

pression in those tissues. Thus, impairment or deletion of R-genes, on the one hand, presumably leads to neoplastic development, whereas loss or impairment of the Tu genes in an animal or man, on the other hand, would lead to loss of tumor-inducing potential in a specific tissue; and the loss of Tu genes might represent a potential mechanism involved in reversal from hereditary tumors to normal state.

- 1 Supported by DFG through SFB 103 (Zellenergetik und Zelldifferenzierung, Marburg). We thank Käte Klinke for providing fish stocks.
- 2 C. Kosswig, *Biologia gen.* 13, 276 (1937).
- 3 M. Gordon, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 71, 1213 (1958).
- 4 F. Anders, *Experientia* 23, 1 (1967).
- 5 A. Anders, F. Anders and K. Klinke, in: *Genetics and Mutagenesis of Fish*, p. 53. Ed. J.H. Schröder. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1973.
- 6 A. Anders, F. Anders and K. Klinke, in: *Genetics and Mutagenesis of Fish*, p. 33. Ed. J.H. Schröder. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1973.
- 7 W. Lueken and W. Foerster, *Zool. Anz.* 183, 168 (1969).
- 8 W. Foerster and F. Anders, *Zool. Anz.* 198, 167 (1977).
- 9 M. Schwab, M.R. Ahuja and F. Anders, unpublished data.
- 10 M. Henze, G. Rempeters and F. Anders, *Comp. Biochem. Physiol.* 56B, 35 (1977).
- 11 M.R. Ahuja and F. Anders, *Prog. exp. Tumor Res.* 20, 380 (1976).
- 12 F. Mitelman and G. Levan, *Hereditas* 71, 325 (1972).
- 13 G. Levan, U. Ahlstrom and F. Mitelman, *Hereditas* 77, 262 (1974).
- 14 U. Ahlstrom, *Hereditas* 78, 235 (1974).
- 15 F. Mitelman, J. Mark, G. Levan and A. Levan, *Science* 176, 1340 (1972).
- 16 J.D. Rowley, *Nature* 243, 290 (1973); *J. nat. Cancer Inst.* 52, 315 (1974); in: *Genetics of Human Cancer*, p. 125. Ed. J.J. Mulvihill, R.W. Miller and J.F. Fraumeni. Raven Press, New York 1977.
- 17 L. Zech, *Int. Cancer Congr. Florence*, p. 644 (1974).
- 18 J. Mark, *Hereditas* 75, 213 (1973); *Adv. Cancer Res.* 24, 165 (1977).
- 19 M.R. Ahuja and F. Anders, in: *Recent Advances in Cancer Research: Cell Biology, Molecular Biology, and Tumor Virology*, vol. 1, p. 103. Ed. R.C. Gallo. C. R. C. Press, Cleveland 1977.

Activation de l'adénylate cyclase et ses répercussions sur le taux intracellulaire d'AMP cyclique dans les cellules KB infectées produisant du virus Sendaï infectieux sous l'influence de la trypsine

Adenylate cyclase activation and its effects on intracellular cAMP in infected KB cells during trypsin-induced infectious Sendaï virus production

Annie Guiraud-Simplot, Paulette Vallier, M. Terrier et L. Colobert

Laboratoire de Chimie Biologique et Médicale, Faculté de Médecine Alexis Carrel, Rue Guillaume Paradin, F-69008 Lyon (France), 28 décembre 1977

Summary. KB cells infected by Sendaï virus can produce infectious virus if they are trypsinated twice over 24 h. Adenylate cyclase activity in infected KB cells is higher and more strongly activated by trypsin than that of control cells, but intracellular concentration of cAMP is the same, except during a short time after trypsinations, especially after the second trypsination which causes infectious virus production. During this short time, intracellular cAMP is slightly higher in infected cells. This miseffect of adenylate cyclase activation on intracellular cAMP concentrations might be related to an increased cell permeability caused by trypsin.

Il est connu depuis les travaux de Homma¹⁻³ puis de Scheid et Choppin⁴ que l'infection des cellules en culture par le virus Sendaï, n'entraîne pas la production de virus directement infectieux pour les autres cultures de cellules où pour l'embryon de poulet, parce que, dans ces conditions, la protéolyse d'une glycoprotéine de la membrane externe du virus - étape indispensable à la maturation du virus infectieux - ne se produit pas spontanément comme c'est le cas lorsque le virus est cultivé sur embryon de poulet.

Nous même en 1964⁵ avons montré que, dans des conditions appropriées, des traitements par la trypsine des cellules KB infectées par du virus Sendaï, provoquaient la production d'une importante quantité de particules virales infectieuses.

Le fait que, d'une part, la présence des antigènes viraux entraîne des changements morphologiques⁶ au niveau de membrane plasmatique des cellules où est localisée l'adénylate cyclase et que, d'autre part, Ryan⁷ puis nous même⁸ aient montré que la trypsine activait l'adénylate cyclase des cellules traitées, nous a conduit à étudier les variations d'activité de cet enzyme et ses répercussions au niveau des taux intracellulaires d'AMP cyclique (cAMP) au cours des étapes, conditionnées par les trypsinations, qui permettent d'obtenir une importante quantité de virus infectieux à partir de cellules KB infectées mais initialement non productrices de virus sous forme infectieuse.

Matériel et méthodes. Détermination de l'activité de l'adénylate cyclase (pmoles cAMP/min/mg protéine). Après

rinçage des tapis cellulaires avec du milieu Tris 25 mM, saccharose 0,25 M, MgCl₂ 1 mM, pH=7,6, les cellules sont décollées par agitation de billes de verre et broyées au Potter, puis l'activité est déterminée selon une méthode adaptée de celle de White et Zenzer⁹ que nous avons précédemment décrite^{8,10}. Elle est dans tous les cas, proportionnelle au temps d'incubation avec l'ATP jusqu'à 20 min et à la concentration en protéine jusqu'à 1 mg.

Dosage du cAMP. Après rinçage des tapis cellulaires 3 fois avec NaCl 9‰, le cAMP est extrait par 2 ml d'acide trichloroacétique à 5%. Les cellules grattées et détachées sont éliminées par centrifugation 10 min à 7000×g. 6 traitements par 4 volumes d'éther saturé d'eau évaporés sous azote permettent d'éliminer l'acide. Les extraits aqueux lyophilisés sont remis en suspension dans KH₂PO₄ 200 mM, MgCl₂ 100 mM et caféine 100 mM, pH=6,6 pour être dosés en fonction d'une gamme d'étalonnage établie, lors de chaque dosage, par dilution isotopique selon la méthode de Gilman¹¹. Le rendement d'extraction, calculé avec (8³H)-cAMP comme étalon interne est 80±3%.

Résultats. La figure met parallèlement en évidence les variations d'activité de l'adénylate cyclase et du taux intracellulaire de cAMP. On peut remarquer tout d'abord que l'adénylate cyclase des cellules infectées a, dans l'ensemble, une activité un peu plus forte que celles des cellules témoins alors que l'on n'observe pas de différence dans les taux intracellulaires de cAMP à l'exception d'une période de quelques heures qui suit les trypsinations. On peut

remarquer également que les trypsinations activent d'une manière brusque mais brève, l'activité de l'adénylate cyclase dans tous les cas mais davantage dans les cellules infectées que dans les cellules témoins, l'action de la 2e trypsination étant plus forte que celle de la 1re. Les répercussions au niveau des taux intracellulaires de cAMP sont très fortement atténuées.

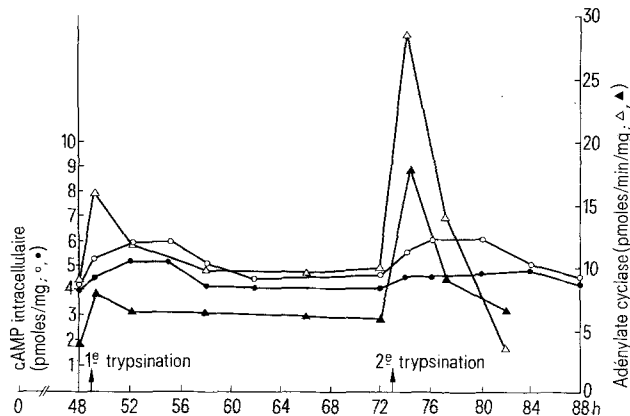
Discussion. L'étude du mécanisme d'activation de l'adénylate cyclase sous l'effet de la toxine cholérique¹⁴ a conduit à imaginer que les récepteurs spécifiques de cet enzyme pouvaient se disposer selon plusieurs configurations correspondant à des structures différentes de la membrane plasmique, ainsi, la modulation de l'activité de l'adénylate cyclase serait l'expression fonctionnelle des relations spatiales entre l'enzyme et ses récepteurs.

Dans les cellules infectées, les antigènes viraux, de part leur présence et leur mobilité dans la membrane plasmique⁶ induisent des changements morphologiques chez cette der-

nière, ce qui peut expliquer l'activité accrue de l'adénylate cyclase.

Les trypsinations activent l'adénylate cyclase d'une manière brusque mais limitée dans le temps. Nous avons précédemment montré⁸, qu'elles augmentaient l'affinité enzyme substrat ATP, probablement en faisant apparaître de nouveaux sites de fixation de substrat sur l'enzyme grâce à la protéolyse limitée qu'elles occasionnent. La trypsinase est également connue pour augmenter la perméabilité cellulaire^{15,16}. Ainsi, le cAMP synthétisé pourrait être évacué rapidement par les cellules dans le milieu de culture, mais il est difficile de vérifier cette évacuation, car le milieu de culture contient de grandes quantités de cAMP apportées par le sérum de veau. Le cAMP peut être aussi dégradé par la phosphodiesterase dont la plus grande partie est soluble dans les cellules. Il existe toutefois une fraction membranaire de cet enzyme qui peut être activée par les protéolyses ou la présence des antigènes viraux. Toutefois, les travaux récents ne sont pas en faveur de cette hypothèse, en effet: Russel et Pastan¹⁷ ont montré une altération de phosphodiesterase membranaire des fibroblastes après traitement par la trypsinase et Krizanova¹⁸ a montré une diminution d'activité de la phosphodiesterase membranaire immédiatement après la fixation du virus de la grippe.

Il est toutefois indéniable que la 2e trypsination qui occasionne la libération de virus infectieux est suivie d'une augmentation du taux intracellulaire de cAMP. L'étude de l'éventuelle influence du cAMP sur les réactions cytopathogènes des cellules infectées constituera la suite de ce travail.



Variations d'activité de l'adénylate cyclase (Δ, ▲) et du taux intracellulaire de cAMP (○, ●) des cellules témoins (●, ▲) et des cellules infectées (○, Δ) au cours des étapes permettant la libération de virus infectieux. Valeurs moyennes de 4 expériences. Erreur maximum cAMP intracellulaire ($\pm 9\%$), activité adénylate cyclase ($\pm 11\%$). Les cellules KB sont entretenues sur un milieu de Eagle BME enrichi en sérum de veau comme nous l'avons précédemment décrit⁸. Le virus Sendai est entretenu sur œuf de poule embryonné est inoculé après 24 h de culture à raison de 10^{-2} DI₅₀ par cellule (calcul sur papier log probit¹² selon la méthode de Reed et Muench¹³). Les trypsinations sont effectuées par incubation des tapis cellulaires 5 min avec 0,1% de trypsinase. La 1e n'entraîne ni réaction cytopathogène ni production de virus infectieux (titre inférieur à $10^{1,1}$ DI₅₀/ml), mais les cellules hémasorbent les hématies de poulet. La 2e entraîne la formation de syncytiums qui s'accroissent et évoluent vers la dégénérescence de la culture ainsi que la production de virus infectieux (titre compris entre $10^{5,2}$ et 10^6 DI₅₀/ml 6 h plus tard - 4 expériences).

- 1 M. Homma, *J. Virol.* 9, 829 (1972).
- 2 M. Homma et S. Tamagawa, *J. gen. Virol.* 19, 423 (1973).
- 3 M. Ohuchi et M. Homma, *J. Virol.* 18, 1147 (1976).
- 4 A. Scheid et P. W. Choppin, *Virology* 57, 475 (1974).
- 5 L. Colobert et A. Berkaloff, *Annls Inst. Pasteur* 106, 581 (1964).
- 6 Y. Okada, J. Kim, Y. Maeda et I. Koseki, *Proc. natl Acad. Sci. USA* 71, 2043 (1974).
- 7 W. L. Ryan, M. A. Short et G. L. Curtis, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 150, 699 (1975).
- 8 A. Guiraud-Simplot et L. Colobert, *Experientia* 33, 899 (1977).
- 9 A. A. White et T. V. Zenzer, *Analyt. Biochem.* 41, 372 (1971).
- 10 A. Guiraud-Simplot et L. Colobert, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 76, 963 (1977).
- 11 A. G. Gilman, *Proc. natl Acad. Sci. USA* 67, 305 (1970).
- 12 P. Bonet-Maury, A. Jude et P. Servant, *Rev. Immun.* 18, 21 (1954).
- 13 L. J. Reed et H. Muench, *Am. J. Hyg.* 27, 493 (1938).
- 14 V. Bennet, E. O'Keefe et P. Cuatrecasas, *Proc. natl Acad. Sci. USA* 72, 33 (1975).
- 15 H. J. Phillips et J. E. Terryberry, *Exp. Cell Res.* 13, 341 (1957).
- 16 H. J. Phillips, *Can. J. Biochem.* 45, 1495 (1967).
- 17 T. Russel et I. Pastan, *J. biol. Chem.* 248, 5835 (1973).
- 18 O. Krizanova, D. Lacinova et J. Knopp, *Acta virol.* 21, 97 (1977).

Some observations on bipolar filaments formed by non-muscle myosins¹

J. E. Hesketh, N. Virmaux and D. Aunis

Centre de Neurochimie du CNRS, INSERM, 11, rue Humann, F-67085 Strasbourg (France), 19 April 1978

Summary. Adrenal medullary and retinal myosins formed bipolar filaments in vitro. These filaments showed features suggesting flexibility in the rod region of the myosin molecules composing such filaments; in certain cases the myosin heads spread away from the filament backbone, in others the backbone itself was twisted. In addition the bare central backbone showed transverse striations.

Both muscle and non-muscle myosins are long, asymmetric proteins consisting of 2 globular heads and a long, helical rod^{2,3}. One of the characteristic properties of purified

myosin is its ability to form, in vitro, typically bipolar filaments under conditions of specified ionic strength. This property is exhibited equally by skeletal muscle⁴, smooth