

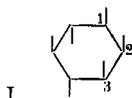
147. Recherches sur la biochimie des cyclitols VI.  
Incorporation d'une substance anti-inositol dans les phospholipides  
d'un *Schizosaccharomyces*<sup>1)</sup>

par Th. Posternak, W. H. Schopfer et J. Deshusses

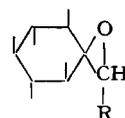
Dédié à M. le Professeur P. KARRER à l'occasion de son 70e anniversaire

(24 IV 59)

Au cours de recherches systématiques sur les antivitamines du ms-inositol (I) (MI), nous avons montré que divers produits de substitution en position 2 de ce cyclitol (II, III, IV, V et VI) agissent comme des inhibiteurs compétitifs sur *Neurospora crassa inositolless*<sup>2)</sup>. A partir de cultures inhibées par l'isomytilitol (II) (IM), nous avons extrait des phospholipides dans lesquels le méthyl-cyclitol est incorporé sous forme d'ester phosphorique<sup>3)</sup>.



- II R = CH<sub>3</sub>  
III R = CH<sub>2</sub>Br  
IV R = CHBr-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>



- V R = H  
VI R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

*N. crassa inositolless*, mutant obtenu par irradiation UV. (souche 9683 de l'ATCC, Washington, No. 37.401, sexe a, de BEADLE), présente des inconvénients: cette souche n'est pas toujours très stable. Nous avons donc cherché un microorganisme unicellulaire exigeant de l'inositol comme facteur exogène de croissance, moins sujet aux variations, et sensible aux anti-inositols dont nous disposons. Nous avons fini par trouver<sup>4)</sup> une levure particulièrement favorable: *Schizosaccharomyces Pombe* (LINDNER), souche *liquefaciens* (OSTERWALDER) DEKKER. Ce micro-organisme manifeste à l'égard des anti-inositols une spécificité beaucoup plus étroite que *N. crassa inositolless*. Pour divers mutants de ce dernier, nous avons trouvé une vingtaine d'inhibiteurs, alors que 4 seulement de ces substances agissent sur *S. Pombe*, celles qui sont de beaucoup les plus actives étant l'isomytilitol (II) et l'époxyde V. Dans le cas de l'isomytilitol, nous avons constaté qu'il s'agit probablement d'un antagonisme compétitif avec l'inositol<sup>4)</sup>: les indices d'inhibition et de désinhibition sont très voisins.

Nous avons entrepris au moyen de *S. Pombe* une étude analogue à celle effectuée sur *N. crassa inositolless*<sup>3)</sup>. Des phospholipides ont été obtenus à partir de cultures inhibées par l'isomytilitol et non inhibées, et leurs compositions ont été comparées.

<sup>1)</sup> Communication V: Helv. **41**, 235 (1958).

<sup>2)</sup> W. H. SCHOPFER & TH. POSTERNAK, *Chimia* **7**, 90 (1953); Helv. physiol. pharmacol. Acta **12**, C 30-C 32 (1954); Arch. Sc. **8**, 316 (1955).

<sup>3)</sup> TH. POSTERNAK & W. H. SCHOPFER, *Bull. Soc. Chim. biol.* **39**, 1037 (1957).

<sup>4)</sup> W. H. SCHOPFER & TH. POSTERNAK, *Rev. suisse Pathol. Bactériol.* **19**, 647 (1956).

*Cultures des microorganismes.* Elles ont été effectuées durant 48 h à 29° en erlenmeyers de 50 ml contenant 10 ml de milieu liquide de PENNINGTON<sup>5)</sup> additionnés de 10  $\gamma$  de ms-inositol (20  $\gamma$  dans certaines cultures). Dans les expériences d'inhibition, le même milieu contenait encore 180 ou 200  $\gamma$  d'isomylitol. Les cultures inhibées ont toujours été effectuées parallèlement à des cultures non inhibées.

*Dosages de ms-inositol.* Ils ont été effectués d'après les techniques décrites précédemment<sup>3)</sup> sur du matériel traité 40 h à l'ébullition à reflux avec 10–20 parties de HCl 6-n.

*Extraction des phospholipides.* Dans une communication préliminaire précédente<sup>4)</sup> nous avons indiqué que la fraction lipidique de *S. Pombe* ne contient que fort peu de MI (env. 1% du MI total des cellules); dans ces expériences, les cellules avaient d'abord été desséchées par lyophilisation. Nous avons constaté que dans ces conditions, il se produit une rétention étonnante des phospholipides dont l'extraction devient incomparablement plus difficile que si l'on s'adresse à du matériel frais. Par les techniques ci-dessous, nous arrivons à extraire, au moyen de dissolvants de lipides, 30–50% du MI total.

Les cellules recueillies par centrifugation sont lavées 3 fois à l'eau. Le matériel humide (3–4 g par litre de culture non inhibée) est immédiatement suspendu dans 5 parties d'un mélange d'alcool éthylique et d'éther fraîchement distillé (3:1 en vol.). On agite de temps en temps et encore au bout de 48 h. On répète l'extraction encore deux fois en laissant seulement 24 h en contact avec le dissolvant. La poudre est desséchée et mélangée intimement avec 2,5 parties d'alumine Alcoa No. 301 dégraissée; on broie soigneusement dans un mortier. On agite 6 h à la machine avec 10 parties d'un mélange chloroforme-alcool méthylique (1:1 en vol.), puis on essore, sèche dans le vide et broie de nouveau dans un mortier. Cette suite d'opérations est répétée encore 3–4 fois. Tous les extraits sont réunis et évaporés à sec dans le vide dans un courant de CO<sub>2</sub>. On reprend par du chloroforme à raison de 0,5 ml par mg de P extrait et précipite les phospholipides par addition lente de 10 vol. d'acétone. Après un séjour de 24 h la glacière, le précipité séparé par centrifugation et séché dans le vide est repris par du chloroforme et la précipitation par l'acétone est répétée.

Les phospholipides fraîchement précipités sont émulsionnés dans une dizaine de vol. de HCl 1-n. glacé. Après un séjour de 1 h à 0°, on dialyse à la chambre froide à 4° dans une «saucisse» tournante (VISING Co., Chicago) contre de l'eau distillée, durant 6–9 jours, en changeant le liquide extérieur toutes les 24 h. Le contenu de la «saucisse» est évaporé à sec dans le vide sulfurique à basse température; le résidu représente les phospholipides purifiés.

*Hydrolyse ménagée et chromatographie.* L'hydrolyse acide ménagée des phospholipides (20 min. au bain-marie bouillant avec 10 parties HCl 6-n.) suivie de précipitation des produits phospho-organiques au moyen d'acétate neutre de plomb, a été effectuée comme indiqué autrefois<sup>3)</sup>. Il en est de même de la séparation de ces produits d'hydrolyse par chromatographie sur papier dans le système n-propanol-NH<sub>3</sub> conc.-H<sub>2</sub>O (6:3:1 en vol.) sur papier WHATMAN 4. On obtient ainsi 3 bandes; par ordre de Rf et aussi d'importance croissants: A, B, C. Alors que le Rf de C est identique à celui des glycérophosphates, les Rf de A et B sont resp. 2,6 et 1,6. fois plus faibles. Les bandes A, B, C, découpées et fragmentées, sont extraites à 5 reprises à l'eau. Les 3 extraits contiennent au total 92–95% du P soumis à la chromatographie. Les substances de la bande B, qui est particulièrement intéressante, sont soumises à une deuxième chromatographie sur papier dans les mêmes conditions; cette nouvelle opération ne modifie d'ailleurs par notablement la composition de la fraction B.

La formation de 3 bandes analogues aux précédentes a été observée dans les mêmes conditions à partir des phospholipides de *N. crassa inositolless*<sup>3)</sup> et aussi de foie de Rat. Dans tous ces cas, on constate que la bande C consiste essentiellement en glycérophosphates alors que la bande B est riche en inositol. La bande A fournit après déphosphorylation et déionisation essentiellement du glycérol.

*Traitement par la phosphatase suivi de chromatographie sur papier*<sup>3)</sup>. On ajuste à 5,5 le pH des solutions obtenues par élution des bandes A, B et C, et traite à 32°, en présence de toluène, par de la phosphatase prostatique dialysée: par ml, les mélanges contiennent 60–90  $\gamma$  P et 60 P.E.<sup>6)</sup>. Au bout de 40 h, la minéralisation du phosphore est généralement quantitative. On fait

<sup>5)</sup> D. PENNINGTON, C. H. SAWYER & J. SCHMIDT, J. Bacteriol. **62**, 677 (1951).

<sup>6)</sup> P. E. = Phosphatase-Einheit. Pour la définition de P. E., voir H. ALBERS & E. ALBERS, Z. physiol. Chem. **232**, 179 (1935).

alors passer successivement sur des colonnes de Dowex 50 (forme H) et de Dowex 2 (forme OH). Après concentration convenable dans le vide, on analyse par chromatographie sur papier (WHATMAN No. 1) dans le système acétone-H<sub>2</sub>O (78:22 en vol.). Révélation au moyen du réactif de TOLLENS<sup>7</sup>). Dans le cas de cultures non inhibées, on observe ainsi essentiellement les taches suivantes: bande A: glycérol (fort); ms-inositol (faible); bande B: ms-inositol (intense); bande C: glycérol (intense); ms-inositol (faible). Dans le cas de cultures inhibées, il vient s'ajouter en A et C une tache faible et en B (fig. 1) une tache intense d'isomytilitol.

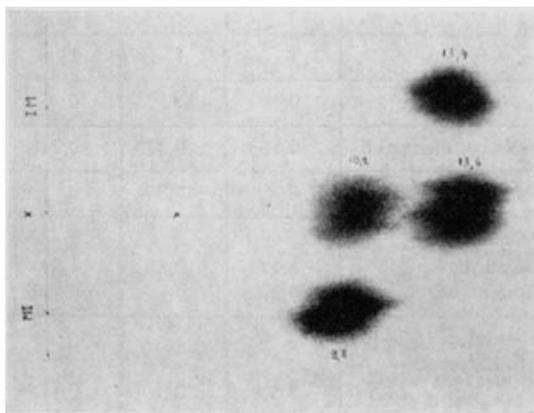


Fig. 1 Chromatographie (acétone-eau 78:22, WHATMAN N° 1; 16 h)  
Révélation par le réactif de TOLLENS<sup>7</sup>)

MI = ms-inositol; IM = isomytilitol; X = produits de la bande B (après action de la phosphatase prostatique) provenant d'une culture (a inh.) de *S. Pombe* inhibée par l'isomytilitol

### Discussion

Un travail concernant l'utilisation du ms-inositol par *S. Pombe* a été effectué récemment par YARBROUGH & CLARK<sup>8</sup>) qui extraient 80–85% de l'inositol cellulaire par le mélange CHCl<sub>3</sub>-méthanol (2:1 en vol.) ce qui rendrait probable, pour cette fraction extractible, une liaison sous forme d'inosito-phospholipides qui ne furent d'ailleurs pas caractérisés. Opérant il est vrai avec une souche différente de celle de ces auteurs, nous n'arrivons pas à extraire, au moyen de dissolvants de lipides, plus de 50% de l'inositol présent. Dans un travail ultérieur, nous indiquerons la nature et la répartition de l'inositol non extractible.

Par chromatographie sur papier, nous séparons les produits d'hydrolyse acide ménagée des phospholipides purifiés en 3 fractions A, B et C. Signalons que des fractions analogues s'obtiennent dans les mêmes conditions, à partir des phospholipides de *N. crassa inositolless*<sup>2</sup>) et de foie de Rat.

Après déphosphorylation enzymatique, les substances de la bande B provenant de cultures inhibées de *S. Pombe* fournissent des quantités considérables d'isomytilitol décelable par chromatographie sur papier (fig.). Dans notre travail analogue effectué sur *N. crassa inositolless*<sup>3</sup>) nous avons montré qu'en raison des techniques employées (purification des phospholipides par dialyse prolongée, chromatographie sur papier, nécessité d'action préalable de la phosphatase) un tel résultat n'est pas

<sup>7</sup>) TH. POSTERNAK, D. REYMOND & W. HAERDI, Helv. **38**, 191 (1955).

<sup>8</sup>) H. F. YARBROUGH JR. & F. M. CLARK, J. Bacteriol. **73**, 318 (1957).

dû à un entraînement de l'isomytilitol du milieu au cours des opérations, mais bien à une incorporation de l'inhibiteur sous forme d'ester phosphorique dans les phospholipides.

Tableau

Cultures	a	a inh.	b	b inh.	c
1. Vol. en l du milieu (PENNINGTON) <sup>9)</sup>	4	5,89	4	4	4,48
2. MI en mg par l . . . . .	1	1	1	1	2
3. IM en mg par l . . . . .	0	20	0	18	0
4. Poids secs <sup>9)</sup> en g des cellules par l	0,788	0,415	0,740	0,438	0,971
5. Inhibition en % . . . . .	0	47,3	0	40,8	0
Par g de cellules sèches:					
6. P lipidique dialysé en mg . . . . .	1,14	0,86	1,34	0,95	0,92
7. MI phospholipidique en mg . . . . .	0,302	—	0,421	0,324	0,333
P org. en % du P total, récupéré après chromatogr.:					
8. bande A . . . . .	2,5	3,3	2,4	2,3	2,1
9. bande B . . . . .	3,8	16,2	5,4	16,7	10,7
10. bande C . . . . .	93,7	80,5	92,2	81,0	87,2
Rapports mol. P org./MI:					
11. bande A . . . . .	—	—	61,4	9,67	—
12. bande B . . . . .	1,07 <sup>10)</sup>	3,62 <sup>10)</sup>	1,11 <sup>10)</sup>	3,24 <sup>10)</sup>	1,12
13. bande C . . . . .	77,3	95,8	60,5	110,1	—
Répartition du MI (en %) pour 1 mg P org. total récupéré après chromatogr.:					
14. bande A . . . . .	—	—	2	14	—
15. bande B . . . . .	230	249	279	300	554
16. bande C . . . . .	70	48	88	42	—

La fraction B est particulièrement intéressante car c'est elle qui contient également la majeure partie de l'inositol (tableau: 15). Sa composition est ici plus simple et plus claire que dans le cas de *N. crassa* inositolless:

Lorsque les cultures n'ont pas été inhibées (tableau: 12, a, b, c), le rapport mol. P org./MI de la fraction B est voisin de 1, ce qui indique la présence essentiellement d'acides ms-inositol-monophosphoriques, comme le fait d'ailleurs supposer l'analogie du Rf de B avec celui de l'acide ms-inositol-2-phosphorique. Dans le cas de cultures inhibées, on constate que la fraction B est devenue 3-4 fois plus importante: resp. 16,2 et 16,7% du P org. total récupéré après chromatographie (tableau: 9, a inh., b inh.) au lieu de 3,8 et 5,4% (*ibid.* a, b). Le rapport mol. P org./MI est devenu d'autre part beaucoup plus élevé: 3,62 et 3,24 (tableau: 12, a inh., b inh.). Comme les bandes B provenant de cultures inhibées contiennent, outre l'inositol, des quantités

<sup>9)</sup> Poids des cellules traitées par le mélange alcool: éther (3:1).

<sup>10)</sup> Cette fraction avait été soumise à une double chromatographie sur papier.

considérables d'isomytilitol, les rapports P org./MI indiqués ne peuvent s'expliquer que par la présence, à côté d'acides ms-inositol-monophosphoriques, d'acides isomytilitol-phosphoriques en quantité resp. 2,6 et 2,2 fois plus élevée. Ceci est en accord avec les intensités relatives des taches des deux cyclitols (v. fig.) obtenues après déphosphorylation de la fraction B (culture a inh.): la tache de l'isomytilitol apparaît en effet comme env. 3 fois plus intense que celle de l'inositol. En raison de leur Rf, ces dérivés phosphorylés de l'isomytilitol sont probablement des esters monophosphoriques.

Nous avons montré autrefois<sup>4)</sup> que, dans nos conditions opératoires et dans une expérience particulière, l'inositol disparaît complètement du milieu de culture non inhibé. Lorsque par contre il y a inhibition, on constate que plus la dose d'antagoniste augmente, plus est élevée la quantité de vitamine restant dans le milieu. Pour une inhibition de 50% environ, la moitié de l'inositol offert disparaît, ce qui indique la même utilisation de la vitamine par unité de poids de cellules sèches, indépendamment de l'inhibition des cultures.

Il est en outre intéressant de relever que les teneurs des cellules sèches en inositol phospholipidique ne sont pas très différentes, que les cultures aient été inhibées ou non (tableau: 7, a, b, b inh. et c). D'autre part, nous constatons que pour 1 mg de P org. total récupéré après chromatographie, on trouve des quantités très voisines de MI dans les fractions B provenant d'une culture inhibée et de la culture non inhibée correspondante effectuées en présence de mêmes concentrations initiales en vitamine (1 mg par litre de milieu) (tableau: 15, a et a inh., b et b inh.). La fraction B de la culture c (2 mg MI par litre de milieu) contient par contre env. 2 fois plus d'inositol que les précédentes.

Nous en concluons que l'inhibition n'entrave pas la biosynthèse des phospholipides à inositol, mais provoque la formation *additionnelle* de phospholipides à isomytilitol.

Les incorporations, observées jusqu'à présent, d'inhibiteurs dans des molécules biologiques complexes concernent des analogues structuraux de bases puriques ou pyrimidiques et d'acides aminés qui peuvent être utilisés pour des biosynthèses resp. d'acides nucléiques, de nucléotides et de matières protéiques<sup>11)</sup>. Conformément aux représentations classiques, on avait constaté un *remplacement* du composant normal par son antagoniste. Il résulte de notre étude un tableau différent. Dans les phospholipides de *S. Pombe*, l'incorporation de l'inhibiteur ne s'accompagne pas d'une diminution correspondante de l'inositol phospholipidique. Les phospholipides à isomytilitol synthétisés en quantités abondantes dans les cultures inhibées sont présents *non pas à la place, mais à côté* des phospholipides normaux à inositol. Comme dans le cas de *N. crassa* inositolless<sup>8)</sup>, c'est l'accumulation de ces phospholipides anormaux à isomytilitol, incapables sans doute de remplir certaines fonctions physiologiques, qui provoque l'inhibition de croissance.

Les résultats exposés rendent peu probable, dans le cas de *S. Pombe*, le mécanisme classique d'une compétition, entre le métabolite et l'anti-métabolite, pour les mêmes emplacements d'un système enzymatique natif normal. On pourrait penser à la formation, dans les cultures inhibées, d'enzymes d'adaptation synthétisant les phospholipides à isomytilitol, enzymes qui ne pourraient effectuer l'incorporation du

<sup>11)</sup> La littérature récente est indiquée par W. SHIVE & C. G. SKINNER, Annual. Rev. Biochemistry 27, 643 (1958).

ms-inositol, mais qui seraient inhibés d'une manière compétitive par ce dernier. C'est ainsi que s'expliquerait la réversibilité de l'effet de l'antagoniste par adjonction d'inositol. A l'appui de cette conception, on peut invoquer le fait que l'isomytilitol n'exerce son action que s'il est présent au moment de l'inoculation; l'inhibition ne se produit par contre pas si on introduit l'isomytilitol durant la croissance, c'est-à-dire dans des conditions défavorables pour la production des enzymes d'adaptation supposés (expériences faites au biophotomètre enregistreur).

Ce travail a été effectué avec l'aide du *Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique* auquel nous adressons nos remerciements. Nous remercions également Mlles A. F. LUDER et E. BERGER, laborantines, de leur collaboration technique.

#### RÉSUMÉ

Les compositions des phospholipides provenant de cultures de *Schizosaccharomyces Pombe* inhibées ou non par un anti-inositol, l'isomytilitol, ont été comparées. Les teneurs en phospholipides à inositol restent approximativement les mêmes. Dans les cultures inhibées, se produit la synthèse en quantité considérable de phospholipides à isomytilitol non pas à la place, mais à côté de celle des phospholipides normaux à ms-inositol. Une explication de ces phénomènes a été proposée.

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

## 148. Die Alkylierung von Formylbernsteinsäureester

von P. H. Payot

(9. III. 59)

Im Rahmen synthetischer Versuche, in welchen aus Ausgangsmaterial Formylbernsteinsäure-äthylester (Ia)<sup>1)</sup> verwendet wurde, stellte sich das Problem der präparativen Darstellung von Alkylierungsprodukten dieses  $\beta$ -Aldehydoesters, bzw. seiner Enolform IIa. Es ist bekannt, dass Verbindungen mit Keto-Enol-Tautomerie prinzipiell am Kohlenstoff oder am Sauerstoff alkyliert werden können. Dies ist für eine Anzahl von  $\beta$ -Diketonen und  $\beta$ -Ketocarbonsäuren mehrfach studiert worden<sup>2)</sup>. Vom Formylbernsteinsäureester war aus der Literatur<sup>3)</sup> und auf Grund eigener Erfahrungen<sup>4)</sup> bekannt, dass sein Natriumenolat von  $\alpha$ -Halogenfettsäureester nicht am Kohlenstoff, sondern am Sauerstoff alkyliert wird.

Prinzipiell kann bei Alkylierung einer  $\beta$ -Dicarbonylverbindung, wie sie der Formylbernsteinsäureester (Ia) darstellt, die Bildung von Derivaten erwartet werden, welche am Kohlenstoffatom  $\alpha$  der Carbonylform Ia und am Kohlenstoff  $\alpha'$  sowie am Sauerstoffatom der Enolform IIa substituiert sind. Ausserdem ist auch Acetal-

1) W. WISLIGENUS, E. BÖKLEN & F. REUTHE, Liebigs Ann. Chem. **363**, 340 (1908).

2) H. HENECKA, Chemie der Beta-Dicarbonylverbindungen, Berlin 1950, S. 29.

3) M. N. SCHTSCHUKINA & N. A. PREOBRASHENSKY, Ber. deutsch. chem. Ges. **68**, 1991 (1935).

4) Dissertation PIERRE PAYOT, Basel 1953.