

which rapidly reached (1 week) the specific activity found in mature mouse brain; GABA-T increased more slowly and reached about 6 μ moles/min/mg protein which corresponds to 60% of the adult mouse brain activity. Glutamate dehydrogenase (GDH) as well as glutamine synthetase (GLN-S) increased regularly for 18 days and reached the value found in adult mouse brain during the 3rd week. The relatively high GLN-S found in these cells is in agreement with the fact that this enzyme is mainly localized in astrocytes. The GABA and glutamate metabolizing enzymes showed different growth patterns during the culture period. As they are all mitochondrial (or partially mitochondrial) enzymes, this observation seems to show the existence of different mitochondrial populations perhaps corresponding to the various types of astrocytes. If PGE₁ or dBCAMP are added to the growth medium, in the absence of FCS, for 3 h, the activities of GABA-T, the GABA metabolizing enzyme and AAT, the most concentrated Glu metabolizing enzyme, are increased. Increase in GABA-T and AAT activities are respectively 35 \pm 5% and 50 \pm 3% in the presence of dBCAMP at 0.5 mM and 30 \pm 3% and 40 \pm 7% in the presence of PGE₁ at 10 μ g/ml. GDH and GLN-S did not vary, and longer action of the 2 agents (for 1 week) did not modify the activities of the 2 last enzymes. Finally, prostaglandins are known to affect cAMP concentration in neurons⁵. In our experimental conditions, PGE₁ and dBCAMP have a similar effect on glial cells as well as on their morphology and metabolic activities. As in neu-

rons, PGE₁ probably affects the cAMP concentration in glia. Modifications in neurons have been shown to be induced by a mechanism which includes new protein synthesis. Similar studies are now under investigation in our laboratory.

Abbreviations. AAT: aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1); GDH: glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.3.); GLN-S: glutamine synthetase (EC 6.3.1.2.); GABA-T: GABA-transaminase (EC 2.6.1.19.); GAD: 6L-glutamate decarboxylase (EC 4.1.1.15.); PLP: pyridoxal phosphate; GFA: glial fibrillary acidic protein; dBCAMP: dibutyryl cyclic AMP; FCS: foetal calf serum; PGE₁: prostaglandins I type.

- 1 L. Latzkovits, M. Sensenbrenner and P. Mandel, *J. Neurochem.* 23, 193 (1974).
- 2 E. Bock, M. Møller, C. Nissen and M. Sensenbrenner, *Febs Lett.* 83, 207 (1977).
- 3 J. Bardakdjian, M. Tardy, C. Pimoule and P. Gonnard, *Neurochem. Res.* 4, 517 (1979).
- 4 M. Tardy, J. Bardakdjian and P. Gonnard, *Adv. exp. Med. Biol.* 123, 177 (1978).
- 5 K. N. Prasad, *Nature New Biol.* 236, 49 (1972).
- 6 P. P. Gonnard, A. Wicker, J. C. Kouyoumdjian and M. Bloch-Tardy, *Biochimie* 55, 509 (1973).
- 7 S. Berl, *Biochemistry* 5, 916 (1966).
- 8 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).

Variations des concentrations de cAMP intracellulaire de différents types de cellules après infection par le virus Sendaï ou le virus de la stomatite vésiculeuse^{1,2}

Intracellular cyclic AMP in vesicular stomatitis or Sendaï virus infected cells

P. Vallier, J. Farjanel³, J. Bata et P. Deviller

Laboratoire de Chimie biologique et médicale, U.E.R. Alexis Carrel, rue Guillaume Paradin, F-69003 Lyon (France), et Laboratoire de Biochimie, U.E.R. de Médecine, 30, rue Ferdinand Gombon, F-42023 Saint-Etienne Cedex (France), 4 septembre 1979

Summary. In KB cells, MRC5 and adult skin fibroblasts infected by low doses of Sendaï virus, intracellular cyclic AMP levels rose and fell in the first hours following infection, then remained lower than basal level during at least 2 days in KB cells and adult skin fibroblasts. When compared to other viruses or cAMP inducers previously described, this effect appeared specific of Sendaï virus. Mechanisms and roles of cAMP variations are discussed. VSV-infected KB cells showed slightly decreased cAMP levels during the first hours following infection.

Alors que beaucoup de travaux ont été consacrés aux variations de cAMP dues à des hormones, catécholamines, prostaglandines, dans des cellules transformées ou non, très peu de résultats se rapportent aux variations de cAMP consécutives à une infection par un virus non transformant^{4,5}.

L'objet de ce travail est double: - caractériser le rôle éventuel des virus à RNA non transformants Sendaï et VSV dans l'altération du taux intracellulaire de cAMP; - comparer ces effets sur 3 types de cellules humaines: fibroblastes diploïdes embryonnaires MRC₅, fibroblastes de peau adulte, cellules KB hétéroploïdes tumorales en lignée.

Matériel et méthodes. Toutes les cellules sont cultivées dans des boîtes plastiques T 75. Les cellules KB sont cultivées en milieu de Earle à hydrolysat de caséine (Institut Pasteur) en tampon bicarbonaté (20 mmoles/l). Les cellules MRC₅ (BioMérieux) sont cultivées en milieu de Eagle (BME, Flow) en tampon bicarbonate (17 mmoles/l), additionné de

pyruvate de sodium (1 mmole/l) et d'acides aminés non essentiels (0,5 mmoles/l) (Flow). Les fibroblastes de peau sont, soit cultivés comme les MRC₅ (figure 2), soit en milieu de Earle (MEM) en tampon Hépes (17 mmoles/l) (Flow), additionné pareillement de pyruvate et d'acides aminés non essentiels. Dans tous les cas, les milieux contiennent du sérum de veau 10% (Flow), de la pénicilline (100 U/ml) et de la streptomycine (100 μ g/ml).

Le virus Sendaï (*Paramyxovirus influenzae* I, 10^{10} DI₅₀/ml) est inoculé dans le liquide allantoïque d'œufs de poule embryonnés de 10 jours, à raison de 10^4 DI₅₀ chacun. Après incubation à 37°C pendant 48 h, le liquide allantoïque est récolté: il sert à infecter les cultures cellulaires soit après centrifugation à 1000 \times g/15 min et élimination du culot (figure 1) soit après purification par adsorption sur hématies de poule selon la méthode de Homma⁶ au terme de laquelle 50-75% du pouvoir infectieux initial a été conservé (figures 2 et 3). Les cellules en culture sont infectées un jour

avant confluence (KB de 24 h, fibroblastes 72 h). Dans tous les cas, la présence de virus actif dans les cellules a été révélée par hémadsorption positive 48 h après inoculation d'un lot de 5 boîtes. Lorsque les doses inoculées sont élevées (200 DI₅₀/cellule), des syncytiums caractéristiques apparaissent dans les 24 h.

Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) est cultivé sur cellules KB. Après 5 passages successifs, les cellules sont congelées 3 fois et après centrifugation à 2000×g le surnageant (10⁷DL₅₀/ml) est utilisé dilué pour infecter les cellules.

Le titre infectieux du virus Sendaï sur œuf embryonné est déterminé en utilisant le pouvoir hémagglutinant du virus^{7,8}: la valeur de ce titre infectieux exprimé en DI₅₀/ml inoculé est connue pour être très inférieure au nombre de particules virales complètes et incomplètes.

Le titre infectieux du virus VSV sur cellules KB est calculé de la même façon en utilisant l'effet cytopathogène provoqué par le virus. Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry⁹.

Le dosage du cAMP est conduit (figure 1) soit par la méthode de Gilman précédemment décrite¹⁰, soit (figures 2 et 3) par la méthode de dosage radioimmunologique selon Harper¹¹. Deux boîtes de cellules sont utilisées à chaque temps d'infection et pour chaque dose virale, les résultats pour chacune d'elles étant la moyenne de 3 dosages.

Résultats. Les variations du cAMP intracellulaire observées sont indépendantes du degré de purification du virus Sendaï comme de la méthode de dosage employée (figu-

res 1 et 2) Ces variations sont caractérisées par 3 phases successives: - Une augmentation nette pendant les 3 premières h; - puis une chute pendant les 4 h suivantes; - enfin le maintien après la 7e h, d'une valeur inférieure à la valeur initiale, pendant au moins 2 jours pour les fibroblastes de peau et les cellules KB. Ces augmentations sont plus élevées quand la concentration de cAMP de base est plus forte (facteur moyen de multiplication 2 pour les cellules KB et 6 pour les fibroblastes). Ces variations se distinguent par leur amplitude et leur cinétique de celles observées pour les autres inducteurs de cAMP.

Un grand nombre d'inducteurs de cAMP en culture de cellules, catécholamines et prostaglandines PGE₁ en particulier, provoquent chez les fibroblastes de souris L 929 une augmentation beaucoup plus forte dès les premières min et pendant bien plus longtemps (24 h au moins)¹². L'augmentation de cAMP due à un virus de la gastroentérite pour des cellules de rein de porc¹³ est elle aussi bien plus précoce, s'annule en 1 h pour une dose infectieuse faible, mais est maintenue au moins 12 h pour une dose forte. En revanche, l'augmentation provoquée par un virus *Herpes hominis* sur cellules BHK 21¹⁴, si elle est transitoire, est deux fois plus tardive que celle observée ici sur fibroblastes de derme adulte et cellules KB. Enfin, il faut attendre 15 h avant que la concanavaline A augmente le cAMP de lymphocytes¹⁵. L'effet dose est également remarquable. Aux doses élevées, les effets deviennent atténués pour les cellules KB et les fibroblastes, contrairement aux résultats rapportés pour le virus de la gastroentérite du porc¹³, mais en accord avec les

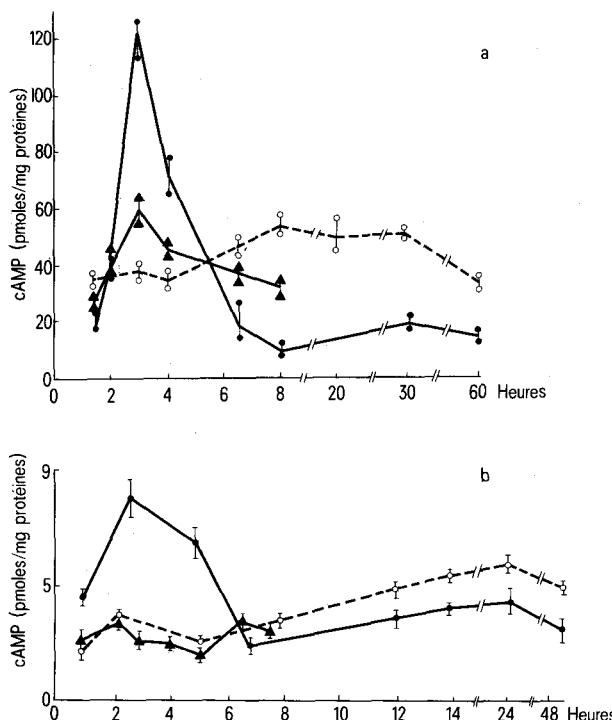


Fig. 1. Variations au cours du temps de la concentration intracellulaire du cAMP de fibroblastes de peau humaine adulte (A) et de cellules KB (B) infectées par le virus Sendaï. Le surnageant 1000×g du liquide allantoïque titré sur œuf embryonné (10^{8.5}-10⁹ DI₅₀/ml) est dilué dans le milieu sans sérum. Après élimination du milieu de culture, le tapis cellulaire est mis en contact (t₀) pendant 45 min avec la dilution de la suspension virale (●, ▲) ou la dilution analogue de liquide allantoïque non infecté (○). Ces milieux sont ensuite éliminés et remplacés par 15 ml (A) ou 20 ml (B) de milieu avec sérum. ●—●, 10⁻² DI₅₀/cellule; ▲—▲, 200 DI₅₀/cellule, ○—○, 0 DI₅₀.

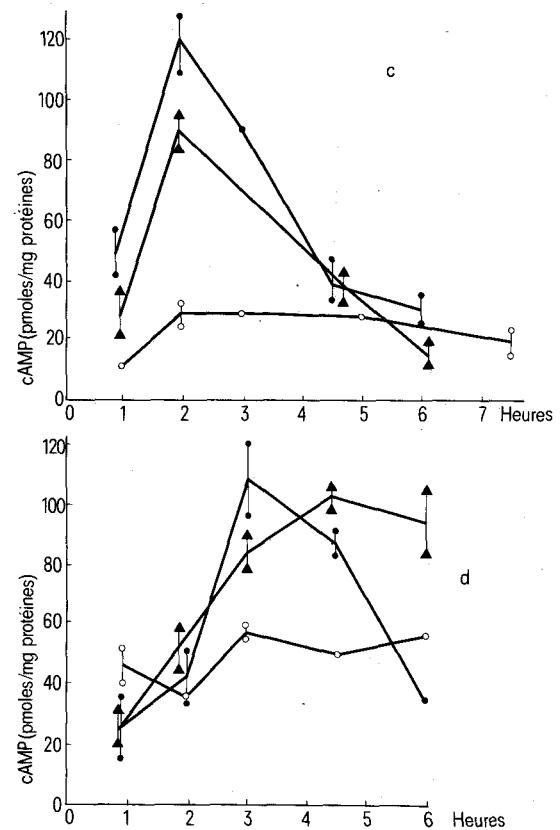


Fig. 2. Variations au cours du temps de la concentration intracellulaire du cAMP de fibroblastes de peau humaine adulte (C) et de cellules MRC₅ (D) infectées par le virus Sendaï purifié selon Homma. Le virus purifié selon Homma⁶ est dilué dans le milieu sans sérum et utilisé comme indiqué pour la figure 1. ●—●, 5 10⁻³ DI₅₀/cellule; ▲—▲, 5 10⁻¹ DI₅₀/cellule; ○—○, milieu sans sérum: 0 DI₅₀.

effets d'une dose massive de virus Sendaï sur les cellules murines d'ascites d'Ehrlich¹⁶. De ce point de vue, les fibroblastes MRC₅ se distinguent ici par une réponse seulement plus tardive, quand la dose infectieuse est plus forte. Cet effet dose paradoxal peut alors s'expliquer de 2 façons: d'une part les remaniements dans la membrane cellulaire, consécutifs à la fixation des virus sur leur site, seraient suffisamment étendus avec les fortes doses de virus pour que l'adénylate cyclase soit partiellement inhiblée¹⁷; d'autre part, les virus infectieux de l'inoculum sont certainement contaminés par une quantité bien plus élevée de virus incomplets: ces derniers, non infectieux, seraient compétitifs des virus infectieux pour les sites récepteurs sur la cellule.

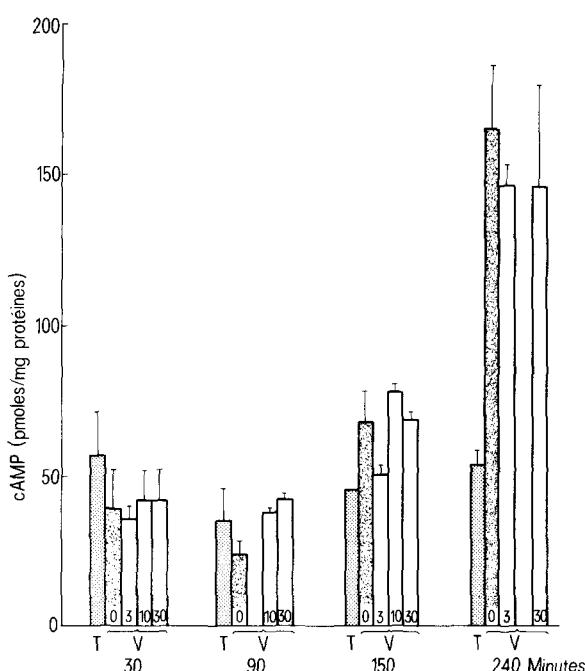


Fig. 3. Variations au cours du temps de la concentration intracellulaire de cAMP de fibroblastes MRC₅ infectés par une même quantité de virus Sendaï, préalablement inactivés par les UV pendant des durées variables. Des échantillons identiques de virus Sendaï purifié selon Homma⁶ sont soumis à l'action d'une lampe UV (254 nm, distance 10 cm) pendant des temps variables avant d'être inoculés aux fibroblastes à la même dilution, comme indiqué pour la figure 1 et 2. T: cellules témoins non infectées; V: cellules infectées (0, 3, 10, 30 = temps d'irradiation en min). Les titres infectieux sur œuf embryonné après 0, 3, 10 et 30 min d'irradiation sont respectivement de $5 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} et $10^{-6.6}$ DI₅₀/cellule.

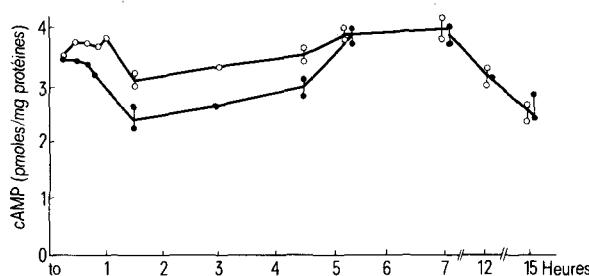


Fig. 4. Variations au cours du temps de la concentration intracellulaire du cAMP de cellules KB infectées par le virus VSV (●) et de cellules KB témoins (○) âgées de 24 h. Après élimination du milieu de culture, le tapis cellulaire est rincé par du milieu sans sérum et mis en contact 40 min avec 2 ml d'une suspension virale en milieu sans sérum titrant 10^{-2} DI₅₀/cellule. Le milieu est ensuite éliminé et remplacé par 20 ml de milieu sans sérum (t_0).

Les doses infectieuses les plus efficaces utilisées dans ce travail (10^{-2} DI₅₀/cellule titrées sur œuf) sont faibles: elles permettent d'entretenir la colonie cellulaire sur plusieurs passages successifs. Cependant des doses seulement 100 fois supérieures se sont révélées mortelles pour la culture dans les jours qui suivent l'inoculation.

Ces effets observés avec le virus Sendaï semblent donc bien particuliers. C'est ainsi que le VSV (fig.4) a révélé des effets inverses, quoique faibles, sur les cellules KB, en accord avec les résultats de Weber pour les cellules L 929¹⁸. Le cycle du VSV n'est que de quelques heures¹⁹: aussi l'effet létal de doses infectieuses faibles (10^{-2} DL₅₀/cellule) était déjà très net après 24 h et a conduit dans les jours qui suivent à la mort de l'ensemble des cellules KB.

Les variations de cAMP observées pour le virus Sendaï ne sont pas apparues dépendre essentiellement de la réplication ou de la traduction intracellulaire du génome viral intact. En effet l'inactivation par les UV pendant différents temps courts de mêmes échantillons de virus permet de diminuer de 10^3 à $10^{4.5}$ fois le titre infectieux initial: or dans ces conditions les variations de cAMP des cellules inoculées n'ont pas été sensiblement affectées (fig.3). Des durées d'irradiation aux UV de 8 h et plus ont permis d'annuler complètement le titre infectieux ainsi que les variations de cAMP: or ce traitement a également pu altérer les protéines virales responsables de la fixation initiale des virus sur la membrane cellulaire.

Enfin, le rôle des variations transitoires de cAMP décrites reste à éclaircir. Elles pourraient provoquer, comme la concanavaline A sur lymphocytes, une synthèse d'acides nucléiques¹⁵. Elles pourraient également intervenir dans la stimulation de l'activité interféron: Weber a montré¹⁸ que l'adjonction de cAMP à des cellules L 929 (de l'ordre de 1 mmole/l) augmente significativement la production d'interféron.

- 1 Ce travail a bénéficié de l'aide du CNRS (RCP No.08533) et d'une aide aux équipes de Jeunes Chercheurs de la Mission à la Recherche du Ministère des Universités (bénéficiaire J. Far-janel).
- 2 Les auteurs remercient Madame le Professeur O. Gaudin pour ses conseils et ses encouragements.
- 3 Laboratoire de Biochimie, F-42023 Saint-Etienne.
- 4 O. Krizanova, D. Kociskova et J. Oudruskova, *Acta Virol.* 20, 283 (1976).
- 5 J. E. Zimmerman, R. Glaser et F. Rapp, *J. Virol.* 12, 1442 (1973).
- 6 Homma et Ohuchi, *J. Virol.* 12, 1458 (1973).
- 7 P. Bonnet-Maury, A. Jude et P. Servant, *Revue Immunol.* 18, 21 (1954).
- 8 L. Reed et H. Muench, *Am. J. Hyg.* 27, 493 (1938).
- 9 O. H. Lowry, M. J. Rosebrough, A. C. Farr et R. J. Randall, *J. biol. Chem.* 265, 193 (1951).
- 10 A. Guiraud-Simplot, P. Vallier, M. Terrier et L. Colobert, *Experientia* 35, 30 (1979).
- 11 J. F. Harper et G. Brooker, *J. cyclic Nucleot. Res.* 1, 207 (1975).
- 12 V. Manganiello et M. Vaughan, *Proc. natl Acad. Sci. USA* 69, 269 (1972).
- 13 N. K. Mishra, W. L. Ryan et S. N. Chaudhuri, *Arch. Virusforsch.* 41, 280 (1973).
- 14 K. Bittlingmaier, D. Schneider et D. Falke, *Biochim. biophys. Acta* 477, 228 (1977).
- 15 Wang Tingchung, J. R. Sheppard et J. E. Foker, *Science* 201, 155 (1978).
- 16 K. Ohki, S. Nakama et A. Asano, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 67, 331 (1975).
- 17 V. Bennet, E. O'Keefe et P. Cuatrecasas, *Proc. natl Acad. Sci. USA* 72, 33 (1975).
- 18 J. M. Weber et R. B. Stewart, *J. gen. Virol.* 28, 363 (1975).
- 19 R. Wagner, in: *Comprehensive virology* p. 1. Ed. C. Fraenckel, 1975.