

medium, subsequent multipolar separation of chromosomes (not to be exactly enumerated but probably octapolar division) was followed on this occasion by cytoplasmic cleavage, but not to 8 cells (Figure 7). Thus, the result of the division raised 3 to 4 cells with 1, 2 or more nuclei, respectively (Figure 8).

The chaetoglobosins isolated in crystalline form were tested by cover-glass cultures (Table). After 3 days' treatment, HeLa cells were lethally affected by all chaetoglobosins at 32 µg/ml. Chaetoglobosin C was less toxic and the approximate 50% growth inhibitory dose was about 20 µg/ml. Those of others were between 3.2 and 10 µg/ml. All these crystals induced the particular multinuclear cells which had been induced by crude extracts of the fungus. When the authentic cytochalasins were tested by the same method as above (Table), 50% growth inhibitory doses were about 1 to 3 µg/ml, that is, cytochalasins were a little more effective than chaetoglobosins. Morphologically, quite similar characteristic changes to chaetoglobosins were elicited by the samples, suggesting that chaetoglobosins and cytochalasins are similar in the biological activities on cultured cells. With chaetoglobosins cytoplasmic cleavage might also be inhibited after normal nuclear division because of the impairment of microfilament function as precisely reported in the case of cytochalasins.

When extracts of the fungus or moldy rice were injected i.p. or s.c. into DDD strain of mice, the resultant effects

were rapid and the mice died within a few minutes or hours. Histological examination of various organs revealed scarce lesion. Mice which passed through this crisis period, survived without any prominent late effect. LD₅₀ of chaetoglobosin A by a single s.c. injection was estimated as 6.5 and 17.8 mg/kg body weight (Behrens) for 5-week-old male and female mice, respectively. The reported LD₅₀ values of cytochalasin E in rats are 2.6 and 9.1 mg/kg body weight by a single i.p. or oral administration, respectively⁷.

Further chemical and biological works are now in progress and the details will be presented elsewhere.

Zusammenfassung. Nachweis, dass CHCl₃-Rohextrakte aus Myzelien und Filtraten der Zuchtmedien von *Chaetomium globosum* Kunze ex Fries einen akuten toxischen Effect auf HeLa-Zellen in vitro, sowie auf Mäuse zeigten. Chaetoglobosine, die aus Mycelium-Rohextrakt isoliert wurden und chemisch zu den Cytochalasinen gehören, induzierten in HeLa-Zellen eine Polynukleierung und multipolare Kernverteilung. Auch beim Chaetoglobosin wird eine Mikrofilament-Schädigung angenommen.

M. UMEDA, K. OHTSUBO, M. SAITO, S. SEKITA^a,
K. YOSHIHARA^a, S. NATORI^a, S. UDAGAWA^b,
F. SAKABE^b and H. KURATA^b

*Department of Carcinogenesis and Cancer Susceptibility,
Institute of Medical Science, University of Tokyo,
Minato-ku, Tokyo (Japan) and*

*Department of Phytochemistry^a and Department
of Microbiology^b, National Institute of Hygienic Sciences,
Setagaya-ku, Tokyo (Japan), 25 March 1974.*

⁷ G. BUCHI, Y. KITaura, S.-S. YUAN, H. E. WRIGHT, J. CLARDY, A. L. DEMAIN, T. GLINSUKON, N. HUNTAND, G. N. WOGAN, J. Amer. chem. Soc. 95, 5423 (1973).

Influence de la nature du milieu de croissance sur la réduction des stéroïdes par les actinomycétales

Les Actinomycétales (*Nocardia*, *Mycobacterium*) peuvent oxyder et réduire les stéroïdes. Alors que les voies métaboliques d'oxydation des stéroïdes sont assez bien connues¹⁻³, les réductions de doubles liaisons des stéroïdes, notamment en position 1, 4, 6 et 7⁴⁻¹⁰, ont été observées sans qu'il ait été possible de les relier au catabolisme oxydatif des stéroïdes. D'autre part, peu de réductases de stéroïdes ont été étudiées chez les Actinomycétales. A notre connaissance seules la $\Delta 1$ réductase de *Mycobacterium globiforme*¹¹ et la $\Delta 4$ réductase de *Nocardia corallina*¹² ont été mises en évidence dans les extraits acellulaires. Quant aux facteurs qui orientent le métabolisme des stéroïdes dans le sens oxydatif ou réducteur, ils étaient jusqu'à présent obscurs. Dans une publication antérieure¹³ nous avons signalé l'influence de la composition du milieu de croissance des cellules de *N. corallina* sur l'apparition de la $\Delta 4$ réductase. Nous rapportons ici l'étude des facteurs qui conditionnent la réduction en 4 des $\Delta 4$ céto-3 stéroïdes par *N. corallina*.

N. corallina est cultivée dans les conditions décrites précédemment¹⁰ dans 1 l de milieu A contenant 3 g de peptone, 1 g d'extrait de levure et 30 g de glucose, jusqu'en phase stationnaire (85 h) et en présence de 200 mg de progestérone (I). Après acidification, extraction au chloroforme, puis chromatographie sur couches minces de silicagel on obtient 78 mg de 5 α -pregnane-3,20-dione (II) dont les caractéristiques correspondent à celles de la littérature^{14,15}: F = 197–200°C; [α]_D + 128° (CHCl₃); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ 1720 et 1732 cm⁻¹; SM m/e 316 (M⁺). En l'absence d' α, α' -dipyridyle qui est un inhibiteur d'hydro-

xylases^{16,17} aucun métabolite oxydé ne s'accumule. Dans un milieu B, identique au milieu A, mais ne contenant que 5 g/l de glucose, après 85 h de culture, on obtient seulement 9 mg de II à partir de 200 mg de I.

¹ K. SCHUBERT, K. H. BÖHME et C. HÖRHOOLD, Z. physiol. Chem. 325, 260 (1961).

² P. TALALAY, A. Rev. Biochem. 34, 347 (1965).

³ C. J. SIH et J. WHITLOCK, A. Rev. Biochem. 37, 661 (1968).

⁴ J. J. GOODMAN, M. MAY et L. L. SMITH, J. biol. Chem. 235, 965 (1960).

⁵ Y. Y. TSONG, K. C. WANG et C. J. SIH, Biochim. biophys. Acta 93, 398 (1964).

⁶ K. SCHUBERT et G. KAUFMANN, Biochim. biophys. Acta 106, 592 (1965).

⁷ K. SCHUBERT, J. SCHLEGEL, K. H. BÖHME et C. HÖRHOOLD, Biochim. biophys. Acta 144, 132 (1967).

⁸ R. DEGHENGI, S. RAKHIT, K. SINGH, C. VEZINA et C. J. SIH, Steroids 10, 313 (1967).

⁹ G. AMBRUS, E. TOMÖRKENY et K. G. BÜKI, Experientia 24, 432 (1968).

¹⁰ G. LEFEBVRE, P. GERMAIN et R. GAY, C. r. Acad. Sci., Paris 274, 449 (1972).

¹¹ N. N. LESTROVAYA et M. I. BUKHAR, Biokhimiya 35, 843 (1970).

¹² P. GERMAIN, G. LEFEBVRE, B. BENA et R. GAY, C. r. Acad. Sci., Paris 274, 600 (1972).

¹³ P. GERMAIN, G. LEFEBVRE, B. BENA et R. GAY, C. r. Soc. Biol., Paris 166, 1123 (1972).

¹⁴ J. JACQUES, H. KAGAN et G. OURISSON, Constantes sélectionnées Ia: Stéroïdes (Pergamon Press, Oxford 1965).

¹⁵ E. VISCHER et A. WETTSTEIN, Experientia 9, 371 (1953).

¹⁶ G. WIX et K. ALBRECHT, Acta microbiol. hung. 8, 339 (1961).

¹⁷ J. M. WHITMARSH, Biochem. J. 90, 23 P (1964).

Le dosage *in vitro* de la Δ^4 réductase par la méthode que nous avons décrite précédemment¹² montre que l'activité spécifique de cette enzyme est 12 fois plus importante dans les cellules cultivées 85 h dans le milieu A par rapport aux cellules provenant du milieu B.

D'autre part, quand des cellules provenant d'une culture sur le milieu B, en l'absence de stéroïde, sont récoltées après 40 h, puis remises en suspension, après lavage, dans un tampon phosphate 0,18 M de pH 7,0 en présence d'une source de carbone et d'énergie à 20 g/l, on observe les faits suivants. Si on incube ces cellules pendant 48 h à 27°, en aérobiose, en l'absence de sources d'azote et en présence de (4-¹⁴C) progestérone (I), les pourcentages de réduction de I menant à II, en fonction de la nature de la source de carbone, sont respectivement de 39% avec le glucose, 36% avec le fructose, 11% avec l'acétate de sodium, 4% avec l'hexanoate de sodium et 3% avec l'oléate de sodium; en l'absence de source de carbone le pourcentage de réduction est de 6%. Le métabolisme des sources carbonées glucidiques dans un milieu déficient en sources d'azote stimule donc la réduction de la Δ^4 des stéroïdes.

Ces résultats sont à rapprocher de quelques observations d'auteurs^{4, 18, 19} qui avaient constaté des résultats variables dans certaines réactions d'oxydation et de réduction des stéroïdes, en fonction de la composition du milieu de culture. L'hydrogénation des stéroïdes par les *Nocardia* est sans doute liée à la capacité qu'ont ces microorganismes d'effectuer la biosynthèse d'acides gras à longues chaînes hydrogénées²⁰. Il est probable que le catabolisme des stéroïdes, oxydatif quand l'organisme utilise le stéroïde,

comme source de carbone et d'énergie, soit dévié dans le sens réducteur quand l'organisme cessant sa croissance à cause de la déficience en sources d'azote, synthétise alors des composés de réserve hydrogénés, notamment des lipides, à partir de l'excès de source glucidique. Dans ces conditions les stéroïdes hydrogénés seraient incorporés dans les lipides cellulaires²¹.

Summary. *Nocardia corallina* hydrogenates progesterone to 5 α -pregnane-3,20-dione in growth medium containing excess glucose. The Δ^4 steroid reductase appears in such conditions, in the acellular extracts. Likewise in non-proliferating cells incubated in nitrogen-deficient medium containing different carbon sources, glucidic sources stimulate hydrogenation of the Δ^4 . The significance of oxydations and reductions of steroids among Actinomycetales are discussed in relation to the metabolic characteristics of these organisms.

G. LEFEBVRE, P. GERMAIN, G. RAVAL et R. GAY

Laboratoire de Chimie Biologique I,
Université de Nancy I, C.O. 140,
F-54 Nancy (France), 26 septembre 1973.

¹⁸ K. SCHUBERT, G. KAUFMANN et C. HÖRHOOLD, *Biochim. biophys. Acta* 176, 163 (1969).

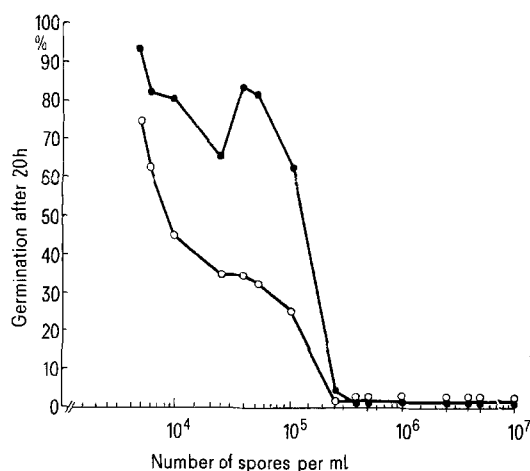
¹⁹ A. STRIJEWski, T. L. TAN, G. BOZLER, W. ZAHN et F. WAGNER, *Z. physiol. Chem.* 353, 1440 (1972).

²⁰ J. ASSELINEAU, *Les Lipides Bactériens* (Edit. Hermann, Paris 1962).

²¹ Manuscrit en préparation.

Elemental Sulfur Responsible for Self-Inhibition of Spores of *Phomopsis viticola*

Alpha spores of *Phomopsis viticola*, causal agent of dead-arm disease of grapevine, do not germinate, with or without an external nutrient source, if their concentration is greater than 5×10^5 spores/ml (Figure). This phenomenon of self-inhibition has been studied in other fungi and discussed by several authors¹⁻³. The self-inhibitor of *P. viticola* was extracted from the cirrhous with CHCl_3 -MeOH (1:1) at room temperature under continuous stirring for 2 h. Spores were removed by centrifugation



Effect of the number of spores of *Phomopsis viticola* on germination. Incubating washed spores in: ○, no nutrient (water); ●, nutrient consisting of 0.5 mg/ml of freeze-dried water-soluble matrix of *P. viticola*.

and the supernatant evaporated to dryness and re-suspended in petroleum ether (PE). The soluble phase in PE was then fractionated using a column of Kieselgel H in PE with a mobile phase consisting of a mixture of 200 ml of PE and 4 ml of diethyl ether (DE). The fraction PE-DE collected, was evaporated to dryness and re-suspended in CHCl_3 . The self-inhibitor was then purified by TLC on Kieselgel HF (250 μ) using cyclohexane- CHCl_3 (99:1). Only the spot at $R_f = 0.85$, after elution in CHCl_3 , was inhibitory to spore germination in tests using 5 mm diameter assay disks on 2% malt agar in petri plates. Mass spectrum analysis of this spot, using a Hewlett-Packard GC-MS, indicated sulfur in form of S_8 : m/e 255.8 (theoretically 255.776) (100%) with a relative intensity of 37% for the peak $P + 2$ (theoretically 35%). The mass spectrum of the compound also gives peaks corresponding to S_2 : m/e 64 (69.1%), S_3 : m/e 96 (27.7%), S_4 : m/e 128 (59.7%), S_5 : m/e 160 (40.6%) and S_6 : m/e 192 (24.2%). The final extract from a blank extraction, made by the same procedure, was not inhibitory to germination and no spot appeared to $R_f = 0.85$. As a result of this, comparisons were made between standard elemental sulfur, and self-inhibitor extracted from the cirrhous of *P. viticola*. In each case spore germination was inhibited, and chromatographic, and chemical tests gave similar results.

¹ D. GOTTLIEB, *Phytopathology* 63, 1326 (1973).

² B. T. LINGAPPA and Y. LINGAPPA, *Nature, Lond.* 214, 516 (1967).

³ A. S. SUSSMAN and H. A. DOUTHIT, *A. Rev. Plant Physiol.* 24, 311 (1973).