

DEPAUW and PARMENTIER of the Rega Institute, Louvain, Belgium (personal communication). These authors found that lactose inhibits the formation of coprostanol by *Eubacterium* ATCC-21408 (a nova species isolated from rat fecal contents, which has  $\Delta^5$ -steroid reducing capacity<sup>13</sup>) when it is present in mixed cultures with *Clostridium* (Cl-8), *Escherichia coli* or *Streptococcus faecalis*.

The exact mechanism of sugar inhibition of  $5\beta$ -reduction is not known. It could be an effect on the specific bacterial flora because of a decrease in the pH of the incubation medium due to the fermentation of the sugar by the bacteria. It also could be a 'catabolite repression effect' of sugars long known in the microbial growth and metabolism<sup>14</sup>. Studies are in progress to elucidate the nature of inhibition by sugars of coprostanol formation. This inhibition could have physiologic significance since  $5\beta$ -stanol is a major nonabsorbable product of cholesterol excreted in the feces<sup>15</sup>.

**Zusammenfassung.** Nachweis, dass die  $5\beta$ -Reduktion von [<sup>14</sup>C]Cholesterol homogenisierter Fäces durch Milch, Laktose und Galaktose gehemmt wurde, wobei die Hemmung unspezifisch war und auch mit anderen Zuckern erzielt werden konnte.

M.T.R. SUBBIAH, M. C. NAYLOR, J. SCHUMACHER and B. A. KOTTKE<sup>16</sup>

Mayo Clinic and Mayo Foundation, Rochester (Minnesota 55901, USA), 20 August 1973.

<sup>13</sup> H. EYSEN, G. PARMENTIER, F. C. COMPERNOLLE, G. DEPAUW and M. PIESSENS-DENEFF, Eur. J. Biochem., 36, 411 (1973).

<sup>14</sup> B. MAGASANIK, Symp. quant. Biol. 26, 249 (1961).

<sup>15</sup> M. T. R. SUBBIAH, Am. J. clin. Nutr. 25, 780 (1972).

<sup>16</sup> This investigation was supported in part by Research Grant No. HL-14196 from the National Institutes of Health, Public Health Service.

## Biosynthèse des glycoprotéines dans les cellules infectées par un Arbovirus III.

### Influence des conditions de la multiplication virale et de la concanavaleine A

Des travaux antérieurs<sup>1,2,3</sup> ont montré qu'au cours de la multiplication d'un Arbovirus (virus Sindbis) dans les fibroblastes d'embryon de poulet, les activités de biosynthèse glycoprotéinique étaient considérablement augmentées. Le phénomène se manifeste essentiellement au niveau des structures microsomiques. Il est spécialement net dans le cas des glucosaminyl-transférases<sup>1</sup> et des mannosyl-transférases<sup>2,3</sup>. Pour ce dernier système enzymatique, on a montré, en milieu acellulaire de biosynthèse in vitro, les différences significatives entre la mannosyl-transférase des cellules saines et son homologue des cellules infectées, pour ce qui concerne la cinétique, l'influence du pH et de la température, les constantes de Michaelis (substrat GDP-mannose), les effets des cations divalents, des nucléotides et nucléosides-di- et triphosphates, des antibiotiques et des détergents modifiant les structures membranaires (Triton X-100).

Il a paru intéressant de préciser l'influence de plusieurs paramètres de culture cellulaire ou de fonctionnement enzymatique sur cette hyperactivité de glycosylation apparaissant dans les cellules infectées par l'Arbovirus.

Les cellules fibroblastiques d'embryons de poulet âgés de 10 jours sont cultivées en couche monocellulaire en présence d'un milieu à l'hydrolysate de lactalbumine

dans des conditions précédemment décrites<sup>4,5</sup>. L'Arbovirus du groupe A utilisé (virus Sindbis, souche AR 339), entretenu sur cerveaux de souris, est introduit dans les cultures cellulaires à la 36<sup>e</sup> h, sous la forme de 3 ml d'une suspension contenant  $5 \times 10^8$  P.F.U./ml, pour un tapis cellulaire de  $15 \times 10^6$  cellules environ. Après 4 h de multiplication virale, les cellules sont récoltées par procédé mécanique, puis mises en suspension en tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7, saccharose 0,25 M, MgCl<sub>2</sub> 0,001 M. Les cellules sont ensuite broyées en milieu réfrigéré à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra-Turrax TP 18/2), fonctionnant sous 220 V, pendant 40 sec en étapes fractionnées. Les noyaux, les mitochondries et les cellules non broyées sont sédimentés en 15 min à 10 000 g. Les microsomes sont obtenus par centrifugation de 60 min à 198 500 g et conservés par congélation à -193°C.

Les systèmes microsomiques de biosynthèses des glycoprotéines comprennent: 200 µl de la suspension de microsomes en tampon Tris-maléate 0,05 M, pH 6, contenant 2 à 3 mg de protéines par millilitre, dosées par la méthode de LOWRY et coll.<sup>6</sup>; 10 µl de MnCl<sub>2</sub> (concentration finale  $5 \times 10^{-3}$  M); 10 µl d'une solution contenant  $1,3 \times 10^{-4}$  µmole de GDP-mannose <sup>14</sup>C (uniformément marqué, activité spécifique 154 µCi/µM, NEN Corporation, USA). Les incubations sont réalisées à 30°C. Au terme du temps de biosynthèse, les macromolécules glycoprotéiniques sont précipitées par addition d'acide trichloracétique (concentration finale p/v 10%) sur filtre en fibre de verre (Whatman Glass Paper, GF/B). Les précipités sont lavés par un mélange méthylal/méthanol (4/1), puis séchés pendant 1 h à 100°C. La radioactivité est évaluée en flacons normalisés de comptage en présence

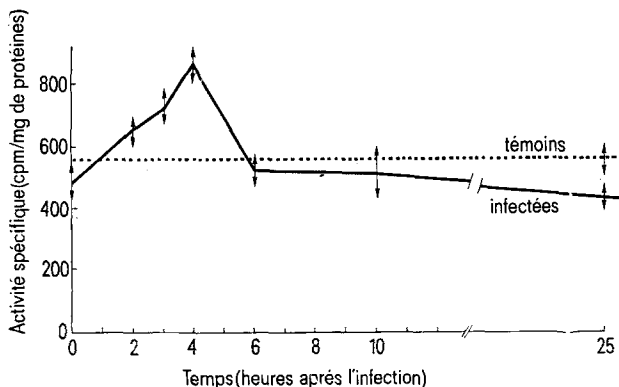


Fig. 1. Activité mannosyl-transférase microsomique en relation avec la durée de l'infection virale.

<sup>1</sup> C. FROGER et P. LOUISOT, Comp. Biochem. Physiol. [B] 43, 223 (1972).

<sup>2</sup> C. FROGER et P. LOUISOT, C. r. Acad. Sci. 274, 737 (1972).

<sup>3</sup> C. FROGER et P. LOUISOT, Int. J. Biochem. 3, 613 (1972).

<sup>4</sup> R. GOT, J. FROT-COUTAZ et P. LOUISOT, Biochim. biophys. Acta 157, 599 (1968).

<sup>5</sup> P. LOUISOT, D. LEBRE, M. B. PRADAL et R. GOT, C. r. Acad. Sci. 269, 1140 (1969).

<sup>6</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

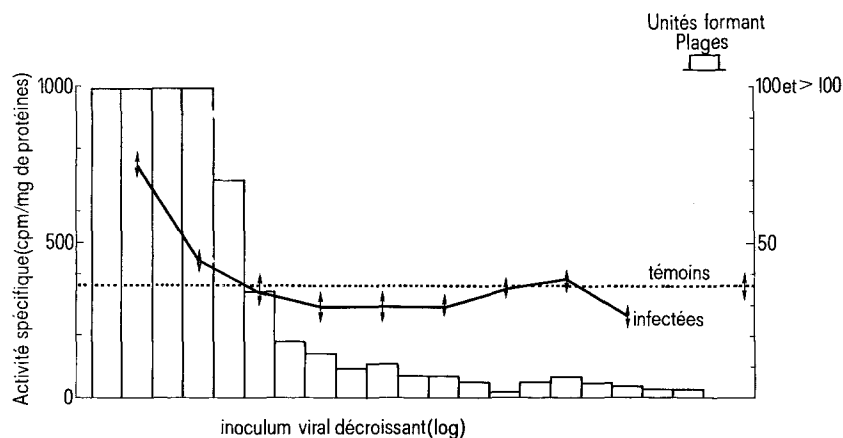


Fig. 2. Activité mannosyl-transférase en relation avec le taux d'infectiosité virale.

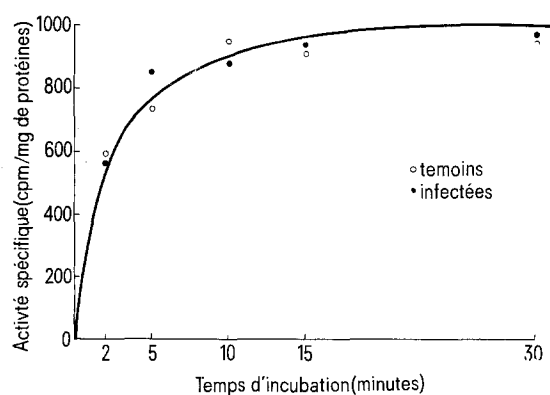


Fig. 3. Comparaison des activités de biosynthèse protéinique par les systèmes microsomiques de cellules saines et infectées.

de 5 ml de liquide scintillateur (PPO 5 g, diméthyl-POPOP 0,3 g, toluène 1 litre) dans un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb Packard).

Les taux de glycosylation des accepteurs protéiniques endogènes ont été déterminés en fonction du temps suivant l'inoculation du virus dans les cellules. Il apparaît sur la figure 1, une élévation progressive de l'activité mannosyl-transférase microsomique, atteignant un maximum à la 4e h après l'infection, et retrouvant à partir de la 6e h, un taux voisin de celui observé avec les enzymes extraits des cellules témoins.

En faisant varier la dose de virus inoculé dans les cellules, on observe que l'hyperactivité mannosyl-transférase est en bonne corrélation avec le pouvoir infectieux du virus (figure 2).

La figure 3 montre que l'hyperactivité de biosynthèse glycoprotéinique (mannosyl-transférase) n'est pas due à

un excès de biosynthèse de l'accepteur protéinique endogène, comme l'objectivent les cinétiques d'incorporation d'acides aminés  $^{14}\text{C}$  parfaitement identiques pour les microsomes des cellules saines et ceux des cellules infectées.

L'étude par électrophorèse en gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium selon la technique de WEBER et OSBORN<sup>7</sup>, après coloration des glycoprotéines selon GLOSSMANN et coll.<sup>8</sup>, conduit aux résultats schématisés sur la figure 4 qui mettent en évidence une différence des vitesses de migration des classes glycoprotéiniques synthétisées par les microsomes des cellules saines et infectées.

L'introduction de concanavaleine A, à la dose de 50  $\mu\text{g/ml}$  de milieu de culture cellulaire, en même temps que le virus (ou 1 h après), suivie d'une mesure de l'activité mannosyl-transférase microsomique après 4 h de multiplication virale en phase exponentielle, conduit aux résultats rapportés dans le tableau.

Il apparaît, à la suite de ces différentes observations:

1. Que l'hyperactivité de glycosylation (mannosyl-transférase) est en corrélation avec la cinétique de multiplication virale.
2. Que ce même phénomène est également en corrélation avec le coefficient d'infectiosité.
3. Qu'il s'agit d'une activité touchant spécialement les transferts glucidiques, sans relation avec une modification du taux de l'accepteur protéinique, ce qui confirme nos précédentes observations sur l'absence d'effet de la puromycine et du cycloheximide<sup>2,3</sup>.
4. Que l'hyperglycosylation entraîne l'apparition d'une classe de glycoprotéines absente des cellules saines.

<sup>7</sup> K. WEBER et M. OSBORN, J. biol. Chem. 244, 4406 (1969).

<sup>8</sup> H. GLOSSMANN, D. M. NEVILLE, JUN., J. biol. Chem. 246, 6339 (1971).

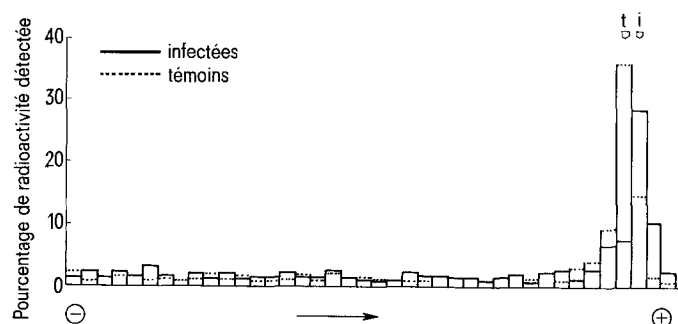


Fig. 4. Séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide (avec sodium-dodécyl-sulfate) des glycoprotéines synthétisées in vitro par les systèmes microsomiques des cellules saines et infectées.

5. Que l'action de la concanavoline A se traduit par une hyperactivité mannosyl-transférase nette chez les cellules témoins et encore plus manifeste chez les cellules infectées,

Influence de la concanavoline A (50  $\mu$ g/ml) en culture cellulaire normale et infectée, sur l'activité mannosyl-transférase microsomique, mesurée 4 h après l'inoculation virale. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation d'activité enzymatique par rapport aux témoins

Echantillon	% d'augmentation d'activité mannosyl-transférase microsomique
Cellules saines	
+ concanavoline A	+ 25%
Cellules infectées	+ 30%
Cellules infectées	
+ concanavoline A	+ 28%
Cellules infectées	
+ concanavoline A	+ 50%
1 h après le virus	

surtout si la multiplication virale débute avant l'introduction du produit dans le milieu de culture cellulaire. Ce résultat est en très bonne corrélation avec les observations de AUBERY et coll.<sup>9</sup> sur la stimulation des biosynthèses dans les lymphocytes humains, les hépatocytes et les fibroblastes d'embryons de poulet.

**Summary.** Glycoprotein biosynthesis in Arbovirus infected cells, during virus multiplication, mannosyl-transferase activity, on endogenous acceptor, is enhanced. A new glycoproteic class appears. Concanavalin A increases this mannosyl-transferase stimulation.

CHRISTINE FROGER et PIERRE LOUISOT

*Université de Lyon, Unité Médicale d'Enseignement et de Recherches Lyon-Sud, Laboratoire de Biochimie, B.P. N° 12, F-69600 Oullins (France), 27 juillet 1973.*

<sup>9</sup> M. AUBERY, J. FONT et R. BOURRILLON, Exp. Cell Res. 71, 59 (1972).

## Formation of Polycrystalline Aggregates in Mineral and Biological Systems

Polycrystalline aggregates with varying degrees of preferred orientation are found both in mineral and biological systems, e.g. satin spar and bone. Preferred orientation in mineral aggregates is generally associated with stratas that have undergone flow in the past. The preferred orientation of apatite in bone is generally assumed to result from oriented crystallization on collagen fibres. To explain the observed age-related changes in the preferred orientation of apatite in bone, it has recently been suggested that it is due to alternate stressing and relaxation of the bone during usage<sup>1</sup>. It seems possible that a similar mechanism may also be operative in the case of some mineral systems, e.g. evaporite and a moderate overall stress level will be sufficient.

To test the above suggestions, the reaction of polycrystalline gypsum aggregates to cyclic compression has been studied. Test pieces of polycrystalline gypsum were made from plaster of Paris and water. The test pieces were 6 cm long and 3 cm diameter cylinders, either solid or hollow. The wall thickness of the hollow cylinders was

5 mm. On the upper end of each test piece was placed a metal disc with a 2 mm rim to keep it in place. To protect the cylinder from being worn away by the rim, a piece of adhesive tape was wound round its upper end. The cylinder was then placed on a perspex plate and moist cotton wool was packed round it to prevent drying out during the experiment. In some experiments, a fixed load was placed on the metal disc for the entire period. In other experiments, a 200 g cylindrical load (diameter 15 mm) was mechanically dropped on to the metal disc, from a height of 2 mm, 15 times a minute. The load could be dropped either axially or off-axially on to the metal disc. When an experiment was finished, the gypsum cylinder was dried and a thin wedge-shaped piece was cleaved out at about half height of the cylinder. The 'cutting edge' of the wedge was always normal to the

<sup>1</sup> S. CHATTERJI, J. C. WALL and J. W. JEFFERY, Experientia 28, 156 (1972).

Type of cylinder	Load (g/cm <sup>2</sup> )	Period of stressing (days)	Type of stress	Position of the wedge	$\frac{I \text{ max}^a}{I \text{ min}}$	Remarks
Solid	28	28	Static	Middle	1	Random
Solid	28	14	Axial	Middle	1.5	Small degree of orientation.
Hollow	50	14	Axial	Middle of the wall	2	Small degree of orientation. The degree is uniform round the circumference
Hollow	50	14	Eccentric	3 cms vertically below the point of impact	3	Fairly high degree of orientation.
Hollow	50	14	Eccentric	Diametrically opposite position to the above sample	1	Random. Same cylinder as the above sample.

<sup>a</sup> 1 max denotes the intensity maximum in the 020 reflection of gypsum; 1 min denotes the intensity minimum in the 020 reflection of gypsum