

alkylating agents, and free radicals⁶. Yeast alcohol dehydrogenase is inhibited competitively by pyridine¹³, substituted 'pyridinium ring' compounds¹⁴, and the alkylating agent, chloroquine¹⁵. Phenol and substituted phenols may act non-competitively, but also have been shown to compete with NAD in certain dehydrogenase systems¹⁶. Alcohol dehydrogenase is inactivated by X-radiation¹⁷ presumably by radical formation, and cysteine has a limited protective effect¹⁸. In model experiments, DIXON plots indicated that nicotine, and to some extent, phenol, gave competitive inhibition in the above enzyme system, whereas pyridine at the usual smoke concentration had a negligible effect. Inactivation by nicotine (PM component), pyridine (PM and VP component), hydrogen cyanide or carbon monoxide (VP components) does not seem to account for the observed inhibition by the smoke phases.

The occurrence of small amounts (1–2 µg/cigarette) of peroxides in smoke has been claimed¹⁹, but their presence could not be confirmed by enzymatic analysis in the present work. Hydrogen peroxide (30 µg) inhibited both initially and subsequently, but did not account for the overall inhibition. Ultracentrifugal analysis and acrylamide gel electrophoresis of the smoke-reacted enzyme revealed no evidence for the presence of dimers which are known to form by reactions between weak oxidants and sulphydryl groups of proteins²⁰. However, disulfides may also be formed intramolecularly rather than by dimerization. Strong oxidants may also react with sulphydryls, yielding sulfenic, sulfonic and related acids which are not reduced by addition of cysteine. The presence in cigarette smoke of both types of oxidants is probable from the analysis of the various effects of cysteine.

Zusammenfassung. Die Hemmung der Alkoholdehydrogenase aus Hefe durch Zigarettenrauch beruht auf verschiedenen Inaktivierungsmechanismen. Die Gasphase zeigt eine kompetitive Hemmung, die Partikelphase und der ganze Rauch eine gemischte Hemmung. Da die Hemmung durch den ganzen Rauch nicht der Summe der Hemmungen beider Phasen entspricht, ist anzunehmen, dass Wechselwirkungen zwischen den Inhibitoren und Antagonisten vorliegen.

R. C. BENEDICT and R. L. STEDMAN

*Eastern Utilization Research and Development Division,
Agricultural Research Service, United States
Department of Agriculture, Philadelphia
(Pennsylvania 19118, USA), 9 July 1968.*

- ¹³ M. R. ATKINSON, G. ECKERMAN and R. M. LILLEY, Biochem. J. 104, 872 (1967).
- ¹⁴ J. R. HEITZ and B. M. ANDERSON, Molcc. Pharmac. 4, 44 (1968).
- ¹⁵ R. FIDDICK and H. HEATH, Nature 213, 628 (1967).
- ¹⁶ R. T. WEDDING, C. HANSCH and T. R. FUKUTO, Archs Biochem. Biophys. 121, 9 (1967).
- ¹⁷ R. LANGE, A. PIHL and L. ELDJARN, Int. J. Radiat. Biol. 7, 73 (1959).
- ¹⁸ G. GORIN, M. QUINTILIANI and S. K. AIREE, Radiat. Res. 32, 671 (1967).
- ¹⁹ J. D. TELLER, Abstr. 150th Natn. Meeting Am. Chem. Soc., New York, N.Y. (1965).
- ²⁰ C. LITTLE and P. J. O'BRIEN, Archs Biochem. Biophys. 122, 406 (1967).

Les sites subcellulaires d'incorporation du 1-¹⁴C-L-fucose dans les glycoprotéines des cellules normales et cancéreuses en culture in vitro

Les cellules en culture in vitro offrent un matériel de choix pour la recherche des sites de la biosynthèse des glycoprotéines. Dans des travaux antérieurs^{1,2}, nous avons étudié l'incorporation de la 1-¹⁴C-D-glucosamine dans les cellules fibroblastiques de l'embryon de poulet et dans les cellules néoplasiques d'origine humaine, souche KB. Le fucose est également un constituant de nombreuses glycoprotéines animales, plasmatisques ou tissulaires^{3,4}; c'est pourquoi le 1-¹⁴C-L-fucose a déjà été utilisé comme précurseur dans les études sur leur biosynthèse^{5,6}. Sa position terminale dans les chaînes polysaccharidiques des glycoprotéines confère un intérêt particulier à l'étude des sites cellulaires de son incorporation dans les macromolécules.

Les cellules KB⁷ ou les cellules fibroblastiques de l'embryon de poulet² sont mises en culture dans un milieu à l'hydrolysat de lactalbumine⁸, en flacons rectangulaires de 21 × 12 × 5 cm (boîtes de Roux), à raison de 25 ml par flacon contenant 4 × 10⁶ cellules KB ou 25 × 10⁶ cellules fibroblastiques. Après 24 h à 37 °C, le milieu de culture est éliminé et 9 ml de milieu frais, contenant 0,1 µCi de 1-¹⁴C-L-fucose et 0,1 µCi de 6-³H-D-glucosamine, sont introduits dans chaque flacon; après 1 h de contact à 37 °C, on ajoute 20 ml du milieu sans marqueur. La culture est poursuivie pendant 20 ou 72 h, à 37 °C.

La récolte cellulaire est effectuée à 0 °C, en remplaçant le milieu de culture par 20 ml de tampon Tris 0,01 M, pH 7,3, NaCl 0,15 M, diisopropylfluorophosphate 0,0001 M, saccharose 0,88 M. Le fractionnement cellulaire est réalisé dans les conditions précédemment décrites⁸; on isole, à partir du surnageant «post-mitochondrial», 3 fractions cytoplasmiques: la phase cytoplasmique non particulaire (S), les membranes endoplasmiques (M) et les ribosomes (R). Dans ces 3 fractions, on

- ¹ R. GOT, P. LOUISOT, J. FROT-COUTAZ et L. COLOBERT, C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 266, 286 (1968).
- ² R. GOT, J. FROT-COUTAZ, L. COLOBERT et P. LOUISOT, Biochim. biophys. Acta 157, 599 (1968).
- ³ R. J. WINZLER, dans *Methods of Biochemical Analysis* (Ed. D. GLICK; Interscience Publishers Inc., New-York 1955), vol. 2, p. 279.
- ⁴ E. A. BALAZS, dans *The Amino Sugars* (Ed. R. W. JEANLOZ et E. A. BALAZS; Academic Press, New-York 1965), vol. II A, p. 401.
- ⁵ J. W. COFFEY, O. N. MILLER et O. Z. SELLINGER, J. biol. Chem. 239, 4011 (1964).
- ⁶ J. G. BEKESI et R. J. WINZLER, J. biol. Chem. 242, 3873 (1967).
- ⁷ H. EAGLE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 89, 362 (1955).
- ⁸ L. COLOBERT et P. LOUISOT, Bull. Soc. Chim. biol. 48, 3 (1966).

Tableau I. Incorporation du 1^{14}C -L-fucose et de la $6\text{-}^3\text{H}$ -D-glucosamine dans les macromolécules de la phase cytoplasmique non particulaire (S), des membranes endoplasmiques (M) et des ribosomes (R) des cellules KB après 20 h et 72 h de culture in vitro.

Fractions cyto-plasmiques	Répartition de la radioactivité totale (%)				Radioactivité spécifique (en cpm/mg)				Fucose		Osamines	
	20 h		72 h		Protéines		20 h		72 h		20 h	
	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H
S	50	67	53	39	168	224	210	200	$7,7 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	3×10^4	$3,4 \times 10^4$
M	50	33	44	60	1400	1150	840	1470				
R	0	0	3	1			400	280				

Tableau II. Incorporation du 1^{14}C -L-fucose et de la $6\text{-}^3\text{H}$ -D-glucosamine dans les macromolécules de la phase cytoplasmique non particulaire (S), des membranes endoplasmiques (M) et des ribosomes (R) des fibroblastes d'embryon de poulet après 20 h de culture in vitro.

Fractions cytoplas-miques	Répartition de la radio-activité totale (en %)		Radioactivité spécifique (en cpm/mg)				Protéine	Fucose	Osamines
	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H					
S	80	67	39	90			$3,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	
M	20	33	22	100					
R	0	0							

détermine, après dialyse exhaustive, le taux de protéine⁹, la radioactivité due au ^{14}C et au ^3H et, lorsque cela est possible, le taux de fucose et d'osamine³.

Le Tableau I rend compte des résultats obtenus avec les cellules néoplasiques KB. La différence essentielle entre la 20e h et la 72e h de culture réside dans la répartition de la radioactivité totale entre les fractions subcellulaires; quelle que soit la durée de la culture, on retrouve la même quantité de radioactivité ^{14}C due au fucose dans les membranes et dans la phase cytoplasmique non particulaire. Au contraire, pour la glucosamine, la quantité de radioactivité totale est nettement plus élevée dans les membranes à la 72e h qu'à la 20e h: on peut supposer que la présence de radioactivité à la 20e h correspond à une activité de biosynthèse, alors qu'à la 72e h, elle est due à la présence de glycoprotéines de structure préalablement marquées. On peut d'ailleurs expliquer de la même manière l'apparition de radioactivité dans les ribosomes à la 72e h. La radioactivité spécifique, en ^{14}C comme en ^3H , rapportée aux protéines, reste toujours beaucoup plus élevée dans les membranes: on peut en conclure qu'il s'agit là du principal site d'incorporation du fucose comme de la glucosamine dans les cellules néoplasiques.

Le Tableau II donne les résultats obtenus avec les cellules fibroblastiques d'embryon de poulet. Après 20 h de culture, on observe une répartition de la radioactivité totale due à la $6\text{-}^3\text{H}$ -D-glucosamine analogue à celle observée dans le cas des cellules néoplasiques KB. Pour le 1^{14}C -L-fucose, l'essentiel de la radioactivité totale apparaît dans la fraction non particulaire; c'est également dans cette dernière fraction que la radioactivité spécifique rapportée aux protéines est la plus élevée:

elle serait donc le siège de l'activité métabolique liée au fucose la plus intense.

Ainsi, comme dans le cas du sérum et de divers tissus du rat^{6,8}, le 1^{14}C -L-fucose est un excellent précurseur pour l'étude de la biosynthèse des glycoprotéines dans les cellules cultivées in vitro. La radioactivité spécifique rapportée au fucose est du même ordre de grandeur que celle rapportée à la glucosamine. L'analyse des résultats obtenus met en évidence une différence nette entre les sites d'incorporation du L-fucose selon la nature normale ou cancéreuse des cellules étudiées. En effet, dans le cas des cellules néoplasiques KB, le fucose s'incorpore préférentiellement au niveau des membranes endoplasmiques. A l'opposé, dans le cas des fibroblastes de l'embryon de poulet, l'essentiel de l'incorporation du fucose a lieu dans la phase cytoplasmique non particulaire.

Ce résultat confirme la différence déjà observée^{1,2} entre les 2 types de cellules. De plus, il est en accord avec l'hypothèse de l'indépendance des processus d'incorporation dans les cellules normales^{1,2,10-12}: suivant leur position plus ou moins interne au sein des chaînes polysaccharidiques, les glucides constitutifs des glycoprotéines pourraient être incorporés au niveau des ribosomes, des membranes endoplasmiques ou de la phase cytoplasmique non particulaire. Il est logique d'envisager que le fucose, situé en position terminale, soit incorporé dans cette dernière fraction subcellulaire.

Summary. Protein macromolecules in which the 1^{14}C -L-fucose is incorporated exist in non-specialized cancerous (KB strain) or normal (chick embryo fibroblasts) cells cultivated in vitro. The preferential site of incorporation of this precursor is located at the endoplasmic membranes for cancerous cells and in the cell sap for normal cells.

J. FROT-COUTAZ, P. LOUISOT,
R. GOT et L. COLOBERT

*Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine,
Lyon 8e (France), 10 juillet 1968.*

⁹ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).

¹⁰ P. LOUISOT, J. FROT-COUTAZ, G. BERTAGNOLIO, R. GOT et L. COLOBERT, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 28, 385 (1967).

¹¹ J. MOLNAR, G. B. ROBINSON et R. J. WINZLER, *J. biol. Chem.* 240, 1882 (1965).

¹² C. R. LAWFORD et H. SCHACHTER, *J. biol. Chem.* 241, 5408 (1966).