

# 126. MODIFICATIONS PRÉCOCES DE L'ACTIVITÉ ADÉNYLATE CYCLASIQUE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES BUCCALES DE VEAU MISES EN PRÉSENCE DU VIRUS DE LA STOMATITE VÉSICULEUSE.

F. Duret\*, O. Creach, Y. Beaudry, J. Frappa\*  
et R. Fontanges (\*\*)

## INTRODUCTION

Disposant d'une méthode de culture qui permet d'obtenir des quantités importantes de cellules épithéliales buccales de veau exemptes de fibroblastes, nous avons utilisé ce matériel pour la recherche des modifications métaboliques précoces induites par la fixation virale. Après avoir examiné les variations d'activité de certaines enzymes du catabolisme glucidique (1), nous nous sommes intéressés plus particulièrement à une enzyme de la membrane plasmique, l'adénylate cyclase (2, 3).

\* UER Odontologie. Lyon.  
\*\* Avec la collaboration technique de M. POULET.

Peu d'études ont été consacrées jusqu'à présent à l'activité adénylate cyclasique des cellules épithéliales en culture ; elles concernent essentiellement des cellules hétéroplôides. Il était donc important, avant de mesurer les effets de la fixation virale, de préciser les principaux paramètres de la cinétique enzymatique.

Il fallait également, pour disposer d'un modèle expérimental cohérent, choisir un virus dont le pouvoir infectieux vis-à-vis des cellules épithéliales buccales fut déjà démontré. Tels sont les deux buts poursuivis dans cette étude.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Cellules

Nous avons utilisé des cellules épithéliales buccales de foetus de veau cultivées en boîte de Roux sur milieu E de Williams contenant 10 % de sérum de veau foetal. Les conditions de prélèvement et de culture des cellules ont déjà été décrites (4).

### Virus

Il s'agissait d'un rhabdovirus, le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), souche IFFA n° 21 277, entretenue sur cellules épithéliales buccales de veau foetal. Après lyse des cellules par trois congélations et décongélations successives, les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 7 000 g. Le surnageant contenant les particules virales en suspension a été conservé à -70°C, à l'obscurité, puis décongelé, toujours à l'obscurité, par chauffage au B.M. à 37°C. Le titre infectieux de la suspension utilisée était d'environ 10<sup>11</sup> DI<sub>50</sub> par ml.

Une suspension de virus inactivé par chauffage à 56°C pendant 30 minutes (Vi) a été utilisée parallèlement à la suspension de virus actif (Va). On a vérifié que Vi ne provoquait pas de lésions cytopathiques après 72 heures de contact avec un tapis de cellules épithéliales buccales.

### Mesure de l'activité adénylate cyclasique

Nous avons suivi la technique de POHL et coll. (5) qui consiste à mesurer la quantité d'<sup>32</sup>P-AMP<sub>c</sub> synthétisée à partir d'<sup>32</sup>P-ATP par les membranes cellulaires isolées, en utilisant le système phosphoenolpyruvate - pyruvate kinase pour régénérer l'<sup>32</sup>P-ATP dégradé par les ATPases et la théophylline pour empêcher l'hydrolyse de l'AMP<sub>c</sub> par les phosphodiesterases.

Chaque série de dosages comportait deux tubes témoins contenant une suspension de membranes inactivées par chauffage à 100°C pendant 10 minutes. Tous les tubes ont été placés dans un bain-marie à 37°C pendant 8 minutes, la réaction enzymatique étant alors bloquée par chauffage à 100°C pendant 3 minutes. Après centrifugation à 1 500 g pendant 5 minutes pour éliminer les membranes, l'AMP<sub>c</sub> présent dans le surnageant a été séparé par chromatographie sur alumine active suivant la méthode de WHITE (6), puis dosé à l'aide d'un compteur à scintillations liquide Intertechnique SL-4 000. L'activité enzymatique est exprimée en picomoles d'AMP<sub>c</sub> formées par minute et par mg de protéines.

**Étude des principaux paramètres de la réaction enzymatique.**

Nous avons vérifié successivement l'influence du temps d'incubation et de la température sur la cinétique enzymatique, en utilisant un excès de substrat (environ 10 Km) et un milieu tamponné à pH 7,6. Cette valeur optimale du pH a été choisie après des essais effectués en tampon Tris-HCl 25 mM pour la zone de pH comprise entre 6 et 9 et en tampon Tris-Maléate pour la zone de pH allant de 5,2 à 8,6.

Les effets de la concentration en substrat ont été étudiés en faisant varier la concentration en ATP entre 0,05 et 5 mM, celle de Mg++ étant fixée à 10 mM de manière à avoir une cinétique michaelienne. La constante de Michaelis a été déterminée à partir du diagramme d'Eadie-Hofstee. Nous avons d'autre part vérifié l'influence de deux effecteurs hormonaux, la (L-) noradrénaline et l'insuline, les concentrations utilisées étant indiquées dans les diagrammes correspondants.

**Influence de la fixation virale.**

La suspension cellulaire (0,5 à 1×10<sup>6</sup> cellules/ml) a été divisée en trois lots que l'on a placés dans un B.M. à 37°C. Le premier a reçu la suspension virale inactivée, le second le virus actif manipulé à l'abri de la lumière, et le troisième du tampon Tris-HCl sans virus. Les quantités de virus utilisées ont été choisies, après des essais préliminaires, de manière que l'activité enzymatique, après 20 minutes de contact, fut égale à 75 % de l'activité maximale. Elle se situait entre 300 et 30 000 DI<sub>50</sub>/cellule (Tableau I)

Dilutions	1/3	1/20	1/30	1/200	1/300
DI <sub>50</sub> /ml	3,3 × 10 <sup>10</sup>	5 × 10 <sup>9</sup>	3,5 × 10 <sup>9</sup>	5 × 10 <sup>8</sup>	3,3 × 10 <sup>8</sup>
DI <sub>50</sub> /cellules	33 000	5 000	3 300	500	330

TABLEAU I — Doses de suspensions virales utilisées.

Après des temps de contact variant entre 0 et 30 minutes la fixation virale a été bloquée en transférant une partie aliquote du milieu réactionnel dans un volume égal de PBS additionné de 5 % de sérum de veau et de MgCl<sub>2</sub> 10 mM. L'ensemble a été maintenu entre 0 et + 4 °C, puis lavé trois fois dans du tampon Tris HCl pH 7,6 en centrifugeant chaque fois à 1 500 tours par minute pendant 10 minutes. On a mesuré ensuite l'activité adénylate cyclasique des membranes cellulaires, suivant le protocole décrit.

**RÉSULTATS**

**Étude des principaux paramètres**

La figure 1 montre que la vitesse de formation de l'AMP<sub>c</sub> demeure constante entre la 2<sup>e</sup> et la 10<sup>e</sup> minute, ce qui justifie le fait d'effectuer les prélèvements à la 8<sup>e</sup> minute.

L'activité enzymatique est maximale vers 37 °C (figure 2) et aux valeurs du pH voisines de 7,6 (figure 3). Les variations de la vitesse de la réaction en

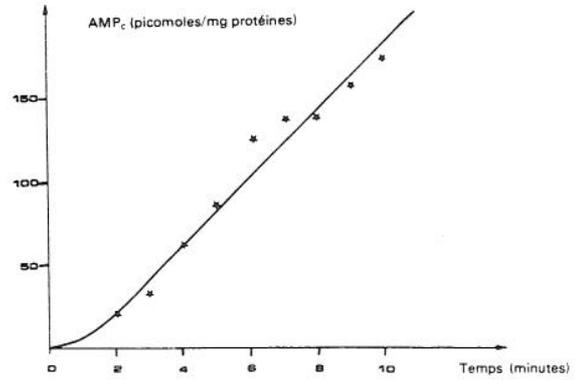


FIGURE 1 — Activité adénylate cyclasique en fonction du temps d'incubation.

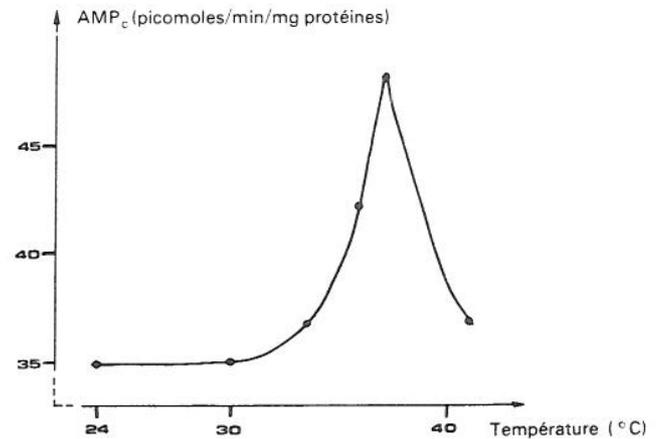


FIGURE 2 — Influence de la température sur l'activité enzymatique.

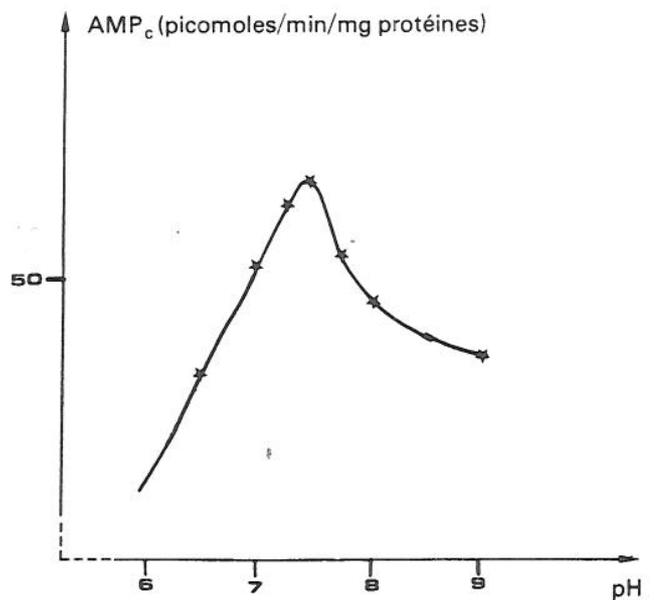


FIGURE 3 — Influence du pH sur l'activité enzymatique.

fonction de la concentration en substrat (ATP) sont données par la figure 4. Le diagramme d'Eadie-Hofstee (figure 5) indique pour la vitesse maximale ( $V_M$ ) une valeur égale à 102 pmoles d'AMP<sub>c</sub>/mn/mg de protéines et pour la constante de dissociation du complexe enzyme — substrat ( $K_m$ ) une valeur égale à 0,2 mM.

**Influence des effecteurs minéraux**

Il ressort de la figure 6 que l'activité enzymatique est très faible en l'absence de  $Mg^{++}$  ou lorsque la concentration de ce cofacteur est peu élevée. La vitesse de la réaction croît brusquement pour une concentration optimale de  $Mg^{++}$  voisine de 5 mM, soit un rapport de  $Mg/ATP$  proche de 5. Au delà de cette valeur, on observe une diminution d'activité.

La figure 7 montre que l'enzyme est peu sensible à la concentration en  $Mn^{++}$ . La vitesse de réaction n'est que légèrement augmentée pour une concentration optimale en cofacteur égale à 1 mM, soit un rapport  $Mn^{++}/ATP$  égal à 1.

L'activité enzymatique croît alors de 19 % par rapport à l'activité basale. Pour des concentrations en  $Mn^{++}$  plus élevées, l'activité enzymatique est inférieure à sa valeur de départ.  $Mn^{++}$  ne peut donc remplacer  $Mg^{++}$  comme cofacteur de l'enzyme.

**Influence des effecteurs hormonaux.**

Les variations de l'activité adénylate cyclasique en fonction de la concentration en L-noradrénaline sont données par la figure 8. Pour les faibles concentrations d'hormone, on observe une stimulation de l'enzyme, suivant un processus biphasique, accompagnée d'une diminution d'activité lorsque la concentration en hormone dépasse une valeur optimale. Les concentrations hormonales nécessaires pour obtenir les stimulations demi-maximale et maximale sont respectivement égales à 1,1 et 1,5 mM. L'augmentation d'activité dans le second cas étant de 166 % par rapport à l'activité de base.

A faible dose ( $< 5 \times 10^6$  UI/ml), l'insuline diminue légèrement l'activité enzymatique (figure 9) alors qu'à dose élevée elle augmente cette dernière, la stimulation étant de 100 % par rapport à l'activité de base pour les doses d'hormone égales ou supérieures à  $U5$  UI/ml.

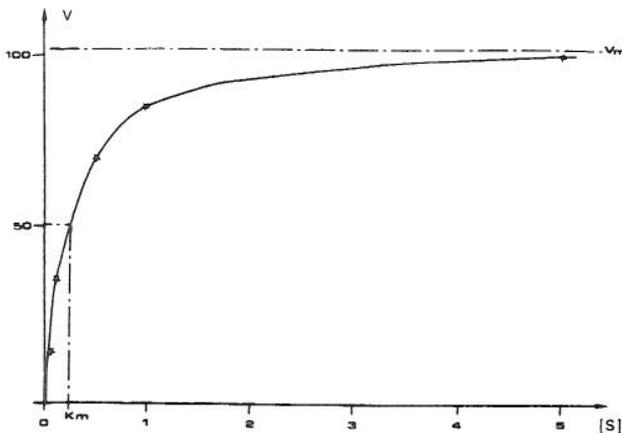


FIGURE 4 — Influence de la concentration en ATP sur l'activité adénylate cyclasique des cellules en culture.

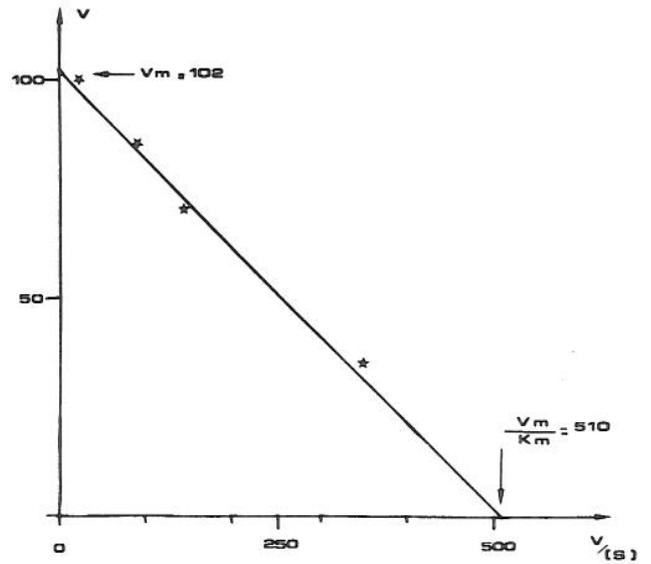


FIGURE 5 — Diagramme d'EADIE-HOFSTEE pour l'ATP.

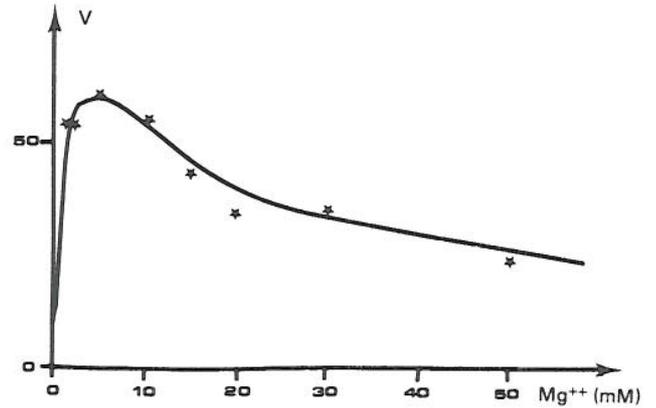


FIGURE 6 — Influence de la concentration en magnésium sur l'activité adénylate cyclasique des cellules en culture.

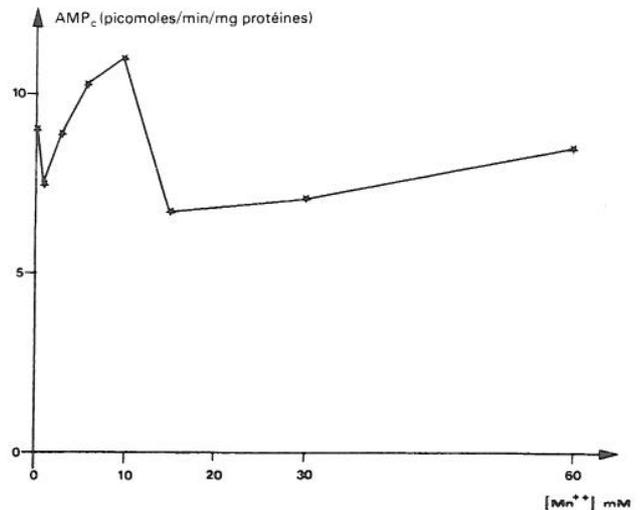


FIGURE 7 — Influence de la concentration en manganèse sur l'activité adénylate cyclasique des cellules en culture.

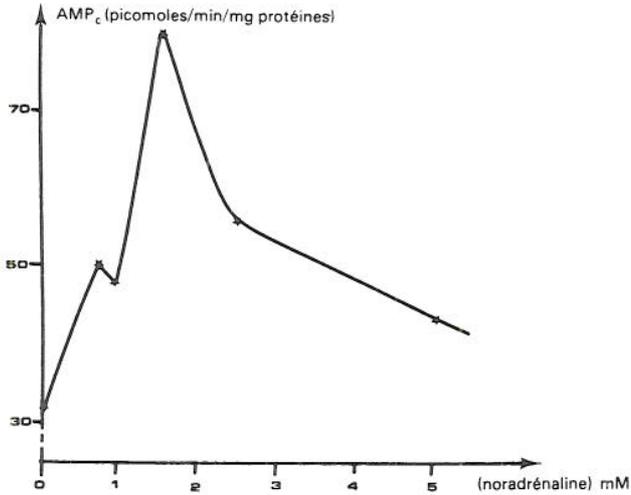


FIGURE 8 — Influence de la L-noradrénaline sur l'activité enzymatique des cellules en culture.

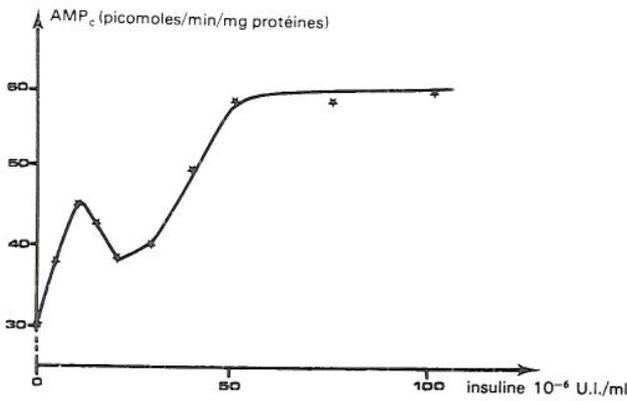


FIGURE 9 — Influence de l'insuline sur l'activité adénylate cyclasique des cellules en culture.

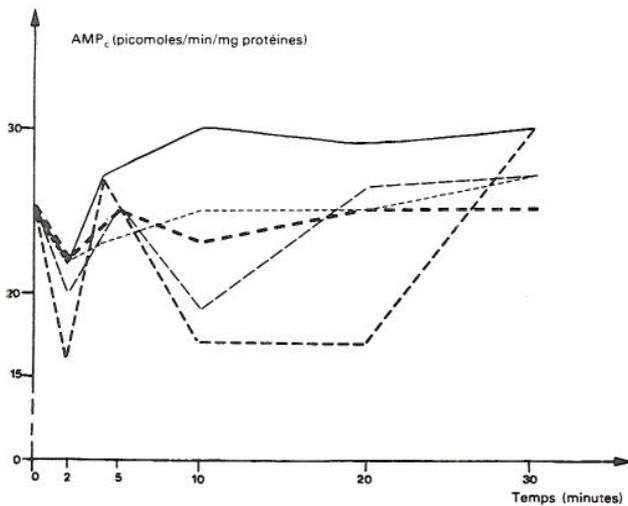


FIGURE 10 — Effets des particules virales inactivées sur l'activité adénylate cyclasique des cellules en culture.

Dilutions : 1/3 —  
 1/20 - - -  
 1/30 . . . .  
 1/200 - . - .  
 1/300 - - - -

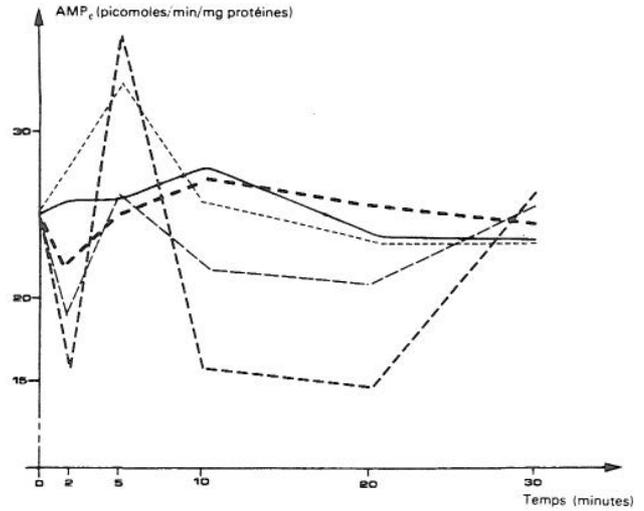


FIGURE 11 — Effets des particules virales infectieuses sur l'activité adénylate cyclasique des cellules en culture.

Dilutions : 1/3 —  
 1/20 - - -  
 1/30 . . . .  
 1/200 - . - .  
 1/300 - - - -

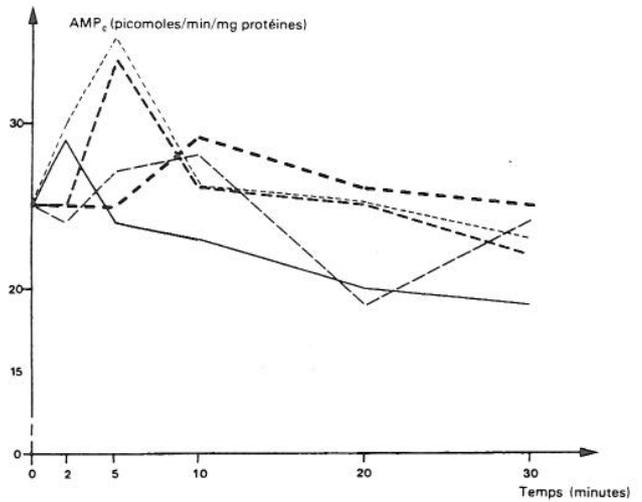


FIGURE 12 — Effets des particules virales infectieuses sur l'activité adénylate cyclasique des cellules en culture (valeurs corrigées).

Dilutions : 1/3 —  
 1/20 - - -  
 1/30 . . . .  
 1/200 - . - .  
 1/300 - - - -

**Influence de la fixation virale.**

Nous avons étudié les variations de l'activité adénylate cyclasique en fonction de la dose de virus (VSV) et du temps d'incubation, en distinguant les effets du virus inactivé (Vi) (figure 10) de ceux du virus actif (Va) (figure 11). Nous avons également calculé les variations induites par le virus actif en déduisant des chiffres trouvés les variations imputables aux particules virales inactivées (figure 12).

On constate que le virus inactivé modifie l'activité enzymatique des cellules. Celle-ci décroît de manière importante aux cours des deux premières minutes et remonte ensuite, cette remontée étant variable en fonction du nombre de particules virales. Elle est à la fois plus importante et plus stable lorsque la concentration en virus est élevée (figure 10). Dans le cas du virus actif, les effets varient également en fonction de la concentration virale (figure 11). Si les doses très faibles ou très élevées du virus provoquent peu de changement de l'activité enzymatique, les doses moyennes (dilution 1/20<sup>e</sup> ou 1/30<sup>e</sup>) provoquent une augmentation importante mais transitoire de cette activité au cours des 5 premières minutes.

Cette augmentation de l'activité adénylate cyclasique entre la 2<sup>e</sup> et la 5<sup>e</sup> minute sous l'influence du virus actif apparaît plus clairement après déduction des effets propres au virus inactivé (figure 12).

## DISCUSSION

Étant donné que les paramètres cinétiques de l'adénylate cyclase varient largement en fonction de l'origine des cellules utilisées (7, 3), il était important de les étudier dans le cas des cellules épithéliales buccales en culture. Pour nous placer dans les conditions expérimentales les plus favorables, nous avons tenu compte des principes généraux définis par SCHULTZ (8).

Nos résultats montrent que la vitesse de la réaction enzymatique dépend étroitement de la température et du pH. Les valeurs optimales trouvées pour ces deux facteurs sont cependant très voisines de celles qui ont été déterminées respectivement dans le cas des adipocytes (7) et des cellules KB (9). La constante de dissociation du complexe enzyme - substrat ( $K_m = 2 \times 10^{-4} M$ ) se situe au niveau des valeurs les plus souvent rencontrées ( $K_m = 1 \times 10^{-4} M$ ) (7). On observe cependant qu'elle est inférieure à celle de l'enzyme des cellules KB en culture ( $K_m = 0,75 M$ ) (9).

L'ion  $Mg^{++}$  se révèle nécessaire au fonctionnement de l'adénylate cyclase et l'on peut penser, comme beaucoup d'auteurs (7) que le véritable substrat de l'enzyme est le complexe  $Mg - ATP$ .

Le rapport optimum  $Mg/ATP = 5$  est identique à celui que trouve SIMPLOT (9) pour les cellules KB. Contrairement à ce qui a été constaté dans de nombreux cas l'ion  $Mn^{++}$  ne peut pas remplacer l'ion  $Mg^{++}$  comme effecteur de l'enzyme. SIMPLOT (9) avait déjà souligné à propos des cellules KB que  $Mn^{++}$  seul était moins actif que  $Mg^{++}$ .

En étudiant l'influence des effecteurs hormonaux, nous avons constaté que l'enzyme est stimulée par la noradrénaline, la concentration d'hormone nécessaire pour obtenir une vitesse de réaction demi-maximale étant voisine des valeurs généralement admises (7).

La diminution de l'activité enzymatique pour des concentrations d'hormone supérieures à 1,5 mM pourrait résulter d'un phénomène d'inhibition compétitive au niveau des sites récepteurs (7). Les effets de l'insuline

sont plus difficiles à interpréter et demanderaient à être réexaminés à partir des courbes de fixation d'une hormone marquée au  $^{14}C$  ou au  $^3H$ .

En ce qui concerne les variations de l'activité adénylate cyclasique des cellules au cours de la fixation du VSV, nos résultats montrent que les particules virales non inactivées provoquent une augmentation transitoire mais significative (environ 40 %) de l'activité basale entre la 2<sup>e</sup> et la 5<sup>e</sup> minute de l'incubation. Il est pour l'instant difficile d'interpréter ce phénomène. Si on s'intéresse de plus en plus aux interactions précoces entre les virus et la cellule-hôte, particulièrement dans le cas des virus enveloppés (10, 11), les travaux effectués jusqu'à présent portent essentiellement sur les modifications morphologiques de la cellule et les conséquences métaboliques de l'endocytose n'ont été étudiées de manière approfondie que chez les phagocytes (12). Il est intéressant de souligner qu'on a déjà constaté une augmentation de l' $AMP_c$  intracellulaire chez les macrophages alvéolaires au cours de la phagocytose (12). D'autre part, l'addition d' $AMP_c$  au milieu d'incubation favorise la phagocytose des cellules liées aux IgG (12). Il semble donc que l'adénylate cyclase joue un rôle important dans l'endocytose.

## CONCLUSION

Après avoir précisé les principaux paramètres cinétiques de l'adénylate cyclase des cellules épithéliales buccales de veau en culture, nous avons montré que l'enzyme est activée au cours de la phase précoce de la fixation d'une particule virale infectieuse (VSV) et discuté les résultats obtenus.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 DURET, O. CREACH, J. FRAPPA, Y. BEAUDRY et R. FONTANGES, Effets de la fixation d'un myxovirus sur le catabolisme anaérobie du glucose dans les cellules épithéliales buccales, C.R.S.S.A. Trav. Scient., 1977, 7, 286-288.
- 2 F. DURET, O. CREACH, J. FRAPPA, Y. BEAUDRY et R. FONTANGES, Influence de la fixation virale sur l'activité adénylate cyclasique des cellules épithéliales buccales, C.R.S.S.A. Trav. Scient., 1978, 8, 259-261.
- 3 F. DURET, Étude de l'activité adénylate cyclasique des cellules épithéliales buccales en culture, Thèse de docteur de 3<sup>e</sup> cycle en Sciences Odontologiques, Lyon 1980, n° 43 12 80 05.
- 4 Y. BEAUDRY, J. FRAPPA, R. DELOINCE et R. FONTANGES, Mise en culture de cellules buccales de mammifères. Sélection des cellules épithéliales par trypsinisation fractionnée, C.R.S.S.A. Trav. Scient., 1976, 6, 287-289.
- 5 S.L. POHL, L. BIRNBAUMER and M. ROBBEL, The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membrane of rat liver, J. Biol. Chem., 1971, 246, 1849-1856.

- 6 A.A. WHITE,  
Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New-York, J.G. HARDMAN and B.W. O'MALLEY edit., 1974, 38, 41-46.
- 7 G. TELL,  
Étude de la régulation de l'adenylate cyclase,  
Thèse Doct. État Sci. Phys., Lyon, 1976.
- 8 G. SCHULTZ,  
General principles of assays for adenylate cyclase and guanylate cyclase activity, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New-York, J.G. HARDMAN and B.W. O'MALLEY edit., 1974, 38, 115-125.
- 9 A. SIMPLOT,  
Étude de l'adényl cyclase et de la guanyl cyclase des cellules en culture entretenue KB,  
Thèse Doct. 3<sup>e</sup> cycle Bioch., Lyon, 1974, n° 353.
- 10 D.B. RIFKIN and J.P. QUIGLEY,  
Virus induced modification of cellular membranes related to viral structure,  
*Ann. Rev. Microbiol.*, 1974, 28, 325-351.
- 11 A. HELENIUS, M. MARSH and J. WHITE,  
The entry of viruses into animal cells,  
*TIBS*, 1980, 5, 104-106.
- 12 S.C. SILVERSTEIN, R.M. STEINMAN and Z.A. COHN,  
Endocytosis,  
*Ann. Rev. Biochem.*, 1977, 46, 669-722.

(C.R.S.S.A. / Microbiologie)