

Cinétique d'infection des cellules épithéliales porcines PK15 par le virus de la maladie d'Aujeszky : étude conjointe de l'expression des gènes viraux et cellulaires

Laurence FLORI (1), Valentina MARIANI (1,2), Claire ROGEL-GAILLARD (1), Marielle COCHET (3), Patrick CHARDON (1), François LEFEVRE (3)

(1) INRA - CEA, UMR314, Radiobiologie et Etude du Génome, F-78352 Jouy en Josas

(2) INRA, Station de Génétique Quantitative et Appliquée, F-78352 Jouy en Josas

(3) INRA, Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, F-78352 Jouy en Josas

laurence.flori@jouy.inra.fr

Cinétique d'infection des cellules épithéliales porcines PK15 par le virus de la maladie d'Aujeszky : étude conjointe de l'expression des gènes viraux et cellulaires

Le virus de la maladie d'Aujeszky ou virus de la Pseudorabies (PrV) est un pathogène bien connu du porc mais les mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie de l'infection ne sont qu'imparfaitement caractérisés. Pour mieux comprendre les interactions cellule hôte-PrV et pour identifier les gènes cellulaires induits et réprimés durant l'infection virale, nous avons analysé simultanément les modifications du transcriptome viral et du transcriptome cellulaire durant une étude cinétique. Comme le PrV possède *in vivo* un fort tropisme pour les cellules épithéliales muqueuses, nous avons choisi d'étudier *in vitro* l'infection des cellules épithéliales porcines PK15 par ce virus. Les cellules ont été collectées et l'ARN extrait juste après l'infection et puis 1, 2, 4, 8, 12 heures après l'infection. Quatre réplicats de cette cinétique ont été analysés. Deux puces à ADN porcines ont été hybridées. La première puce, construite au laboratoire contient 1856 cDNA comprenant 530 sondes couvrant la région SLA (Swine Leucocyte Antigen), 80 gènes codant pour des molécules de la réponse immunitaire et 80 amplicons viraux. La seconde puce (Qiagen-NRSP8) est une puce comprenant 13297 oligonucléotides. Nous avons suivi durant l'infection l'expression des gènes cellulaires en relation avec l'augmentation de l'expression des gènes viraux. Plusieurs gènes cellulaires sont différenciellement exprimés au cours de l'infection cellulaire et leur nombre augmente au cours du temps. Parmi ces gènes, certains sont impliqués dans la réponse immunitaire et dans l'apoptose. Parmi les gènes présents sur la puce SLA, un grand nombre de gènes différenciellement exprimés, situés dans la région SLA sont réprimés au cours de l'infection par le PrV.

Time-course infection of porcine epithelial PK15 cells with the Aujeszky's disease virus : joint study of viral and cellular gene expression.

The Aujeszky's disease virus or Pseudorabies virus (PrV) is a well-studied pig pathogen but the molecular mechanisms involved in physiopathology of infection are not well characterized. In order to better understand the PrV-cell interactions and to identify cellular genes which are induced or repressed during viral infection, our aim was to simultaneously analyse modifications of cellular and viral transcriptomes during time-course infection. As PrV shows a strong tropism for epithelial cells *in vivo*, we chose to study the *in vitro* infection of PK15 cells with this virus. Cells were collected for RNA extraction just after infection and 1, 2, 3, 4, 8 and 12 h post-infection or after mock-infection. Four kinetics replicates were analysed. Two porcine DNA chips were hybridized. One array corresponded to a laboratory-designed cDNA chip comprising 1856 probes including 530 probes targeting the Swine Leucocyte Antigen (SLA) complex region that contains many genes with immune functions, 80 immune genes located outside the SLA complex and 80 PrV amplicons. The second array referred to as Qiagen-NRSP8 is an oligo chip comprising 13297 probes. During the infection, we followed the cellular gene expression related to the increase of the viral gene expression. Several genes were found differentially expressed during infection and their number increases during time course experiment. Some of these genes are involved in the host immune response against pathogens and in the apoptosis pathway. Most differentially expressed genes located in the SLA region are down-regulated during PrV infection.

INTRODUCTION

La connaissance des gènes cellulaires et viraux, induits ou réprimés au cours de l'infection virale, est primordiale pour mieux comprendre la physiopathologie de l'infection et identifier les molécules impliquées dans les mécanismes de résistance de l'hôte. Le virus de la maladie d'Aujeszky ou virus de la pseudorabie (PrV pour Pseudorabies virus) est un pathogène bien connu du porc mais les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'infection ne sont encore qu'imparfaitement caractérisés. L'infection par le PrV est principalement responsable chez le porc adulte d'une atteinte respiratoire et d'avortements associés à une mortalité faible. En revanche, chez le porcelet nouveau-né, l'infection est généralisée, avec une atteinte nerveuse et une mortalité élevée (Thiry, 2004). Le PrV est un virus à génome ADN comprenant environ 70 gènes, codant pour des protéines structurales et non structurales dont l'expression est coordonnée au cours du cycle viral lytique. Ce virus, souvent utilisé comme modèle d'alphaherpesvirus car facilement cultivable en laboratoire, et dont le génome est entièrement séquencé, apparaît comme un modèle pertinent pour suivre *in vitro* l'infection virale.

L'étude des profils d'expression des gènes des cellules hôtes et des pathogènes a pris une ampleur considérable ces dernières années (Jansen et Yu, 2005 ; Jenner et Young, 2005) et les puces à ADN représentent des outils de choix pour étudier les niveaux d'expression de ces gènes. Plusieurs analyses du transcriptome cellulaire ont été effectuées sur des modèles d'infection cellulaire par le PrV : sur des fibroblastes embryonnaires de rat et avec des puces rat (Ray et Enquist, 2004 ; Bruckman et Enquist, 2006) ou sur une lignée rénale embryonnaire humaine (HEK 293) avec des puces humaines (Blanchard et al., 2006). Ces études n'ont pas analysé l'expression des gènes viraux et aucune analyse du transcriptome n'a encore été réalisée sur des cellules porcines infectées par le PrV. Pour mieux comprendre les interactions PrV-cellule porcine, nous avons analysé simultanément les modifications des transcriptomes cellulaire et viral au cours du temps. Comme le PrV possède chez le porc un fort tropisme pour les cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire, nous avons suivi *in vitro* la cinétique d'infection de la lignée cellulaire épithéliale porcine PK15 après 0, 1, 2, 4, 8 et 12 heures d'infection par le virus. Deux puces à ADN porcines ont été utilisées pour suivre l'expression des gènes viraux et identifier les gènes cellulaires induits ou réprimés au cours de l'infection virale : la puce SLA (Swine Leucocyte Antigen), réseau dédié ciblant la région SLA et contenant tous les gènes du virus PrV (Flori et al., 2006) et la puce commerciale Qiagen-NRSP8, un réseau générique (Zhao et al., 2005).

L'originalité de l'approche développée ici réside d'une part dans l'utilisation de puces permettant de suivre simultanément les niveaux d'expression des deux génomes, et d'autre part dans l'utilisation conjointe d'une puce générique incomplète et d'une puce dédiée (SLA) contenant la majorité des gènes d'une région chromosomique, dont 60 % sont impliqués dans la réponse immunitaire.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Cellules, virus et protocole d'infection

Les cellules épithéliales rénales porcines PK15 ont été cultivées *in vitro* dans un milieu synthétique sans sérum (milieu H-MSM, L'Haridon et al., en préparation). Elles ont été infectées par la souche NIA-3 du virus PrV à forte multiplicité d'infection (20 unités formant plaque par cellule) ou incubées en présence de milieu d'inoculation dépourvu de virus (mock-infection). Le virus a été titré dans le milieu de culture par dilutions limitées à différents temps suivant l'infection (0, 8, 12, 24, 36 et 50 heures).

Les cellules ont été prélevées au temps 0 (juste après l'infection ou la mock-infection) puis 1, 2, 4, 8 et 12 heures après l'infection pour l'extraction des ARN. Quatre réplicats d'infection et de mock-infection ont été réalisés pour chaque temps de prélèvement.

1.2. Extraction des ARN

Les ARN ont été extraits par la méthode trizol-chloroforme (Invitrogen), repris dans 40 µl d'eau DEPC et quantifiés (Nanodrop, Nyxor Biotech). Leur qualité a été vérifiée sur le Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies France). Les ARN ont ensuite été dilués à une concentration de 1 µg/µl et stockés à -80°C.

1.3. Hybridations des puces à ADN

1.3.1. Puces à ADN utilisées

La puce SLA, déposée sur lame de verre, a été construite au laboratoire (Flori et al., 2006). Il s'agit d'un réseau dédié contenant à la fois des sondes porcines et des sondes viraux (produits de PCR ou amplicons). En plus du millier de gènes nécessaires à la normalisation, on dénombre 530 sondes spécifiques de la région SLA (représentant 80 % des gènes de cette région), 80 sondes provenant de gènes codant pour des facteurs impliqués dans la réponse immunitaire et 80 amplicons du virus PrV correspondant aux 70 gènes viraux. Le réseau est déposé en double sur chaque lame de verre. La seconde puce utilisée est une puce pan-génomique porcine déposée sur lame de verre (Qiagen-NRSP8) contenant 13297 oligonucléotides (70 mers) spécifiques de 8541 gènes porcins (Zhao et al., 2005).

1.3.2. Marquage des cibles et hybridations

Les cibles ont été marquées par rétrotranscription de 5 µg d'ARN total avec incorporation de dCTP couplés à Cy3 ou Cy5 (réactifs utilisés : Pronto kit, Corning et Amersham, Biosciences). Chaque ARN a été marqué par Cy3 et par Cy5. Les cibles ainsi marquées ont ensuite été quantifiées (Nanodrop, Nyxor Biotech), évaporées et reprises dans le tampon d'hybridation (Kit Pronto, Corning) à une concentration de 2 pmoles/µl. Des ARN contrôles du commerce (Lucidea Universal Scorecard, Amersham Biosciences), s'hybridant avec des témoins présents sur la puce SLA, ont été marqués en même temps que les cibles.

Les lames ont été préhybridées (Kit Pronto, Corning) puis hybridées avec respectivement 20 pmoles de chaque cible marquée en Cy3 et Cy5 pour les lames SLA et 40 pmoles pour les lames Qiagen-NRSP8. Après une hybridation de 16h à 42°C, les lames ont ensuite été rincées selon le protocole du fournisseur (Kit Pronto, Corning) puis séchées par centrifugation (1500 rpm pendant 3 minutes).

1.3.3. Hybridations et schéma expérimental

Le schéma d'hybridation a été choisi pour minimiser le nombre de lames à utiliser et pour tester par analyse de variance (ANOVA) l'influence de certains facteurs sur les résultats (temps, infection, réplicats, lames, boucle, marquage). Il s'agit d'un plan en boucle comprenant 2 boucles indépendantes composées respectivement des réplicats 1 et 2 et des réplicats 3 et 4. Les temps 0, 1, 2, 4, 8, 12 heures après infection ont été hybridés sur les lames SLA et les temps 1, 2, 4, 8 heures après infection sur les lames Qiagen-NRSP8. Douze lames SLA et 32 lames Qiagen-NRSP8 ont été utilisées dans cette expérience.

1.3.4. Conditions de lecture et de quantification

Les lames SLA ont été lues sur le scanner Scanarray (Perkin Elmer) et les lames Qiagen-NRSP8 sur le scanner Chipreader (Virttek). Les signaux ont été quantifiés à l'aide du logiciel Imagene (Biodiscovery) à partir des images obtenues.

1.4. Traitement des données

1.4.1. Normalisation des données brutes

Les données brutes ont été filtrées pour éliminer les spots vides et les spots éliminés manuellement lors de la quantification. Ces données ont ensuite été normalisées par LOEWESS ($f=0,33$, outil de BASE, Sigence), transformées en \log_{10} ou \log_2 et centrées-réduites par condition. Pour étudier la cinétique d'expression des gènes, les données ont également été centrées-réduites par gène.

1.4.2. Analyses statistiques des données normalisées

La répétabilité entre les réplicats a été vérifiée pour chaque temps par ANOVA (logiciel TMeV, TIGR). Les gènes différentiellement exprimés entre les cellules infectées et mock-infectées ainsi que les gènes différentiellement exprimés au cours du temps ont été identifiés par ANOVA (logiciel GeneANOVA), tests-t (logiciel TMeV, TIGR) et tests SAM (Significance Analysis of Microarray, logiciel TMeV, TIGR). Plusieurs facteurs ont été pris en compte dans l'ANOVA : l'état d'infection (infection ou mock-infection, $n=2$), le temps post-infection (6 temps pour les lames SLA et 4 temps pour les lames Qiagen-NRSP8), les réplicats ($n=4$), les boucles ($n=2$), le protocole de marquage (Cy3 ou Cy5, $n=2$) et, dans le cas des puces SLA la lame ($n=12$). Nous avons utilisé le test-t pour comparer les niveaux d'expression des gènes entre les cellules infectées et mock-infectées pour chaque temps et entre les temps pour les cellules infectées. Le taux de faux positifs (FDR, False Discovery Rate) a été calculé après l'ANOVA et les tests-t (logiciel R).

Une analyse par classification hiérarchique a également été employée pour analyser les gènes viraux et les gènes cellulaires différentiellement exprimés au cours du temps ou en fonction de l'infection (distance euclidienne, lien complet, logiciel TMeV, TIGR). La méthode des «k-means» a été utilisée pour identifier des groupes de gènes cellulaires possédant une cinétique d'expression similaire dans les cellules infectées (logiciel TMeV, TIGR). Le nombre optimal de groupes a été déterminé par la méthode «Figure of Merit» (FOM, logiciel TMeV, TIGR).

Les annotations de «Gene Ontology» (GO) des gènes cellulaires différentiellement exprimés ont été obtenues à l'aide du logiciel Fatigo (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es/>).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Reproductibilité

Les résultats de l'ANOVA ne montrent pas de différences significatives entre les différents réplicats pour la cinétique d'infection ou la mock-infection. Les résultats obtenus entre les différents réplicats sont donc bien reproductibles.

2.2. Etude de l'expression des gènes viraux

Durant les 12 premières heures suivant l'infection par le PrV, la production de particules virales infectieuses dans les cellules PK15 augmente de manière exponentielle et la phase de plateau n'est pas encore atteinte, confirmant que la fenêtre de temps choisie est adaptée à l'étude des modifications du transcriptome viral et du transcriptome cellulaire.

Comme attendu, l'expression des gènes viraux est détectée uniquement dans les cellules infectées et elle évolue au cours du temps. La classification hiérarchique des niveaux d'expression des transcrits viraux montre que l'expression de la plupart des gènes est détectée entre 2 et 4 h après l'infection et que tous les gènes sont exprimés 8 heures et 12 heures après l'infection. Il est cependant difficile de raisonner sur le niveau d'expression de certains gènes viraux. En effet, de nombreux amplicons viraux présents sur la puce sont complémentaires de plusieurs transcrits. La présence de transcrits emboîtés chez le virus explique qu'un même transcrit peut ainsi s'hybrider à plusieurs amplicons (Figure 1). Nous pouvons cependant parler d'expression d'un gène quand un amplicon ne s'hybride qu'avec un seul transcrit viral (cf. amplicons soulignés Figure 2).

Par la méthode des «k-means», nous identifions 3 groupes d'amplicons reconnaissant des transcrits ayant une cinétique d'expression similaire au cours du temps (Figure 2). Le premier groupe commence à s'exprimer 4 heures après l'infection et le niveau d'expression des gènes est significativement augmenté 8 heures après l'infection. Le niveau d'expression diminue légèrement 12 heures après l'infection. Le deuxième groupe possède une cinétique semblable au premier mais le niveau d'expression est maintenu 12 heures après l'infection. Dans les deux groupes se classent non seulement plusieurs amplicons s'hybridant sur des transcrits codant pour des protéines de capsid (UL18, UL35, UL19, UL25,

UL26) et d'enveloppe (UL10, UL11, UL20, UL34) ainsi que d'autres transcrits dits tardifs (UL6, UL31) mais aussi des amplicons des gènes viraux dits très précoces comme IEP1 et IEP2 s'hybridant sur le transcrit codant pour IE180, un puissant transactivateur des gènes dits précoces du virus ainsi que des amplicons reconnaissant des gènes impliqués dans la réplication du virus (UL5, UL29, UL30, UL42, UL52, UL92). Les transcrits du troisième groupe, plus hétérogène, sont détectés à un faible niveau au tout début du cycle viral, avant toute expression du génome viral. Bien que cela mérite confirmation, il est possible que ces transcrits soient présents dans les particules virales et libérés dans la cellule au moment de leur entrée, phénomène décrit pour certains herpesvirus (Bresnahan et Shenk, 2000). L'expression de ces gènes diminue ensuite pour augmenter plus tardivement entre 4 et 8 heures après l'infection. Ce groupe contient des amplicons s'hybridant avec des transcrits codant pour des protéines de la capsid (UL38), de l'enveloppe (UL3) ainsi que des transcrits considérés comme plus précoces (UL54). Il est possible que les transcrits de ces gènes exprimés très tardivement soient maintenus en faible quantité dans les nouveaux virions.

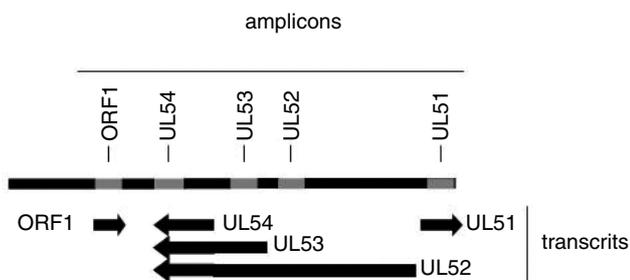


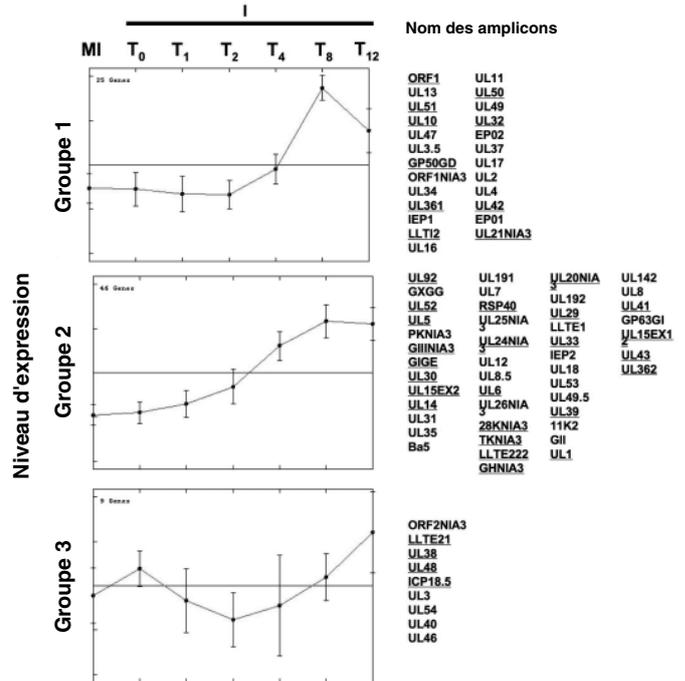
Figure 1 - Exemple d'amplicons viraux déposés sur la puce SLA et de transcrits du virus PrV
Les amplicons sont représentés en gris sur le génome viral

Nous n'observons pas de différence nette de cinétique entre les gènes dits précoces et tardifs. En effet, dans la plupart des cellules, les transcrits d'IE180, le transactivateur des gènes dits précoces, sont observés entre 40 minutes et 1h après l'infection et les transcrits dits précoces sont détectés 1h après l'infection. Cependant, le nombre maximal de transcrits dits précoces est observé 3-4 heures après l'infection pour certains ou plus tard, entre 4 et 9 heures, pour les autres (Pomeranz et al., 2005). Les transcrits dits tardifs quant à eux sont présents dès 2,5 heures mais leur niveau d'expression maximale est atteint plus tard. De plus, nous ne détectons la présence des transcrits qu'à partir d'un certain seuil, ce qui nous empêche de mettre en évidence les différences de cinétique entre les transcrits très précoces, précoces et tardifs.

2.3. Etude de l'expression des gènes cellulaires

Après filtration des données, 1776 et 7042 spots ont été respectivement analysés pour la puce SLA et la puce Qiagen-NRSP8.

Les résultats d'ANOVA globale montrent que l'infection et le temps ont un effet très significatif sur les niveaux d'expres-



Les amplicons reconnus par un seul transcrit sont soulignés
La moyenne des 4 réplicats d'infection et la moyenne de tous les réplicats de mock-infection sont représentées pour chaque temps.
MI : mock-infecté I : infecté
T0, T1, T2, T4, T8, T12 : temps après l'infection (en heures)

Figure 2 - Groupe de gènes présentant des cinétiques d'expression similaires (méthode des « k-means »)

sion des gènes cellulaires ($p < 10^{-5}$). L'ANOVA locale a permis d'identifier des gènes différenciellement exprimés entre les cellules infectées et mock-infectées, tous temps confondus. Parmi ces gènes, 65 gènes de la puce SLA sont des gènes situés dans la région SLA ou codent pour des facteurs de la réponse immunitaire hors SLA ($FDR < 0,01$). Quarante-et-un gènes proviennent de la puce Qiagen-NRSP8 ($FDR < 0,01$). L'analyse SAM a permis de mettre en évidence 24 gènes situés dans la région SLA, un gène codant pour une molécule immunologique hors SLA et 116 gènes provenant de la puce Qiagen-NRSP8 ($FDR < 10^{-5}$).

L'ANOVA locale permet également de mettre en évidence les gènes dont l'expression varie au cours du temps, parmi lesquels 178 gènes de la puce SLA (dont 152 gènes situés dans la région SLA et 26 codant pour des facteurs de la réponse immunitaire hors SLA) et 89 gènes de la puce Qiagen-NRSP8 ($FDR < 0,01$). L'analyse SAM et les tests t comparant les cellules infectées et mock-infectées pour chaque temps montrent une augmentation du nombre de gènes différenciellement exprimés en fonction de l'état d'infection des cellules au cours du temps. Les premiers différentiels d'expression significatifs sont détectés une heure après l'infection (test t ; $p < 0,0001$), (Figure 3). Ce nombre augmente surtout 8 heures après l'infection pour les deux puces, ce qui correspond à l'expression maximale des gènes viraux. Si l'on s'intéresse au sens du différentiel sur ces deux puces, les gènes de la région SLA sont plutôt réprimés à partir de 2 heures après l'infection alors que les gènes de la puce Qiagen-

NRSP8 sont plutôt induits dès 2 heures après l'infection puis induits et réprimés en proportions égales 8 heures après l'infection. Il est classiquement décrit que le virus réprime précocement et tardivement les gènes cellulaires de l'hôte. La différence observée entre les deux puces à ADN laisse penser que le virus réprimerait plus spécifiquement les gènes SLA et ceux codant pour les facteurs de la réponse immunitaire.

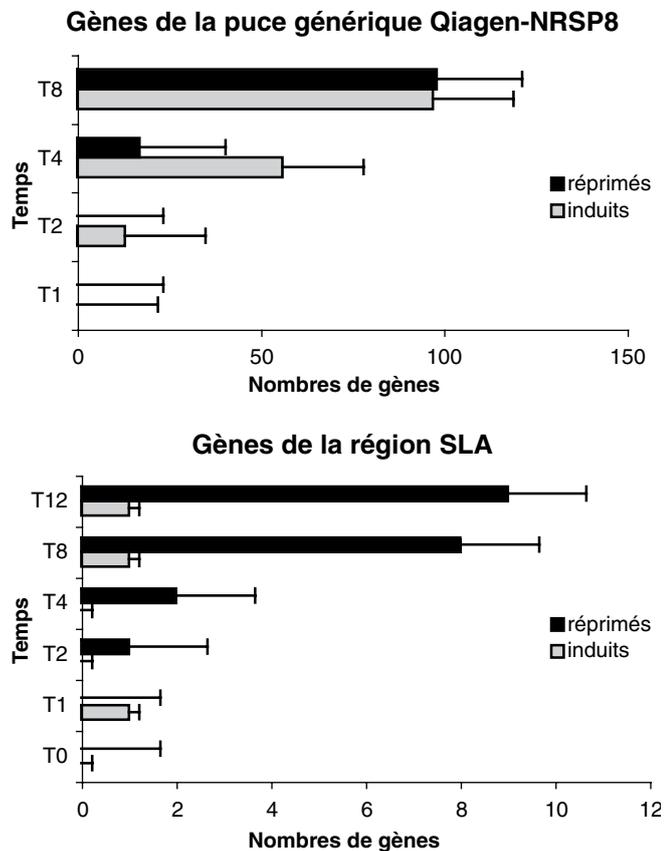


Figure 3 - Nombre de gènes différentiellement exprimés en fonction du temps (t-test, $p < 0,0001$, erreur type) sur la puce SLA (gènes situés dans la région SLA) et gènes codant pour des facteurs de la RI hors SLA) et la puce générique Qiagen-NRSP8

Les gènes différentiellement exprimés lors de l'infection virale sont impliqués dans différents processus biologiques (classification GO) comme par exemple la régulation du métabolisme, la transduction du signal, la réponse immunitaire, les réponses de défense, la réponse aux pathogènes, ou l'apoptose. Ces gènes peuvent être classés en gènes régulés précocement (de 0 à 4 heures après infection) ou tardivement (plus de 4 heures après l'infection).

Certains gènes cellulaires induits ou réprimés lors de l'infection par le PrV sont connus pour leur rôle dans la réponse immunitaire. Les gènes de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) qui codent pour les molécules présentant les antigènes endogènes sont en particulier réprimés (SLA-1). Une répression des molécules de classe I est classiquement décrite durant l'infection cellulaire par le PrV (Mellencamp et al., 1991). Cette modulation de l'expression peut s'exercer à différents niveaux incluant la transcription, l'apprêtement et le chargement de l'anti-

gène, la stabilisation de la protéine et l'acheminement de la molécule vers la surface cellulaire. Nos résultats montrent que plusieurs gènes codant pour des protéines PSMB (Proteasome subunit, bêta) sont induits. Les PSMB sont des molécules possédant une forte homologie avec LMP2 et LMP7, qui constituent le protéasome immunologique, complexe protéolytique impliqué dans la présentation par les molécules du CMH de classe I. Il a été montré que l'interféron γ ($IFN\gamma$) augmente l'expression de LMP2 et LMP7 alors qu'il diminue l'expression de protéines PSMB, produisant des protéasomes plus adaptés à l'apprêtement des antigènes endogènes (Akiyama et al., 1994). Il est donc possible que le virus PrV augmente l'expression de ces molécules pour diminuer la production de protéasomes efficaces dans l'apprêtement des antigènes viraux. De même, l'interleukine 15, cytokine impliquée dans l'immunité innée est induite par le virus dans les cellules PK15. Il s'agit d'une cytokine clé du développement des cellules Natural Killers (NK) et NKT. Elle active la cytotoxicité médiée par les cellules NK et la cytotoxicité dépendante des anticorps (Mossman et Ashkar, 2005). Cette cytokine semble être impliquée dans la protection antivirale, via la production de Tumor Necrosis Factor (TNF) et d' $IFN\gamma$. Nous avons aussi observé que le gène TNF est induit par l'infection virale dans les cellules PK15. Le gène CD69, code pour une glycoprotéine de surface inductible très précocement durant l'activation lymphocytaire. Nous avons observé une induction de ce gène dans les cellules PK15. CD69 est impliqué dans la prolifération lymphocytaire et fonctionne comme un récepteur transducteur de signal dans les lymphocytes et les cellules NK (Cambiaggi et al., 1992). Nos analyses montrent aussi que le transcrite codant pour BTNL6, une protéine de la famille des butyrophilines like, est réprimé tardivement dans les cellules PK15. Alors que l'homme ne possède qu'un seul gène butyrophilin-like (BTNL2), on en dénombre 5 chez le porc organisés en cluster dans la région SLA. Les BTNL sont des membres de la famille des récepteurs B7, qui agiraient probablement comme des molécules co-stimulatrices des lymphocytes T. Chez la souris, BTNL2 régule en effet l'activation des lymphocytes T, suggérant un rôle de cette famille de molécules dans la réponse immunitaire (Nguyen et al., 2006). Le transcrite codant pour la cyclophiline A, qui appartient à la classe des immunophilines est quant à lui précocement réprimé dans notre modèle cellulaire. Cette molécule semble capable de moduler l'infektivité de HIV-1 dans les cultures de tissus (Braaten et Luban, 2001). Il est possible que cette molécule joue un rôle dans la modulation de la cinétique d'infection du PrV.

Certains gènes cellulaires différentiellement exprimés sont impliqués dans l'apoptose, suggérant une modulation tardive de la voie apoptotique par le PrV dans les cellules épithéliales. Ces gènes sont en effet tardivement réprimés (CREBL1, HSPA8, TNFSF10) ou induits (TNF, TNF α -inductible ATP-bp).

CONCLUSION

Nous avons pu suivre l'induction et la répression des gènes cellulaires par le PrV au cours du temps en relation avec l'expression des gènes viraux. Nous avons identifié des gènes

cellulaires différenciellement exprimés, impliqués notamment dans la réponse aux pathogènes et qu'il nous faut maintenant valider par PCR quantitative en temps réel. Ce travail représente la première étude simultanée d'expression des gènes des cellules épithéliales porcines et des gènes du virus PrV au cours du temps, avec des outils spécifiques de l'espèce porcine.

Nous travaillons, en parallèle du modèle PrV-cellules épithéliales PK15, sur un modèle d'infection de cellules dendritiques immatures porcines par le PrV. Les cellules dendritiques, qui ont pour fonction la présentation des antigènes, sont les premières cellules immunitaires à interagir avec le virus et peuvent être considérées comme des cellules clés de l'immunité innée et adaptative. Une cinétique d'infection est en cours d'analyse et la comparaison du comportement du virus à l'intérieur des deux types cellulaires, cellule épithéliale et cellule dendritique, apparaît particulièrement intéressante

pour comprendre les différentes voies cellulaires utilisées par le PrV lors de l'infection.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier toute l'équipe du CRB-GADIE (INRA, Jouy en Josas) pour son aide précieuse lors de la conception des lames SLA ainsi que Sophie Pollet et Emmanuelle Zalachas (plateforme PICT, INRA, Jouy en Josas) pour leurs conseils techniques. Nous remercions également Stéphane Robin (OMIA, INAPG, Paris) pour l'élaboration du schéma expérimental et l'équipe de Sylvie Chevillard pour son aide lors de utilisation du scanner Scannarray (Laboratoire de Cancérologie Expérimentale, CEA, Fontenay aux Roses). Ce programme de recherche (projet TRANSPORC) bénéficie d'un financement Genanimal. Valentina Mariani a été financée par le programme Marie Curie RIVAGE.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akiyama K., Yokota K., Kagawa S., Shimbara N., Tamura T., Akioka H., Nothwang H.G., Noda C., Tanaka K., Ichihara A., 1994. cDNA cloning and interferon gamma down-regulation of proteasomal subunits X and Y. *Science*, 2265, 1231-1234.
- Blanchard Y., Le Meur N., Le Cunff M., Blanchard P., Léger J., Jestin A., 2006. Cellular gene expression survey of pseudorabies virus (PrV) infected human embryonic kidney cells (HEK-293). *Vet. Res.*, 37, 705-723.
- Braaten D., Luban J., 2001. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J.*, 20, 1300-1309.
- Bresnahan W.A., Shenk T., 2000. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science*, 288, 2373-2376.
- Bruckman A., Enquist L.W., 2006. Suppression of the interferon-mediated innate immune response by pseudorabies virus. *J. Virol.*, 80, 6345-6356.
- Cambiaggi C., Scupoli M.T., Cestari T., Gerosa F., Carra G., Tridente G., Accolla R.S., 1992. Constitutive expression of CD69 in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12. *Immunogenetics*, 36, 117-120.
- Flori L., Renard C., Urien C., Hu X.X., Fan B.L., Lecardonnel J., Ducroix-Crepy C., Piumi F., Hugot K., Bidanel J.P., Lefèvre F., Rogel-Gaillard C., Chardon P., 2006. Une puce à ADN ciblée sur la région du Complexe Majeur d'Histocompatibilité chez le porc : construction et premières exploitations. *Journées Rech. Porcine*, 38, 119-124.
- Jansen A., Yu J., 2005. Differential gene expression of pathogens inside infected hosts. *Curr. Op. Microbiol.*, 9, 1-5.
- Jenner R.G., Young R.A., 2005. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 281-294.
- Mellencamp M.W., O'Brien P.C., Stevenson J.R., 1991. Pseudorabies virus-induced suppression of major histocompatibility complex class I antigen expression. *J. Virol.*, 65, 3365-3368.
- Mossman K.L., Ashkar A.A., 2005. Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol.*, 18, 267-281.
- Nguyen T., Liu X.K., Zhang Y., Dong C., 2006. BTN2L2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J. Immunol.*, 176, 7354-7360.
- Pomeranz L.E., Reynolds A. E., Hengartner C.J., 2005. Molecular biology of Pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69, 462-500.
- Ray N., Enquist L.W., 2004. Transcriptional response of a common permissive cell type to infection by two diverse alphaherpesviruses. *J. Virol.*, 78, 3489-3501.
- Thiry E., 2004. *Virologie clinique du porc*. Ed. du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, 188 p.
- Zhao S.H., Recknor J., Lunney J.K., Nettleton D., Kuhar D., Orley S., Tuggle C.K., 2005. Validation of a first-generation long-oligonucleotide microarray for transcriptional profiling in the pig. *Genomics*, 86, 618-625.