son effet désinhibiteur est de beaucoup inférieur à celui de l'uracile, alors que la thymidine semble complètement inactive (tableau 9).

SCHOPFER, POSTERNAK et WUSTENFELD (1962) avaient indiqué que des cultures de *S. pombe*, fortement inhibées par MO, sont partiellement déshinhibées par IM. Nous avons recherché pour cette raison si un antagonisme analogue entre inhibiteurs se produisait dans d'autres cas.

Les associations pénicilline + azaguanine, IM + azaguanine, IM + pénicilline, MO + azaguanine, MO + pénicilline, ne donnent lieu à aucun synergisme d'action; l'effet observé est supérieur à celui de chacun des inhibiteurs agissant isolément; par contre cet effet est toujours inférieur à la somme des deux inhibitions individuelles. Dans le cas de la combinaison pénicilline + azaguanine, on observe dans certaines conditions une désinhibition nette (tableau 6). Au point de vue morphologique on constate que lorsqu'on associe l'isomytilitol à un autre inhibiteur, on observe (tableau 5) des formes cloisonnées du type IM. D'après les recherches de DESHUSSES, CHENEVAL et POSTERNAK (1969), il est probable que dans ces cas également, IM est incorporé dans les phospholipides à côté des phosphoinositides, ce qui serait

une des causes des changements morphologiques: c'est tout au moins ce qui a été observé lorsque IM agit en présence de MO.

Les mécanismes biochimiques d'action des autres inhibiteurs utilisés dans ce travail sont divers. Les dérivés époxydiques sont considérés comme des agents alcoylants qui agiraient sur les DNA et RNA de préférence au niveau des restes de guanine. On a suggéré une action analogue dans le cas de la β-propionolactone (ROBERTS et WARWICK, 1963). HNO_2 agirait en particulier par désamination des bases puriques et pyrimidiques; NH_2OH dégraderait la cytosine; KCN et NaN_3 sont des inhibiteurs du transport électronique; As_2O_3 et le 2,4-DNP découpleraient certaines réactions de l'oxydation phosphorylante. Le chloramphénicol, enfin, inhiberait la synthèse des protéines (par blocage de certains ribosomes) et l'actinomycine entraverait la synthèse du RNA. Il est difficile de ramener ces nombreux mécanismes à un dénominateur commun en ce qui concerne les modifications morphologiques observées chez *S. pombe*. Signalons que DESHUSSES, CHENEVAL et POSTERNAK (1969) avaient montré que dans des cultures inhibées par Pcl, MO, β-Ppl, EO, Azg, 2,4-DNP, As_2O_3, NH_2OH, KCN, 5-FU et AcC, les cellules sont le siège d'une accumulation d'inositol qui est sans doute essentiellement sous forme de phosphoinositides. Ces derniers, en leur qualité de composants de membranes, jouent probablement un rôle dans les phénomènes de transport et dans les synthèses des parois.

Ajoutons que, dans le cas de levures bourgeonnantes, on observe des élongations cellulaires sous l'effet de divers facteurs physiques et chimiques. On a impliqué entre autres une perturbation de l'équilibre sulfhydryle-disulfure. Récemment, on a observé, par suite de carence azotée, des élongations qui sont supprimées par les sélénites et l'acide indolyl-acétique (BROWN et HOUGH, 1965). Ces deux substances produisent chez *S. pombe*, à des taux relativement élevés (tableau 2) des inhibitions, mais il faut remarquer que les formes cellulaires restent normales.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre gratitude au Fonds National Suisse de la Recherche scientifique pour son appui. Nos remerciements vont également à Mme S. BERTHOUD pour son aide technique.

Laboratoires de Chimie biologique
et organique spéciale de l'Université, Genève.
Institut de Botanique générale de l'Université,
Berne.

BIBLIOGRAPHIE

BROWN, C. M. and J. S. HOUGH (1965). Elongation of yeast cells in continuous cultures. *Nature*, 206, 676-678.

DESHUSSES, J., J.-P. CHENEVAL et T. POSTERNAK (1969). Recherches biochimiques sur *Schizosaccharomyces pombe* en fonction des conditions de culture et de l'action d'inhibiteurs. I. Etude des phospholipides. *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 789-802.

——, S. BERTHOUD et T. POSTERNAK (1969). Recherches biochimiques sur *Schizosaccharomyces pombe* en fonction des conditions de culture et de l'action d'inhibiteurs. II. Composition des parois cellulaires. *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 803-812.

FULLER, R. C., R. W. BARRAT and E. L. TATUM (1950). The relationship between hexachlorocyclohexane and inositol in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, 186, 823-827.

HITZ, H. R. (1963). Die Wirkung von Hexachlorocyclohexanen bei *Neurospora crassa* inositolless. *Arch. Mikrobiol.*, 45, 217-246.

LONG, F. A. and M. PURCHASE (1950). The Kinetics of Hydrolysis of β-propionolactone in Acid, Neutral and Basic Solutions. *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 3267-3273.

PARANJAPYE, V. N., J. DESHUSSES et T. POSTERNAK (1964). Sur une méthode simplifiée de dosage microbiologique du ms-inositol. *Anal. chim. Acta*, 31, 480-483.

——, J. DESHUSSES et T. POSTERNAK (1969). Recherches biochimiques sur *Schizosaccharomyces pombe* en fonction des conditions de culture et de l'action d'inhibiteurs. III. Respirations cellulaires. *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 813-817.

POSTERNAK, T. et J.-G. FALBRIARD. (1960). Recherches dans la série des cyclitols XXXVIII. Sur la configuration du laminitol. *Helv. Chim. Acta*, 43, 2142-2147.

ROBERTS, J. J. and G. P. WARWICK (1963). Reaction of β-propionolactone with guanosine, deoxyguanylic acid and ribonucleic acid. *Biochem. Pharmacol.*, 12, 1441-1443.

SCHOPFER, W. H., T. POSTERNAK et D. WUSTENFELD (1962). Recherches sur le rôle du méso-inositol dans la biologie cellulaire de *Schizosaccharomyces pombe* Lindner. *Arch. Mikrobiol.*, 44, 113-151.