

LES CONSEQUENCES DE L'INFECTION PAR LE ROTAVIRUS SUR L'ADRESSAGE BASOLATERAL DES PROTEINES DANS LES CELLULES EPITHELIALES POLARISEES CACO-2.

ADEL AYARI, ISABELLE BEAU, JACQUELINE COTTE-LAFFITE,
ANNE MARIE QUÉRO & ALAIN SERVIN*

Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 510, Faculté de Pharmacie,

Université Paris XI, 92152 Châtenay-Malabry Cedex, France.

* Adresse : INSERM U-510, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément,
92152 Châtenay-Malabry Cedex, France.

Résumé

Les rotavirus entraînent des gastro-entérites sévères chez le jeune enfant et le nouveau né. Les mécanismes conduisant au déclenchement de la diarrhée ne sont pas connus.

Plusieurs études réalisées au laboratoire sur les cellules Caco-2 ont montré que l'infection à rotavirus (RRV) induit des altérations structurales et fonctionnelles, notamment une diminution de l'activité enzymatique de certaines hydrolases apicales. D'autres travaux rapportent également une diminution de l'activité de certaines protéines basolatérales. Nous nous sommes donc intéressés aux conséquences de l'infection par le rotavirus sur l'adressage basolatéral des protéines dans les cellules épithéliales polarisées Caco-2, en utilisant comme modèle une protéine qui n'est pas exprimé normalement dans les cellules Caco-2, le récepteur de la FSH (FSHR). Dans un premier temps, nous avons établis dans les cellules Caco-2 une lignée stable qui exprime le récepteur de la FSH. Nous avons montré que l'infection n'altère ni la

biosynthèse, ni la maturation du FSHR exprimé dans les cellules Caco-2. D'autre part, nous avons montré par Western Blot que l'infection par le RRV n'a pas d'effet sur le pool du FSHR en place à l'état stationnaire. L'immunofluorescence indirecte couplée à la microscopie confocale, nous a permis d'observer, que le rotavirus n'affecte pas la distribution basolatérale du FSHR. Ceci a été confirmé par l'immunoprécipitation de surface.

Mots clés: Rotavirus, gastro-entérites, Caco-2, récepteur de la FSH, saccharase-isomaltase.

Introduction :

Les rotavirus entraînent des gastro-entérites sévères chez le jeune enfant et le nouveau-né. Les mécanismes conduisant au déclenchement de la diarrhée sont encore mal connus. Plusieurs études ont montré que l'infection par le rotavirus entraîne des altérations structurales et fonctionnelles des entérocytes, cellules cibles des rotavirus (Louvard, 1992). Des études réalisées à partir de biopsies intestinales humaines et animales ont mis en évidence la diminution d'activité de certaines hydrolases exprimées à la surface apicale des entérocytes, telle que la saccharase-isomaltase (Jourdan, 1998).

Au laboratoire, il a été montré que la diminution d'activité de la saccharase-isomaltase est liée à un défaut d'adressage à la membrane apicale. En effet, l'infection par le rotavirus perturbe le transport du réseau trans-Golgi jusqu'à la bordure en brosse (Jourdan, 1998).

Jusqu'à présent, aucune altération de l'adressage basolatéral n'a été rapportée lors de l'infection par le Rotavirus. Pourtant un certain nombre de protéines comme par exemple les pompes $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ qui régule le gradient de sodium ou $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}$

qui maintient le gradient de chlore sont exprimées au niveau de la membrane basolatérale. Plusieurs études rapportent d'ailleurs une diminution de l'activité de la Na⁺-K⁺-ATPase lors de l'infection par le rotavirus (Lundgren, 2001).

Au cours de ce travail, nous avons étudié les conséquences de l'infection par le rotavirus sur l'adressage basolatéral des protéines dans les cellules épithéliales polarisées. Pour cela, nous avons utilisés des cellules Caco-2. Comme modèle protéique, nous avons utilisés le récepteur de la FSH.

Matériel et méthodes :

Culture des cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 sont cultivées en milieu Essentiel Minimal Eagle (MEM) modifiée par Dulbecco (DMEM) supplémenté de 15% de sérum de veau fœtal décomplémenté et de 1% d'acides aminés non essentiels. Elles sont incubées à 37°C en atmosphère air-10% de CO₂ et maintenues en culture par repiquages successifs tous les 7 jours.

Transfection des cellules Caco-2 :

Les cellules Caco-2ensemencées à 10⁶ cellules par boîte de Pétri sont transfectées avec le vecteur d'expression pSG5-FSHR (18µg d'ADN) codant h-FSHR et le vecteur de résistance à la néomycine pSV-néo (2µg d'ADN), par la technique au phosphate de calcium.

Souche virale :

La souche virale utilisée est la souche de Rotavirus RRV (Rhesus Rotavirus) d'origine simienne et de sérougroupe A.

Pour pénétrer dans les cellules, le virus doit être activé. Pour cela, on utilise la trypsine qui permet le clivage de la protéine virale de la capside externe VP4 en VP5 et VP8.

Infection des cellules Caco-2/R-FSH par le RRV :

L'inoculum viral est dilué dans du milieu contenant 0.5µg/ml de trypsine à 10 m.o.i (Multiplicity Of Infection) et déposé sur le tapis cellulaire sous un faible volume.

Les tapis cellulaires non infectés destinés à servir de témoins sont traités pendant des temps similaires avec du milieu DMEM sans sérum de veau foetal additionné de trypsine (0.5µg/ml).

Le temps total d'infection est de 18h à 20h.

Immunofluorescence indirecte :

Les cellules Caco-2/R-FSH sont cultivées sur des filtres en plaque de 12 puits et infectées par le RRV pendant 18h. Elles sont lavées 3 fois avec du PBS et fixées pendant 15 minutes par la Paraformaldehyde à 3%. Après 2 lavages, les groupes aldéhydes sont saturés avec du PBS, 50mM NH₄Cl, pendant 30 minutes. Après 1 heure de saturation avec du PBS, 1% BSA pour bloquer les sites non spécifique de liaison à l'anticorps, les cellules sont incubées pendant 2 heures à température ambiante avec un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur de la FSH, dilué dans du PBS, 1% BSA (FSHR 323: 5µg/ml).

Après lavages avec du PBS, 0,1% Tween 20, les cellules sont perméabilisées au triton et incubées pendant une heure avec un anticorps polyclonal de lapin anti-rotavirus au 1/500ème dans du PBS, 1% BSA. Après lavages avec du PBS, 0,1% Tween 20, les cellules sont incubées pendant une heure avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (antimouse-FITC, antirabbit-TRITC) au 1/100ème. Les cellules sont lavées avec du PBS, 0,1% Tween 20 et du PBS. Les filtres sont excisés et montés entre

lame et lamelle avec un milieu de montage spécifique pour la fluorescence (DAKO).

L'immunopurification du récepteur de la FSH exprimé dans les cellules Caco-2 infectées par le RRV est analysé par Western Blot.

Résultats :

Après avoir établi la lignée cellulaire Caco-2 qui exprime le récepteur de la FSH, nous avons voulu vérifier la structure du récepteur de la FSH.

A partir d'un extrait cellulaire, nous avons réalisé une immunopurification du récepteur de la FSH suivie d'une analyse par Western Blot avec l'anticorps FSHR 156 qui reconnaît un autre épitope dans le domaine extracellulaire du FSHR.

Comme le montre la figure 1 deux bandes sont observées, une bande de 81kDa qui correspond à la forme précurseur riche en résidus mannose, plus importante que celle de 87kDa qui correspond à la forme mature glycosylée.

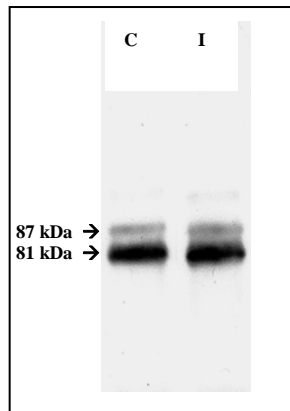


Figure 1 : le récepteur de la FSH a été immunopurifié avec l'anticorps FSHR 323 et analysé par Western Blot avec l'anticorps FSHR 156. C : cellules témoins, I : cellules infectées

Etude de la biosynthèse et la maturation du récepteur de la FSH dans les cellules Caco-2 infectées par le rotavirus :

Le récepteur de la FSH est synthétisé dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'un précurseur riche en mannose. Après une série de glycosylations dans l'appareil de Golgi, il acquiert sa forme mature pour être adressé via des vésicules à la surface membranaire.

Nous avons effectué cette étude sur des cellules Caco-2 différenciées et infectées ou non par le rotavirus pendant 18h. Nous avons réalisé un marquage métabolique avec de la méthionine marquée au soufre 35 suivie d'une chasse de temps variables.

On peut voir sur la figure 2 que le récepteur de la FSH est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 81kDa. Cela correspond à la forme riche en mannose. Il acquiert ensuite ses glycosylations finales lors de son passage dans l'appareil de Golgi pour donner la forme mature de 87kDa. Celle-ci est visible dès la 1^{ère} heure de chasse. Après deux heures de chasse, la forme précurseur commence à diminuer et au bout de la troisième heure, la forme mature est majoritaire.

On n'observe pas de différence dans le processus de maturation du récepteur de la FSH entre les cellules témoins et infectées par le RRV.

Donc la biosynthèse et la maturation du récepteur de la FSH exprimé dans les cellules Caco-2 ne sont pas altérées par l'infection par le rotavirus.

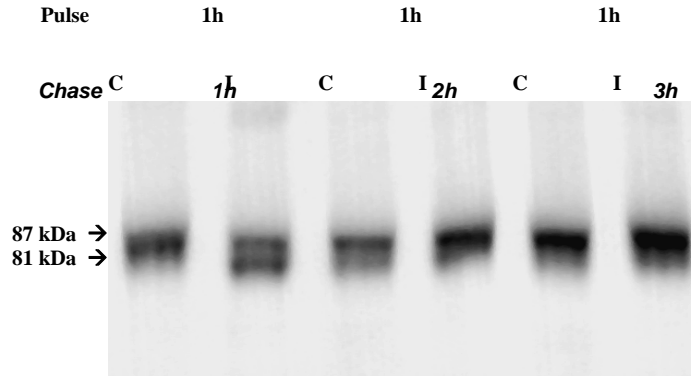


Figure 2 : Etude de la biosynthèse et de la maturation du récepteur de la FSH exprimé dans les cellules Caco-2. Les cellules subissent un marquage métabolique suivi d'une chasse de temps variable.

T: cellules témoins I: cellules infectées

Etude de la distribution membranaire du récepteur de la FSH dans les cellules Caco-2 infectées par le rotavirus :

Physiologiquement, le récepteur de la FSH a une distribution basolatérale dans ses cellules cibles (cellules de Sertoli du testicule). Cette distribution basolatérale est retrouvée lorsqu'il est exprimé dans des cellules épithéliales polarisées hétérologues (Beau, 1998).

Nous avons donc voulu voir si l'infection par le RRV altère la distribution basolatérale du récepteur de la FSH, dans les cellules Caco-2. Nous avons tout d'abord utilisé une technique d'immunofluorescence indirecte suivie d'une observation en microscopie confocale.

On observe un marquage uniquement dans le domaine basolatéral des cellules témoins. Comme le montre la section XY (fig. 3), le marquage est en réseau, ce qui est caractéristique d'une distribution basolatérale. Ceci est confirmé sur la coupe XZ qui montre un renforcement latéral et basal du marquage. Donc le récepteur de la FSH est bien présent au niveau basolatéral des cellules Caco-2 non infectées.

Ensuite, la distribution du récepteur a été étudiée dans les cellules Caco-2 infectées par le RRV. Un marquage rouge qui correspond aux protéines virales est observé dans environ 80% de cellules. En ce qui concerne le marquage du récepteur de la FSH, comme dans les cellules témoins, on n'observe un marquage que dans le domaine basolatéral des cellules. La coupe XY montre un marquage en réseau mais le tapis cellulaire semble moins bien organisé. Cela est mieux visible sur la coupe verticale où un chevauchement des couches est observé. En effet on remarque que la coupe passe dans différentes cellules qui ne sont pas dans le même plan, ce qui rend difficile l'interprétation.

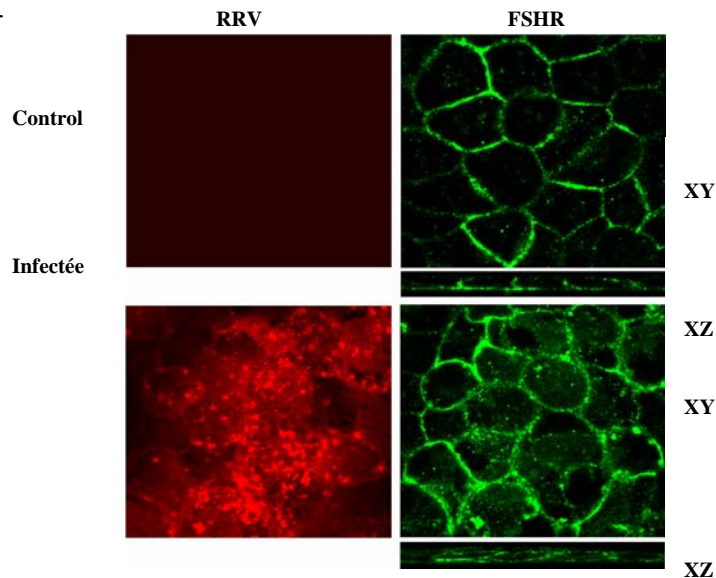


Figure 3 : Etude de la distribution membranaire du récepteur de la FSH dans les cellules témoins et infectées par le RRV pendant 18h.
 - Marquage en vert du récepteur de la FSH.
 - Marquage en rouge des protéines virales.

Nous avons ensuite eu une approche quantitative par une technique biochimique d'immunoprécipitation de surface du récepteur de la FSH.

Les résultats obtenus (fig. 4), montrent clairement l'absence de toute bande, lorsque l'anticorps est ajouté dans le compartiment apical des cellules témoins et infectées. Par contre, en l'ajoutant dans le compartiment basolatéral, on détecte une bande de 87kDa qui correspond à la forme mature du récepteur de la FSH. Celui-ci est donc exprimé en totalité et en quantité équivalente au niveau de la surface basolatérale des cellules Caco-2 infectées ou non par le rotavirus.

On peut conclure, que le rotavirus n'affecte pas la distribution du récepteur de la FSH exprimé dans les cellules Caco-2.

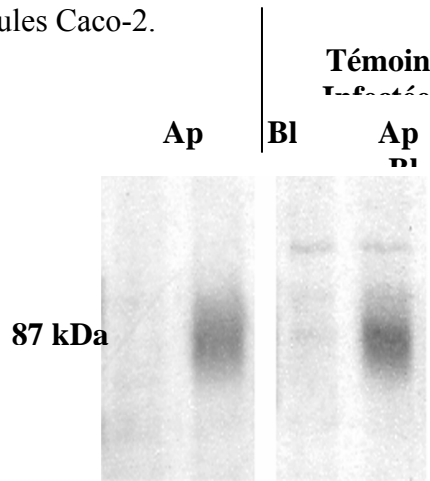


Figure 4 : Etude de l'adressage du récepteur de la FSH néosynthétisé exprimé dans les cellules Caco-2. Les cellules subissent un marquage métabolique suivi d'une chasse de temps de 3h et d'une immunoprécipitation de surface.

- Ap: apical - Bl: basolatéral

Le rotavirus n'altère pas la voie d'adressage basolatéral dans les cellules Caco-2.

Discussion :

Il a été montré que les fonctions gastro-intestinales sont influencées par l'intégrité et la maintenance de la polarisation des cellules épithéliales intestinales (Louvard, 1992). Des résultats récents obtenus sur des cellules intestinales polarisées Caco-2 infectées par le RRV ont montré que ce dernier induit des défauts sur des protéines fonctionnelles de la bordure en brosse sans que la viabilité ou l'intégrité des cellules soit altérée (Jourdan, 1998).

Il a été montré par les travaux de N. Jourdan (1998), que le rotavirus altère une hydrolase dans les cellules Caco-2, la saccharase-isomaltase. Cette altération, liée à un défaut d'adressage apical est due à un blocage du transport direct du complexe Golgi vers la bordure en brosse. Au cours de cette étude, nous avons étudié les conséquences de l'infection par le rotavirus sur l'adressage basolatéral des protéines dans les cellules épithéliales polarisées, Caco-2.

Comme modèle protéique nous avons utilisé le récepteur de la FSH qui n'est pas exprimé normalement dans les cellules Caco-2. On aurait pu par exemple utiliser comme modèle la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}$ exprimée à la surface basolatérale des cellules Caco-2, mais récemment des travaux ont montré que l'expression basolatérale de cette pompe est régulée par une PKC dont la nature n'est pas encore connue (Matthews, 2002). Or, on sait que l'infection par le rotavirus entraîne l'activation d'une PKC, Ca^{+2} dépendante (Brunet, 2000) et même de la PKA (Martin-Latil, 2004).

L'expression du récepteur de la FSH n'étant régulée par aucune de ces protéines kinases, son utilisation présentait l'avantage de pouvoir tester directement la voie d'adressage basolatéral.

Nous avons établis une lignée cellulaire Caco-2 stable qui exprime le récepteur de la FSH. Nous avons mis en évidence une structure correcte du récepteur de la FSH. La forme précurseur riche en mannose est présente en quantité plus importante que la

forme mature glycosylée exprimée à la surface des cellules Caco-2. Cela pourrait provenir d'une saturation de la machinerie cellulaire due à la surexpression du récepteur de la FSH. La même observation a été faite lorsque le FSHR a été exprimé dans un autre type cellulaire polarisé (MDCK) (Beau, 1998).

Nous n'avons mis en évidence aucun défaut de biosynthèse ou de maturation du récepteur de la FSH lors de l'infection par le rotavirus. Dans le cas de la saccharase-isomaltase, la dipeptidyl peptidase IV, ou encore la γ -glutamyltranspeptidase, la biosynthèse n'était pas non plus altérée lors de l'infection par le rotavirus (Jourdan, 1997).

Pourtant, Xu et al., (2000), ont montré que la protéine non structurale NSP4, interagit directement avec les microtubules et bloque ainsi le transport des protéines entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Or, nos résultats, montre qu'il y a la même quantité de récepteur de la FSH à la surface des cellules Caco-2 infectées ou non par le rotavirus. Aucune accumulation intracellulaire du précurseur due au blocage du transport entre le RE et l'appareil de Golgi, n'est observée. L'infection par le rotavirus ne génère donc pas les mêmes effets que l'apport exogène de NSP4.

En utilisant deux approches différentes, l'immunofluorescence indirecte et l'immunoprécipitation de surface, nous n'avons mis en évidence aucune altération de l'adressage basolatéral du récepteur de la FSH. Le rotavirus ne semble donc pas avoir d'effet sur la voie d'adressage basolatéral. Son effet semble beaucoup plus important sur la voie d'adressage apicale (Jourdan, 1997). Ceci est probablement dû au fait qu'il est sécrété hors de la cellule par le pôle apical.

Différentes études (Lundgren, 2001) montrent que l'activité enzymatique de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ qui subit un adressage basolatéral, est diminuée lors de l'infection par le RRV.

Nos résultats laissent penser que cette diminution d'activité n'est pas

consécutives à une diminution de l'expression de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ à la surface basolatérale puisque la biosynthèse et l'adressage basolatéral des protéines ne sont pas altérés par l'infection RRV. Il pourrait donc s'agir d'un effet sur l'activité même de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.

Conclusion :

Plusieurs études menées au laboratoire visant à mieux comprendre la physiopathologie des infections à rotavirus ont mis en évidence dans les cellules Caco-2 des altérations structurales et fonctionnelles.

Au cours de ce travail, nous avons montré que l'infection par le rotavirus n'altère pas la biosynthèse, ni la maturation du récepteur de la FSH. Nous avons également observé que la distribution basolatérale du FSHR n'était pas altérée par le virus.

La voie d'adressage basolatéral n'est donc pas altérée dans les cellules Caco-2 infectées par le rotavirus.

Nous disposons d'un récepteur de la FSH délété de son signal d'adressage basolatéral. Ce récepteur tronqué a une distribution apicale dans les cellules épithéliales polarisées. Il sera donc intéressant d'explorer la voie d'adressage apical lors de l'infection par le rotavirus en utilisant cette protéine comme marqueur.

Références bibliographiques :

- BEAU, I., GROYER-PICARD, M. T., LE BIVIC, A., VANNIER, B., LOOSFELT, H., MILGROM, E., AND MISRAHI, M. 1998.** The basolateral localization signal of the follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem* 273 (29), 18610-6.
- BRUNET, J. P., COTTE-LAFFITTE, J., LINXE, C., QUERO, A. M., GENITEAU-LEGENDRE, M., AND SERVIN, A. 2000.** Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration. *J Virol* 74 (5), 2323-32.
- JOURDAN, N., BRUNET, J. P., SAPIN, C., BLAIS, A., COTTE-LAFFITTE, J., FORESTIER, F., QUERO, A. M., TRUGNAN, G., AND SERVIN, A. L. 1998.** Rotavirus infection reduces sucrase-isomaltase expression in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton. *J Virol* 72 (9), 7228-36.
- JOURDAN, N., MAURICE, M., DELAUTIER, D., QUERO, A. M., SERVIN, A. L., AND TRUGNAN, G. 1997.** Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol* 71 (11), 8268-78.
- LOUWARD, D., KEDINGER, M., AND HAURI, H. P. 1992.** The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. *Annu Rev Cell Biol* 8, 157-95.
- LUNDGREN, O., AND SVENSSON, L. 2001.** Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect* 3 (13), 1145-56.
- MARTIN-LATIL, S., C.-L. J., BEAU I., QUERO A. M., GENITEAU-LEGENDRE M. AND SERVIN A. L. 2004.** A cyclic AMP-Protein Kinase A-Dependent mechanism by which Rotavirus impairs the expression and enzyme activity of brush-border associated Sucrase-Isomaltase in differentiated intestinal caco-2 cells. *Cellular Microbiology*.
- MATTHEWS, J. B. 2002.** Molecular regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) and epithelial chloride secretion. *World J Surg* 26(7), 826-30.

XU, A., BELLAMY, A. R., AND TAYLOR, J. A. 2000. Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules. *Embo J* 19 (23), 6465-74.