

## **Etude du transcriptome des cellules rénales porcines (PK15) infectées par le circovirus porcine de type 2 (PCV-2)**

*Béatrice GRASLAND, Yannick BLANCHARD, Laurent BIGARRE, Hélène FELIX, Véronique BEVEN, Anne-Cécile NIGNOL, André JESTIN*

*AFSSA, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Zoopôle les Croix, BP 53, F-22440 Ploufragan*

*b.grasland@ploufragan.afssa.fr*

### **Etude du transcriptome des cellules rénales porcines (PK15) infectées par le circovirus porcine de type 2 (PCV-2)**

Le circovirus porcine de type 2 (PCV-2) est responsable de la maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP). Dans cette étude, afin d'identifier des gènes pouvant expliquer la virulence du PCV-2, les modifications de l'activité transcriptionnelle de cellules hôtes (cellules rénales porcines PK15) consécutives à l'infection par ce virus, ont été analysées à l'aide de puces à ADN comportant 20 400 oligonucléotides correspondant à des gènes porcins. Huit expériences indépendantes d'infection ont été réalisées. Le taux d'infection à 90 heures post-infection variait entre 25 et 40 %. Après analyse statistique des données microarray, 323 gènes présentent des modifications de leur expression, 277 et 46 gènes voyant leur expression respectivement activée et inhibée. Les variations d'expression suite à l'infection sont cependant assez faibles. Pour valider ces résultats, 15 gènes ont été sélectionnés et leur niveau d'expression mesuré par RT-PCR en temps réel. Seuls 2 des 12 gènes sur-exprimés et les 3 gènes sous-exprimés ont affiché des résultats concordants entre microarray et RT-PCR en temps réel. L'analyse des voies biologiques a montré que les gènes dont l'expression était inhibée étaient impliqués dans le développement cellulaire, le fonctionnement et développement du système hématologique, la réponse immunitaire et la mort cellulaire. Suite à l'infection par le PCV-2, cette étude montre que la voie de signalisation de l'interféron serait inhibée et que les gènes codant la protéine tumorale p53 et l'interleukine 6 auraient un rôle central.

### **Transcriptomic analysis of PK15 cells infected by porcine circovirus of type 2 (PCV-2)**

Porcine circovirus of type 2 (PCV-2) is the aetiological agent of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The aim of this study was to investigate by microarray analysis the modifications in gene transcription profiles of host cells (PK15 cells) infected by PCV-2 to assess further which cellular alterations might be involved in the development of pathology. Eight independent infection experiments were performed. The PCV2 infection rates were assessed to be between 25 and 40% at 90 hours post-infection. The statistical analysis revealed 323 genes that showed variations in their expression, 277 of which were induced and 46 repressed. In order to validate microarray results, 15 genes were selected and the relative expression levels were assessed by real-time RT-PCR. Only 2 out of 12 over-expressed genes and the 3 under-expressed genes had results in agreement by both methods. Under-expressed genes were involved in biological processes such as cellular development, haematological system development and function, immune response and cell death. Following PCV-2 infection, the interferon response seems to be inhibited and the genes encoding p53 protein and interleukin 6 might have a central role.

## INTRODUCTION

Dans la famille des *Circoviridae*, seuls deux virus infectent les suidés. Le circovirus de type 1 (PCV-1) a été découvert en tant que contaminant d'une lignée cellulaire de reins de porc (PK15 ATCC-CCL33). Il est considéré comme apathogène. Le circovirus porcine de type 2 (PCV-2) a, quant à lui, été isolé à partir de porcs atteints de la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP). Il est maintenant considéré comme l'agent étiologique de la maladie et est également associé avec d'autres syndromes tels que la dermatite néphropathie, des troubles de la reproduction, etc... (Madec et al., 2008).

Les circovirus porcins sont des petits virus non-enveloppés à ADN circulaire simple brin (Grasland et al., 2005). Leurs génomes d'une taille d'environ 1760 nucléotides présentent des organisations identiques. Ils possèdent (i) une séquence nonanucléotidique essentielle pour la réplication entourée de deux séquences répétées inversées formant une structure en tige-boucle et (ii) de deux cadres de lecture principaux d'orientation opposée, codant pour les protéines Rep et Rep' associées à la réplication et pour la protéine de capsid Cap. Les isolats de PCV-1 et PCV-2 présentent entre eux plus de 90 % d'homologie au niveau nucléotidique. Par contre, les différences sont plus importantes entre le PCV-1 et le PCV-2 selon les régions du génome examinées. L'origine de réplication et le gène *rep* partagent une forte homologie comprise entre 79 et 82 % contre 62 % pour les gènes *cap* du PCV-1 et du PCV-2. Ces variations se reflètent également du point de vue protéique. En effet, bien que les tailles des protéines Cap des deux virus soient de 233 acides aminés, leur identité en acides aminés n'est que de 67 %. Au contraire, les protéines Rep et Rep' varient en taille avec respectivement 312 et 168 acides aminés pour le PCV-1 et 314 et 178 pour le PCV-2, mais présentent tout de même 87 % d'homologie entre elles. Un troisième cadre de lecture a été caractérisé et diverge entre les deux virus. Pour le PCV-2, l'ORF3 a une taille de 315 nucléotides contre 612 pour le PCV-1. Cet ORF3 coderait pour une protéine impliquée dans l'apoptose induite par le PCV-2 *in vitro* et *in vivo* (Liu et al., 2006).

Bien que les circovirus porcins soient proches, ils diffèrent du point de vue de la pathogénicité. Afin de déterminer quelles fonctions biologiques et quels gènes pouvaient être impliqués dans la virulence du PCV2, les modifications de l'activité transcriptionnelle consécutives à une infection *in vitro* de cellules rénales porcines (PK15) par le PCV-2, ont été analysées à l'aide de puces à ADN comportant 20 400 oligonucléotides correspondant à des gènes porcins.

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1.1. Infection des cellules PK15 par le PCV-2

#### 1.1.1. Cellules et virus

Des cellules rénales porcines indemnes de PCV (lignée PK15) ont été utilisées et sont cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5 % (v/v) en CO<sub>2</sub> dans du milieu EMEM supplémenté avec du sérum de veau fœtal (5%) et de la pénicilline/streptomycine (100U/mL chaque). La suspension de PCV-2 a été préparée à partir de ganglions trachéo-bronchiques prélevés sur un porcelet infecté par voies intratrachéale et intramusculaire avec du PCV-2

(N° GenBank AF201311) (Albina et al, 2001). Le broyat de tissu a été filtré (0,45 µm) puis dilué dans du tampon PBS sans endotoxine (phosphate buffered saline). Le titre de la suspension a été mesuré à 10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml par la méthode d'IPMA (immuno-peroxydase monolayer assay).

#### 1.1.2. Tests d'infection

Des cellules PK15 confluentes à 90% ont été utilisées et ensemencées à une densité de 3×10<sup>5</sup>/mL dans du milieu EMEM supplémenté comme décrit précédemment dans des flasques de 75 cm<sup>3</sup>. Les cellules ont été infectées par le PCV-2 à une multiplicité d'infection de 0,4 pendant 24 heures. Elles ont ensuite été rincées avec du PBS et incubées avec une solution de D-glucosamine (300 mM) pendant 30 min à 37°C afin d'induire la réplication virale. Après un lavage dans du PBS, les cellules ont été incubées dans du EMEM supplémenté pendant 65 heures. Des cellules témoins inoculées avec du PBS ont été soumises aux mêmes conditions. Après l'incubation, le milieu de culture des cellules infectées et témoins a été retiré et 8ml de Trizol™ ou 2 ml d'acétone 80 % ont été ajoutés. Les suspensions de Trizol ont été stockées à -80°C avant l'extraction d'ARN. Les cellules fixées avec l'acétone pendant 10 min à -20°C ont été utilisées pour la révélation des cellules infectées par IPMA. Une première série d'infection a été réalisée avec différents temps post-infection afin de déterminer les conditions permettant d'atteindre un taux d'infection maximal. Les huit tests d'infection réalisés pour l'analyse transcriptomique ont ensuite été stoppés à 90h post-infection.

#### 1.1.3. Détermination du taux d'infection

Les cellules infectées ont été révélées par IPMA et apparaissent en rouge après traitement. L'anticorps utilisé pour détecter le PCV-2 est un sérum hyperimmun provenant d'un animal exempt d'organismes pathogènes spécifiques, infecté par le PCV-2 et ayant développé la MAP. Le nombre de cellules totales a été mesuré par marquage des noyaux avec du colorant de Hoescht. Le taux d'infection est déterminé comme le nombre de cellules infectées sur le nombre total de cellules.

## 1.2. Microarrays

### 1.2.1. Amplification des ARN et hybridation

Les détails des puces à ADN utilisées présentant 20 400 oligonucléotides correspondant chacun à des gènes porcins, sont disponibles sur le site [www.pigoligoarray.org](http://www.pigoligoarray.org).

Les ARN totaux ont été extraits à partir des suspensions de Trizol selon une méthode déjà décrite (Blanchard et al., 2006). Trois microgrammes d'ARN totaux ont servi de matrice pour la synthèse d'ADNc suivant les instructions du kit « Amino Allyl MessageAmp aRNA » (Ambion). Les ADNc ont été purifiés et ont permis la synthèse d'ARNa à l'aide du même kit. La qualité et la quantité d'ARNa ont été estimées par électrophorèse capillaire à l'aide de l'appareil « Bioanalyser 2100 » (Agilent). Les ARNa provenant des cellules témoins et des cellules infectées par le PCV-2 ont été marqués soit avec les cyanine 3 ou 5 avec le kit « CyDye reactive dye pack » selon les instructions fournies. Les hybridations sur les puces à ADN sont réalisées pendant la nuit à 42°C

dans un chambre d'hybridation « ArrayIt™ » (Telechem). Les lames ont ensuite été lavées puis scannées à l'aide d'un scanner « Genepic Personal A » avec une résolution de 10µm. Chaque test d'infection réalisé a été traité séparément.

### 1.2.2. Analyse des données

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Genepix Pro (version 4.0). Les données brutes ont ensuite été normalisées avec la suite MADSCAN (Le Meur et al., 2004). L'analyse statistique des ratios de fluorescence des tests versus témoins a été effectuée à l'aide du logiciel d'analyse SAM (Statistical Analysis of Microarrays) (Blanchard et al., 2006). Les principales fonctions biologiques assurées par ces gènes et les réseaux pouvant exister entre ces gènes ont été identifiés à l'aide du logiciel « Ingenuity pathways analysis » (<http://analysis.ingenuity.com>).

### 1.3. Validation par RT-PCR en temps réel

Une RT-PCR a été réalisée avec un microgramme d'ARN total à l'aide du kit « high capacity cDNA archive kit ». Les PCR quantitatives en temps réel ont ensuite été effectuées en utilisant des « TaqMan gene expression assays » d'Applied Biosystems après vérification par le fournisseur de la compatibilité des tests avec les séquences d'origine porcine. Ils sont nommés : Hs00231142\_m1 (MAX), Hs01070365\_m1 (SCAMP2), Hs01075835\_g1 (RFWD2), Hs01119505\_m1 (KCNMA1), Hs01560237\_g1 (C1orf43), Hs00969370\_m1 (MBD2), Hs00999799\_m1 (LRP6), Hs00918214\_m1 (PPP2R3B), Hs00974240\_g1 (ELMO3), Hs00215524\_m1 (C11orf59), Hs00914099\_g1 (TSPAN5), Hs00975900\_m1 (STMN2), Hs01063818\_m1 (SMYD2), Hs01032113\_g1 (HNRPH3).

Les séquences des primers utilisés pour amplifier le gène précurseur de l'interféron alpha 3 (IFNA3) (GenBank accession no. DQ248998) sont : 5'-TCAGCACAGAGGGCTCGG-3' (272-289) et 5'-TGCATGACACAGGCTTCAG-3' (355-374). La réaction de PCR temps réel du gène IFNA3 contenait 1X de solution « SYBR® GREEN PCR Master Mix », 900nM de chaque primer et 1µl d'ADNc total pour un volume final de 25 µL. Les conditions de toutes les PCR étaient de 2 min à 50°C, 10 min à 95°C suivies de 40 cycles de 15 s à 95°C et de 1 min à 60°C. Pour la réaction PCR du gène IFNA3, la spécificité de l'amplicon a été vérifiée en ajoutant une étape de dissociation à la fin (15 s à 95°C, puis 20 s à 60°C et 15 s à 95°C). L'amplification et la détection ont été effectuées par l'appareil « ABI Prism 7000 SDS ». La quantification relative des copies d'ARNm dans les échantillons infectés comparés à celles dans les échantillons témoins a été déterminée en utilisant le méthode de comparaison des Ct avec comme référence endogène l'ARNr 18S et suivant les instructions du bulletin de l'utilisateur numéro 2 de l'appareil « ABI Prism 7700 SDS ». Les niveaux d'expression des gènes ciblés en PCR quantitative entre les cellules infectées ou non ont été comparés avec le test non-paramétrique de Mann et Whitney du logiciel SYSTAT 9. Une valeur de *P* inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

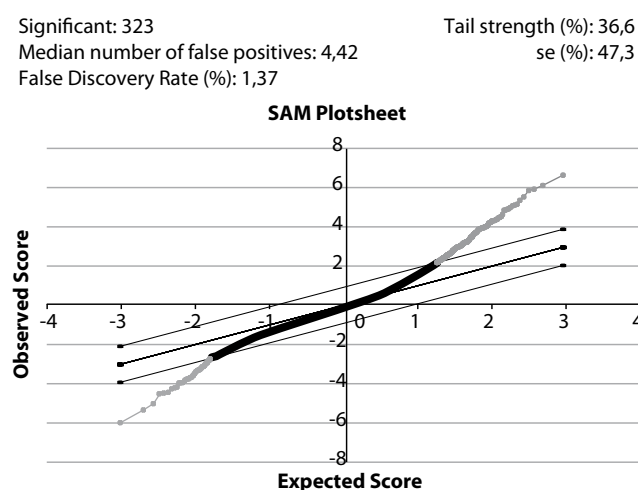
## 2. RESULTATS

### 2.1. Analyse statistique des données de microarray

Le taux d'infection a été évalué à 32, 48, 72 et 90 heures après l'infection par le PCV-2. Le maximum de cellules infectées révé-

lées par IPMA a été atteint après 90 heures d'infection. Ces conditions ont donc été conservées pour les tests suivants. Huit tests d'infection PCV-2 ont été effectués indépendamment. Les taux d'infection calculés se situaient entre 25 et 40 %. Chaque réplicat a été traité séparément et hybridé sur les puces à ADN. Les cDNA obtenus à partir des cellules témoins ont été regroupés et utilisés pour établir l'expression basale.

Les données normalisées ont été analysées avec le logiciel SAM pour déterminer les gènes statistiquement régulés par l'infection. L'analyse statistique, réalisée avec un taux de faux-positifs faibles (1,37 %), révèle que 323 gènes ont présenté des variations d'expression dont 277 sont sur-exprimés (points au-dessus des intervalles en diagonale) et 46 sous-exprimés (points en dessous des intervalles) (Figure 1). Les valeurs normalisées de ratio du signal de fluorescence (exprimées en log base 2) pour les gènes variants étaient faibles, comprises entre -0,4 et 1,29.



**Figure 1 - Représentation graphique de l'analyse statistique « SAM » réalisée à partir des données de microarray. Cette courbe a été réalisée en cumulant les données des huit tests d'infection de PCV-2. Les points compris entre les diagonales sont considérés invariants alors que ceux situés au-dessus et au-dessous sont potentiellement surexprimés et sous-exprimés, respectivement.**

### 2.2. Validation des gènes

Parmi les 323 gènes présentant des variations d'expression significatives après l'infection par le PCV-2, seuls 246 gènes (215 induits et 31 réprimés) présentaient une homologie avec des gènes humains suffisamment forte pour permettre un transfert d'annotation (ontologie des gènes) et ont été conservés pour les analyses suivantes. Afin de consolider ces résultats par PCR en temps réel, 14 gènes dont la séquence affichait 100% d'homologie avec l'homologue humain, ont été sélectionnés, et leur niveau d'expression a été mesuré par PCR en temps réel. Le gène codant pour le précurseur de l'interféron alpha 3 a également été choisi de par l'intérêt qu'il présente (rôle dans la réponse anti-virale) et de par la valeur du ratio du signal de fluorescence (-0,31 en log base 2). Sur les 15 gènes sélectionnés, 3 et 12 gènes étaient respectivement sous- et sur-exprimés. Les ratios normalisés (en log base 2) étaient compris entre -0,31 et 0,59 correspondant à des variations d'expression de 0,807 et 1,508 (Tableau 1).

**Tableau 1 - Comparaison de variations d'expression des 15 gènes sélectionnés par microarray et RT-PCR quantitative dans des cellules infectées par le PCV-2**

Gène	Variation d'expression	
	Microarray	RT-PCR quantitative
STMN2	1,508	1,176 <sup>a</sup>
LRP6	1,462	0,798
MBD2	1,329	0,873
HNRPH3	1,221	0,747
RFWD2	1,218	0,768
SMYD2	1,190	0,963
PP2R3B	1,190	1,106
MAX	1,185	1,042
C11orf59	1,183	0,785
TSPAN5	1,165	1,164 <sup>a</sup>
KCNMA1	1,124	0,689
C1orf43	1,122	1,084
SCAMP2	0,849	0,851 <sup>a</sup>
ELMO3	0,846	0,793 <sup>a</sup>
IFNA3	0,807	0,724 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Variation d'expression statistiquement significative en RT-PCR quantitative et conforme au résultat obtenu en microarray.

La répression des 3 gènes après l'infection PCV-2 (SCAMP2, ELMO3 et IFNA3) a été confirmée par RT-PCR en temps réel. Parmi les 12 gènes dont l'expression était considérée comme induite après infection par l'analyse statistique SAM, uniquement les gènes STMN2 et TSPAN5 ont eu leur niveau d'expression qui était induit, confirmé par RT-PCR en temps réel. Quatre des 12 gènes étaient considérés invariants et la moitié des 12 gènes ont présenté des résultats opposés (sous-expression au lieu de sur-expression). Les variations d'expression obtenues par RT-PCR en temps réel étaient faibles comme celles déterminées par microarray. Parmi les gènes réprimés, la variation d'expression la plus faible obtenue par RT-PCR était de 0,724 pour le gène IFNA3, valeur plus faible que celle mesurée en microarray (ratio=0,807). Au contraire, le gène testé en RT-PCR avec la plus forte induction en microarray (ratio=1,508) a affiché un ratio moins élevé en RT-PCR (ratio=1,176).

### 2.3. Effet de l'infection sur l'expression des gènes

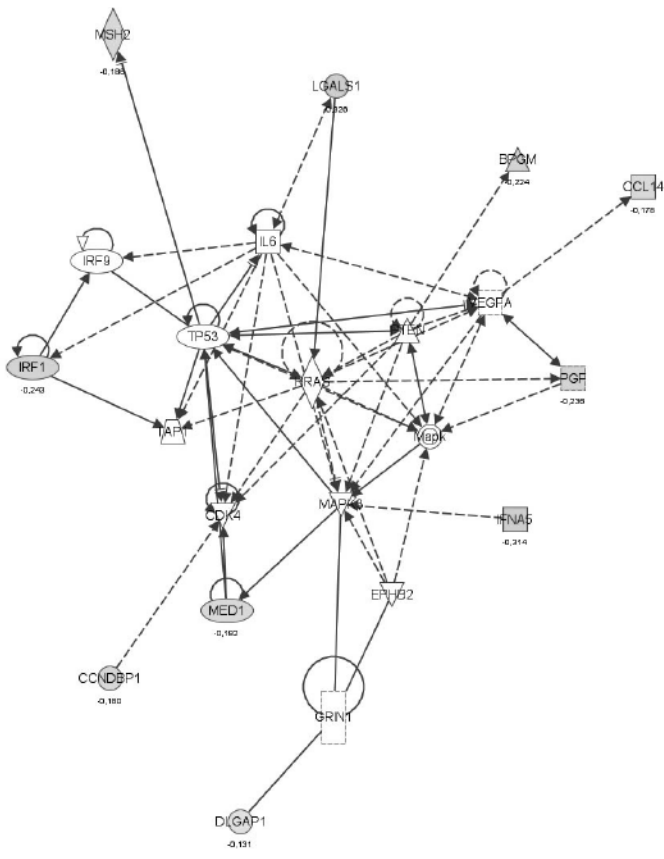
Afin d'identifier quelles voies étaient activées après une infection par le PCV-2 et à quels processus biologiques les gènes variants pouvaient être associés, une analyse a été réalisée avec le logiciel « Ingenuity pathway ». Seuls les 31 gènes sous-exprimés ont été intégrés dans cette analyse par extrapolation des résultats de RT-PCR (100 % des gènes réprimés testés validés par RT-PCR).

Les fonctions biologiques principales caractérisées sont 1) fonction et développement du système hématologique, 2) développement cellulaire, 3) réponse immunitaire et 4) mort cellulaire chacune rassemblant respectivement 8, 7, 7 et 5 gènes réprimés (Tableau 2). La différenciation des cellules sanguines concerne le développement cellulaire ainsi que le développement du système hématologique dans lesquels 5 gènes sont impliqués (BPGM, IRF1, MED1, MSH2 et PGF). Deux processus biologiques interviennent dans deux fonctions biologiques générales : fonction du système hématologique et réponse immunitaire. Le premier correspond au mouvement cellulaire des leucocytes associé aux gènes CCL14, LGALS1 et PGF et le second à l'exocytose avec le gène SCAMP2. La réponse anti-virale impliquant les gènes IFNA3 et IRF1 ainsi que la réponse immunitaire des lymphocytes B avec le gène MSH2 sont reliées uniquement à la réponse immunitaire. De même la mort cellulaire regroupe 3 processus : apoptose des cellules du système lymphatique, nécrose des hépatocytes et phagocytose.

Une voie biologique est particulièrement affectée après l'infection virale : la voie de signalisation de l'interféron. Deux gènes impliqués dans cette voie, le gène codant pour le précurseur de l'interféron 3 (IFNA3) et le gène codant pour le facteur de régulation de l'interféron 1 (IRF1), sont réprimés. De plus, un réseau regroupant 10 gènes sous-exprimés a pu être identifié et il est lié au développement du système cardiovasculaire, au mouvement cellulaire et le développement du système hématologique (Figure 2). Deux gènes y présentent un rôle central, le gène codant pour la protéine tumorale p53 (TP53) et celui codant pour l'interleukine 6 (IL6).

**Tableau 2 - Fonctions biologiques générales et processus spécifiques regroupant le plus de gènes réprimés après infection PCV-2 identifiés par analyse avec le logiciel « Ingenuity Pathway »**

Fonction biologique principale	Fonction biologique spécifique	Gènes impliqués (avec le ratio en log base 2)
Développement cellulaire et fonction et développement du système hématologique	Hématopoïèse	BPGM (-0,223); IRF1 (-0,243); MED1 (-0,182); MSH2 (-0,186); PGF (-0,236)
Réponse immunitaire et fonction et développement du système hématologique	- Mouvement cellulaire des leucocytes - Exocytose	CCL14 (-0,177); LGALS1 (-0,325); PGF SCAMP2 (-0,237)
Développement cellulaire	Différenciation des cellules autres que sanguines	IFNA3 (-0,313); LGALS1
Réponse immunitaire	- Réponse antivirale - Réponse immunitaires des lymphocytes B	IFNA3; IRF1 MSH2
Mort cellulaire	- Apoptose des cellules du système lymphatique - Nécrose des hépatocytes - Phagocytose	IRF1; LGALS1; MSH2  MED1 ELMO3 (-0,241)



© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Figure 2 - Réseau généré par le logiciel « Ingenuity pathway analysis » basé sur les liens existant entre les gènes ou les protéines (interactions protéine-protéine, activations, phosphorylations, etc.)**

### 3. DISCUSSION

Cette étude présente l'analyse des changements transcriptionnels de cellules PK15 survenant après infection par le circovirus de type 2 (PCV-2), agent étiologique de la MAP. La durée de l'infection pour obtenir un taux d'infection maximal a tout d'abord été déterminée. Elle a été estimée à 90 h post-infection, ce qui signifie que plusieurs cycles de réplication viral ont été accomplis. En effet, le cycle de réplication du PCV-2 dans les cellules PK15 est compris entre 24 et 36 h (Meerts et al., 2005). Le temps d'infection optimal utilisé est plus long que celui déterminé dans une étude antérieure (48h) mais le taux d'infection obtenu était de 4 % (Meerts et al., 2005). Cependant, la multiplicité d'infection différait et le temps de contact cellules/virus était de 1 h au lieu de 24 h. Dans notre étude, les cellules ont de plus été traitées avec de la glucosamine, ce qui induit la réplication virale (Tischer et al., 1987). Le taux d'infection mesuré dans notre étude est similaire à ceux déterminés dans des travaux récents avec des conditions similaires (Zhu et al., 2007).

Les niveaux de variation de l'expression des gènes évalués après infection par le PCV-2 sont faibles et peuvent expliquer pourquoi la majorité des gènes potentiellement sur-exprimés après analyse statistique, n'ont pu être validés par RT-PCR quantitative. L'analyse des réseaux a permis de mettre en évidence

une inhibition de la voie de signalisation de l'interféron (IFNA3 précurseur de l'interféron 3 et IRF1 facteur de régulation de l'interféron 1). Ce résultat concorde avec des études précédentes montrant que le génome du PCV-2 pouvait inhiber la capacité des cellules naturellement productrices d'interféron à produire de l'interféron alpha (IFN $\alpha$ ) (Vincent et al., 2007).

La mort cellulaire a été identifiée comme une des fonctions principales affectées après l'infection virale. De plus, la protéine tumorale p53 occupe un rôle central dans le réseau caractérisé regroupant 10 gènes sous-exprimés. Après un stress génotoxique, cette protéine est activée et peut contrôler l'arrêt du cycle cellulaire en phase de transition G1/S, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Dans les cellules non-stressées, elle est maintenue à un niveau basal en interagissant avec des protéines telles que Mdm2 et Pirh2 qui induisent son ubiquitination et sa dégradation. Il a été montré que les transcrits de p53 étaient significativement augmentés dans les cellules PK15 infectées par le PCV-2 et que le gène était progressivement transcrit (Liu et al., 2007). La protéine codée par l'ORF3 du PCV-2 en serait responsable *via* le domaine de liaison à p53 de la protéine Pirh2 du porc (pPirh2) et en réduisant la quantité de cette protéine pPirh2. Ainsi, cette dernière ne peut plus assurer sa fonction et l'expression de p53 augmente. La suppression de la dégradation de p53 pourrait ainsi favoriser le virus en stoppant les cellules en phase de transition G1/S car le virus a besoin des enzymes cellulaires exprimées au cours de la phase S pour la réplication de l'ADN (Tischer et al., 1987). De plus dans cette étude, le gène MED1 aussi appelé « PPAR binding protein » ou RB18A chez l'homme, est réprimé après infection par le PCV-2. La protéine MED1 inhibe l'apoptose dépendante de p53 en activant le promoteur Mdm2 ce qui accroît l'expression de Mdm2 et donc inhibe p53 (Lottin-Divoux et al., 2005). Suite à l'infection PCV-2, la sous-régulation du gène MED1 ne permettrait plus d'activer l'expression de Mdm2 et p53 serait ainsi stabilisée. L'ensemble de ces données suggèrent que le PCV-2 pourrait inhiber l'expression de protéines qui auraient un rôle dans l'ubiquitination de p53 et sa dégradation.

Dans le réseau impliquant 10 des 31 gènes sous-exprimés, un second gène a un rôle central et code pour l'interleukine 6 (IL6). Ce résultat est en accord avec des travaux qui avancent que l'expression de l'IL6 est sur-régulée chez des souris transfectées avec de l'ADN codant pour l'ORF5 du PCV-2 à 35 jours post-injection (An et al., 2008).

### CONCLUSION

En conclusion, la réponse transcriptionnelle cellulaire à l'infection par le PCV-2 est faible. Les gènes différemment exprimés dans les cellules PK15 infectées sont associés au développement cellulaire, au fonctionnement et au développement du système hématologique, à la réponse immunitaire et à la mort cellulaire. Nos résultats suggèrent qu'après l'infection par le PCV-2, la voie de signalisation de l'interféron est inhibée et que les gènes codant la protéine tumorale p53 et l'interleukine 6 joueraient un rôle prépondérant.

### REMERCIEMENTS

Ce projet a été financé par l'Union Européenne dans le cadre du 6<sup>ème</sup> PCRD (STREP PCVD n°513928).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albina E., Truong C., Hutet E., Blanchard P., Cariolet R., L'Hospitalier R., Mahé D., Allee C., Morvan H., Amenna N., Le Dimna M., Madec F., Jestin A., 2001. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *J. Comp. Pathol.*, 125, 292-303.
- An D.J., Song D.S., Park B.K., 2008. Systemic cytokine profiles of mice vaccinated with naked DNAs encoding six open reading frame antigens of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Res. Vet. Sci.*, 85, 503-509.
- Blanchard Y., Le Meur N., Le Cunff M., Blanchard P., Leger J., Jestin A., 2006. Cellular gene expression survey of PseudoRabies Virus (PRV) infected Human Embryonic Kidney cells (HEK-293). *Vet Res* 37, 705-723.
- Grasland B., Bigarre L., Blanchard P., Loizel C., Blanchard Y., de Boissesson C., Jestin A., 2005. Circovirus et pathologies associées chez les animaux. *Virologie*, 9, 431-442.
- Le Meur N., Lamirault G., Bihouee A., Steenman M., Bedrine-Ferran H., Teusan R., Ramstein G., Leger J.J., 2004. A dynamic, web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication. *Nucleic Acids Res.*, 32, 5349-5358.
- Liu J., Chen I., Du Q., Chua H., Kwang J., 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J. Virol.*, 80, 5065-5073.
- Liu J., Zhu Y., Chen I., Lau J., He F., Lau A., Wang Z., Karuppannan A.K., Kwang J., 2007. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *J. Virol.*, 81, 9560-9567.
- Lottin-Divoux S., Barel M., Frade R., 2005. RB18A enhances expression of mutant p53 protein in human cells. *FEBS Letters*, 579, 2323-2326.
- Madec F., Rose N., Grasland B., Cariolet R., Jestin A., 2008. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. *Transbound. Emerg. Diseases*, 55, 273-283.
- Meerts P., Misinzo G., McNeilly F., Nauwynck H.J., 2005. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch. Virol.*, 150, 427-441.
- Tischer I., Peters D., Rasch R., Pociuli S., 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.*, 96, 39-57.
- Vincent I.E., Balmelli C., Meehan B., Allan G., Summerfield A., McCullough K.C., 2007. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology*, 120, 47-56.
- Zhu Y., Lau A., Lau J., Jia Q., Karuppannan A.K., Kwang J., 2007. Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line. *Virology*, 369, 423-430.