

Activité des N-acétyl-glucosaminyl-transférases microsomiques chez les souris BALB/c infectées par le virus de la tumeur mammaire murine (M-MTV)

Microsomal N-acetyl-glucosaminyl-transferases activity in BALB/c mice infected with mouse mammary tumor virus (M-MTV)

C. Gorka¹

Département de Recherche Fondamentale, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, 85 X, F-38041 Grenoble Cédex (France), 14 octobre 1976

Summary. N-acetyl-glucosaminyl transferase in spleen cells of mice infected with M-MTV is enhanced. This increased synthesis of glycoprotein is not due to synthesis of new enzyme. Such a result suggest that the spleen is implicated in the infecting process.

De nombreuses affections à virus s'accompagnent d'une augmentation de la biosynthèse des glycoprotéines, qu'il s'agisse de virus oncogènes ou non. En effet, l'activité des N-acétyl-glucosaminyl transférases des fibroblastes transformés SV3T3 est fortement augmentée en comparaison avec les fibroblastes normaux²; il en est de même pour les galactosyl-transférases et les mannosyl-transférases des membranes externes des fibroblastes de poulet transformés par le virus du sarcome de Rous (Schmidt, Ruppin)³. Ce phénomène n'est pas propre aux cellules transformées par des virus oncogènes, il a été décrit dans le cas de cellules infectées par des virus du type Arbovirus et Myxovirus, affectant l'activité des N-acétyl-glucosaminyl-transférases et mannosyl-transférases⁴⁻⁷.

Il a paru intéressant de préciser si de telles modifications sont induites chez les souris après infection par le virus de la tumeur mammaire murine (M-MTV), notamment

au niveau de la rate où des antigènes viraux spécifiques et une forme biologiquement active du virus ont été décelés^{8,9}.

Matériel et méthode. Les souris femelles BALB/c sont inoculées à 3 semaines avec des suspensions de virus obtenues à partir de tumeurs mammaires spontanées de la souche de souris PS, par la technique d'extract acellulaire habituelle¹⁰: chaque animal reçoit, par voie i.p., 0,25 ml de suspension virale représentant 100 mg du poids initial de tumeurs. Les souris sont sacrifiées au bout de 5, 10, 13, 17 et 24 semaines après l'infection. Les rates sont prélevées et broyées dans un tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7, saccharose 0,25 M à l'aide d'un homogénéiseur Potter-Elvehjem d'un jeu de 0,5 mm par 10 allers et retours à +4°C. Les noyaux, les mitochondries et les cellules non broyées sont sédimenstés en 15 min à 10000 × g. Les microsomes sont obtenus par une centrifugation de 105000 × g pendant 1 h et conservés à -193°C jusqu'à l'utilisation.

Le système cellulaire de biosynthèse des glycoprotéines comprend: 200 µl de la suspension de microsomes en tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 ou Tris-maléate 0,05 M pH 6, à une concentration en protéines de 2 à 3 mg par ml, mesurée par la méthode de Lowry et al.¹¹; 10 µl de MnCl₂ (concentration finale de 0,005 M); 10 µl d'une solution de N-acétyl-glucosamine ¹⁴C (activité spécifique 53,4 mCi/mM) ou de N-acétyl-galactosamine ¹⁴C (activité spécifique 25 mCi/mM) (NEN Corporation, USA) contenant respectivement 9,36 et 39 µM. Après incubation à 30°C, les produits de la biosynthèse sont précipités à l'acide trichloracétique (10% p/V) sur filtres en fibre de verre

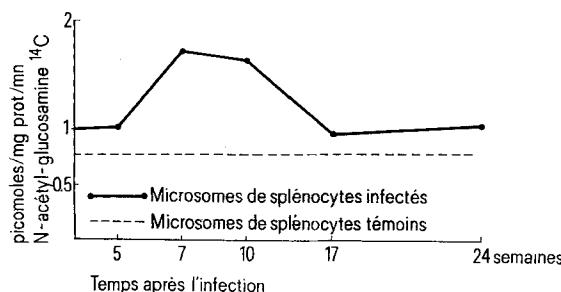


Fig. 1. Activité des glucosaminyl-transférases microsomiques spléniques en fonction du temps après l'infection.

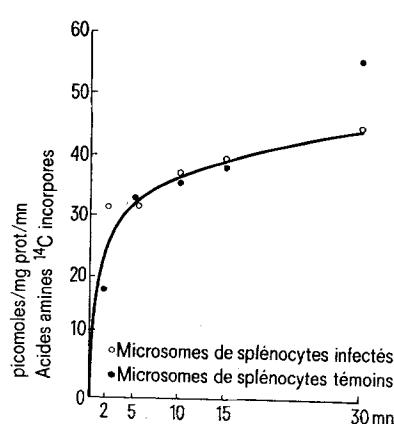


Fig. 2. Activité de biosynthèse protéinique par les systèmes microsomiques de cellules saines et infectées.

- 1 Ce travail fait partie d'une thèse de Doctorat ès-sciences préparée sous la direction de Madame le Docteur Jacqueline Mouriquand. Nous remercions le Professeur Pierre Louisot pour ses conseils fructueux dans la conduite de ce travail.
- 2 H. B. Bosmann, FEBS Lett. 8, 29 (1970).
- 3 H. B. Bosmann, K. R. Case et H. R. Morgan, Exp. Cell Res. 83, 15 (1974).
- 4 C. Froger et P. Louisot, Bomp. Biochem. Physiol. 43B, 223 (1972).
- 5 C. Froger et P. Louisot, Int. J. Biochem. 3, 613 (1972).
- 6 C. Froger et P. Louisot, Experientia 30, 250 (1973).
- 7 A. Defrene et P. Louisot, Int. J. Biochem. 4, 249 (1973).
- 8 J. H. Daams, J. Calafat, E. Y. Lasfargues, B. Kramarsky et P. Bentvelzen, Virology 41, 184 (1970).
- 9 J. Mouriquand, C. Mouriquand et C. Viala, Eur. J. Cancer 4, 563 (1968).
- 10 C. Gorka, thèse de Doctorat Es-sciences: Contribution à l'étiologie virale de la tumeur mammaire. Comportement particulier du virus isolé à partir de tumeurs mammaires murines; effet de la congélation et d'une irradiation γ . Université Scientifique et Médicale de Grenoble, février 1976.
- 11 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et J. Randall, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

(Whatman Glass paper GF/B). Les filtres sont lavés avec un mélange méthylal/méthanol (4:1), puis séchés 1 h à 100°C. La radioactivité est mesurée, en flacon de verre, en présence de 5 ml de liquide scintillateur (PPO 5 g, diméthyl POPOP 0,3 g, toluène 1 l) dans un compteur à scintillation liquide Tri-Carb Packard.

Résultats et discussion. Nous avons étudié par ce système, les cinétiques d'incorporation de N-acétyl-glucosamine et N-acétyl-galactosamine à différents stades après l'infection. Il apparaît sur la figure 1 une augmentation de

l'activité N-acétyl-glucosaminyl-transférases entre la 7^e et la 17^e semaine après l'infection avec un maximum vers la 10^e semaine. L'activité N-acétyl-galactosaminyl-transférase n'est pas modifiée.

L'augmentation de synthèse glycoprotéique n'est pas liée à une synthèse accrue de l'accepteur protéique endogène: les cinétiques d'incorporation d'acides aminés ¹⁴C montrent aucune variation quantitative de la synthèse protéique au niveau des microsomes spléniques après infection (figure 2). L'activité de la glycosylation dans les cellules saines et les cellules infectées présente un maximum pour une température et un pH voisins ($t = 40^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,2$). De plus, les constantes de Michaelis appartenantes sont très voisines pour les deux systèmes (13,2 et 12,5 μmoles) (figure 3).

Il apparaît à la suite de ces résultats: 1. Que l'hyperactivité de glycosylation (N-acétyl-glucosaminyl-transférase) est en relation avec la multiplication du virus et souligne aussi la participation de la rate dans le processus d'infection par le M-MTV, ce qui confirme nos précédentes observations révélant la présence d'une forme active du M-MTV dans les rates de souris infectées par le M-MTV. 2. Que cette hyperactivité n'est pas due à une augmentation du taux de l'accepteur protéique et ne correspond pas à l'apparition de nouvelles glucosaminyl-transférases. 2 hypothèses peuvent rendre compte de cette augmentation de biosynthèse des glycoprotéines après infection par le M-MTV. Cette augmentation reflète la synthèse nouvelle du matériel viral; la mise en évidence d'antigènes spécifiques du M-MTV dans les organes lymphoïdes et notamment la rate de souris infectées est en faveur de cette hypothèse d'autant plus qu'une au moins des glycoprotéines du virus (GP 52 000) est porteuse de l'activité antigénique MTV-s₁¹². Toutefois, l'hypothèse d'une augmentation de synthèse des glycoprotéines correspondant à une réaction de défense de l'organisme est aussi à envisager¹³.

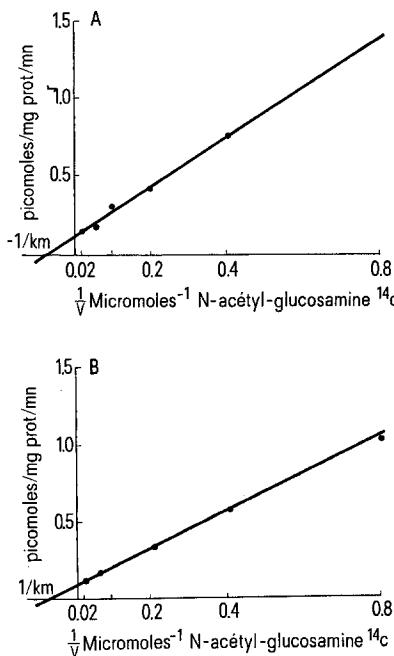


Fig. 3. Détermination de la constante de Michaelis (représentation de Lineweaver et Burk).

A Microsomes de splénocytes témoins ($\text{km} = 1,32 \times 10^{-5}$ moles).
B Microsomes de splénocytes infectés ($\text{km} = 1,25 \times 10^{-5}$ moles).

12 C. Dickson et J. J. Skehel, *Virology* 58, 387 (1974).

13 F. Squartini, *Israel J. med. Sci.* 7, 26 (1971).

Présence d'un inducteur mésodermique de la placode otique chez le poulet¹

Presence of a mesodermical inductor in chick's otic placode

P. Cuevas

Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, U. A. B. Bellaterra, Barcelona (Espagne),
15 October 1976

Summary. During chick gastrulation, the extirpation of presumptive cells of head mesenchyme impedes the otic placode's formation.

Chez les amphibiens Dalcq², Holtfreter³ et Harrison⁴ ont démontré l'existence d'un inducteur mésodermique aux premiers stades de formation de l'oreille. Jusqu'à présent, il n'a pas été démontré de manière exacte, l'existence d'un inducteur ou activant mésodermique de la placode otique chez les oiseaux. Cette étude prétend démontrer non seulement son existence, mais aussi son rôle dans les premiers stades du développement de l'oreille.

Méthode. Nous avons opéré 50 blastodermes de poulet au stade 4 de Hamburger-Hamilton⁵, cultivés *in vitro* selon la technique de Gallera⁶. Pour la localisation des cellules mésoblastiques dans la ligne primitive du poulet nous

avons utilisé la carte préconisée par Nicolet⁶. L'intervention consiste à extirper l'endomésoblaste du segment postnodal de la ligne primitive (approximativement $0,3 \times 0,5$ mm) (figure 1). Cette intervention est très délicate car les cellules mésoblastiques adhèrent à l'épiblaste qui

1 Dédicé au Professeur Orts-Llorca à l'occasion de sa retraite.

2 A. Dalcq, *Archs Anat. microsc.*, 29, 389 (1933).

3 J. Holtfreter, *Roux' Arch.* 129, 619 (1933).

4 R. G. Harrison, *Anat. Rec.* 70, 35 (1938).

5 C. Hamburger and H. L. A. Hamilton, *J. Morph.* 88, 49 (1951).

6 J. Gallera, *Experientia* 17, 134 (1961).