



**HAL**  
open science

# CONSTRUCTION ET UTILISATION DE VECTEURS DÉRIVÉS DU VIRUS DE L'ÉRYTHROBLASTOSE AVIAIRE POUR LE TRANSFERT DE GÈNES CHEZ LE POULET

Frederic Flamant, Benchaibi M, Thoraval P, Chambonnet F, Savatier P,  
Poncet D, Mallet F, Legras C, Chebloune Y, A. Reyss-Bryon, et al.

► **To cite this version:**

Frederic Flamant, Benchaibi M, Thoraval P, Chambonnet F, Savatier P, et al.. CONSTRUCTION ET UTILISATION DE VECTEURS DÉRIVÉS DU VIRUS DE L'ÉRYTHROBLASTOSE AVIAIRE POUR LE TRANSFERT DE GÈNES CHEZ LE POULET. Annales de Recherches Vétérinaires, 1988, 19 (1), pp.85-86. hal-00901808

**HAL Id: hal-00901808**

**<https://hal.science/hal-00901808>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

des plaques de Peyer de l'iléon, les bactéries colonisent dans un premier temps les ganglions mésentériques, la rate et le foie, puis, après une phase septicémique, les reins et les poumons. Il a été clairement démontré que la virulence de *S typhimurium* est corrélée à la présence d'un plasmide de 90 kilobases (kb). La perte de ce plasmide se traduit par une importante diminution de la charge bactérienne dans la rate et le foie, par l'absence de phase septicémique et par la survie des animaux infectés. Un fragment d'ADN de 22 kb, isolé du plasmide pIP1350 présent dans la souche C5 de *S typhimurium* et cloné dans un vecteur mobilisable, est suffisant pour restaurer la pleine expression de la virulence chez une souche de *S typhimurium* sans plasmide. Des expériences de mutagenèse par le transposon Tn5 indiquent que la zone nécessaire à l'expression de la virulence semble contenue dans un fragment de 8 kb. Cependant, il n'a pas encore été possible de réduire la taille du plasmide recombinant sans diminuer la charge bactérienne dans le foie et la rate. Dans un système de maxi-cellules, il a été montré que le plasmide recombinant codait au moins pour six polypeptides mais leurs fonctions demeurent pour l'instant inconnues. Nous essayons actuellement de réduire la taille du plasmide recombinant sans altérer l'expression de la virulence et de comprendre le rôle joué par pIP1350 dans le processus de colonisation du foie et de la rate des souris conduisant à la phase septicémique et à la mort des animaux.

## **CONSTRUCTION ET UTILISATION DE VECTEURS DÉRIVÉS DU VIRUS DE L'ÉRYTHROBLASTOSE AVIAIRE POUR LE TRANSFERT DE GÈNES CHEZ LE POULET**

FLAMANT F, BENCHAI BI M, THORAV AL P, CHAM BONNET F, SAVATIER P, PONCET D, MALLET F, LEGRAS C, CHEBLOUNE Y, REYSS-BRYON A, COSSET FL, BAGNIS C, FAURE C, QUILICHINI D, SAMARUT J, VERDIER G et NIGON V

*Laboratoire de Biologie cellulaire (CNRS UA92 et INRA LA810), Université Claude Bernard Lyon I, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France*

Ce thème de recherches vise à utiliser certaines propriétés des rétrovirus pour transférer des informations génétiques soit dans des cellules en culture soit dans des cellules somatiques et/ou des cellules germinales de poulet. Nous avons choisi de réaliser des vecteurs dérivés du virus de l'érythroblastose aviaire (AEV) qui est un rétrovirus déficient comportant les oncogènes *erb A* et *erb B*. La production de ce rétrovirus exige donc la présence d'un rétrovirus assistant (ou « helper »). Nous avons construit un ensemble de vecteurs (Samarut *et al* 1986, Nigon *et al* 1986) dont certains sont dépourvus de la totalité des séquences oncogènes et transportent simultanément deux gènes : un gène de sélection conférant la résistance à un antibiotique aux cellules qui l'expriment et un gène dont l'expression est analysée. Le travail effectué sur ces vecteurs a permis d'optimiser la traduction des gènes insérés. En outre, nous étudions la possibilité d'obtenir l'expression de l'un des gènes insérés à partir de son propre promoteur et non à partir de la LTR rétrovirale.

Tous ces vecteurs étant déficients, la production virale conduit à l'obtention de stocks viraux mixtes « helper »/vecteur qui ont servi à l'infection de jeunes embryons à 24 heures de développement. Les séquences virales comportant les gènes insérés ont été identifiées dans l'ADN d'embryons de 8-9 jours et dans l'ADN de divers organes des animaux éclos. Dans ce dernier cas, l'intégration du vecteur semble particulièrement importante au niveau des gonades.

Notre travail actuel vise d'une part à vérifier s'il est possible de mettre en évidence la transmission génétique des séquences transférées et d'autre part à réaliser divers systèmes qui permettraient de s'affranchir de la virémie chez l'animal, par l'obtention de stocks viraux constitués uniquement par les virus vecteurs inaptes à la multiplication dans l'hôte cible.

### **Références**

Samarut J, Verdier G, Benchaibi M, Savatier P, Poncet D, Flamant F, Xiao JH, Thoraval P, Chambonnet F, Nigon VM, 1986. Vecteurs de clonage et d'expression comportant le génome du virus de l'érythroblastose aviaire et cellules transfectées par ces vecteurs. Brevet 85401999.9 déposé le 15/10/85.

Nigon VM, Samarut J, Verdier G, Flamant F, Benchaïbi M, Poncet D, Savatier P, Chambonnet F, Thoraval P, Faure C, Langlois P, 1986. Use of avian erythroblastosis virus to produce vectors for gene transfer in poultry. 7th European Poultry Conference. Paris, 38-44

## PROBLÈMES LIÉS A L'UTILISATION DE VECTEURS RÉTROVIRAUX POUR LE TRANSFERT DE GÈNES CHEZ LE POULET

Ginette DAMBRINE<sup>1</sup>, E ESNAULT<sup>1</sup>, E CHAMBONNET<sup>2</sup>, D BOURRET<sup>3</sup>, G LUNEAU<sup>3</sup>, Françoise COUDERT<sup>1</sup> et F MONGIN<sup>4</sup>

1 : Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie, INRA centre de Tours, Nouzilly, 37380 Monnaie, France

2 : Laboratoire de Biologie Cellulaire, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France

3 : Domaine expérimental du Magneraud, Saint-Pierre d'Amilly, 17700 Surgères, France

4 : Station de Recherches Avicoles, INRA centre de Tours, Nouzilly, 37380 Monnaie, France

Les vecteurs rétroviraux présentent à l'heure actuelle les outils les plus performants pour le transfert de gènes chez le poulet (Hughes *et al* 1986, Nigon *et al* 1986). Use of avian erythroblastosis virus to produce vectors for gene transfer in poultry. 7th European Poultry Conference, M Larbier Ed, Paris, p 38-44, Salter *et al* 1986, Shuman et Shoffner 1986. Les rétrovirus possèdent en effet un pouvoir infectieux élevé pour les cellules d'un hôte et ils s'intègrent naturellement au sein de leurs chromosomes. Cependant, leur utilisation à grande échelle requiert plusieurs préalables obligatoires.

En premier lieu, le vecteur rétroviral doit être dépourvu de tout pouvoir oncogène et il ne doit pas entraîner d'effets secondaires néfastes sur la physiologie de l'hôte. Pour parvenir à cet objectif, la première étape consiste à substituer des gènes marqueurs aux oncogènes du virus de l'érythroblastose aviaire (AEV) responsables de l'induction rapide de leucémies. Il est nécessaire ensuite de contrôler que le vecteur issu de l'AEV ainsi que le système helper nécessaire à son fonctionnement soit incapable d'activer soit des oncogènes cellulaires, soit des séquences virales endogènes et qu'il ne se produit pas de recombinaison entre le vecteur et ces séquences cellulaires. Dans un tel contexte, le choix de la souche expérimentale de poulet est déterminant. La souche retenue doit être sensible à l'infection par les rétrovirus aviaires pour permettre l'intégration du vecteur. Parmi les troupes disponibles, la souche Leghorn Dorée (Pathologie Aviaire, Nouzilly) répond à ce critère (sensible aux sous-groupes A, B, C, D) et elle présente en outre la plus haute sensibilité à un large spectre de tumeurs induites par des rétrovirus aviaires. C'est en effet la seule souche capable de développer des sarcomes, des carcinomes, des leucémies érythroïdes ou myéloblastiques ainsi que des néphroblastomes et des leucoses lymphoïdes à la suite des inoculations expérimentales que nous avons effectuées. De plus, un exemple de recombinaison entre le virus leucosique RAV 1 et l'oncogène cellulaire c-mil a été récemment décrit dans cette souche (Bechade *et al* 1986. Isolation of a novel mil-containing retrovirus in chicken neuroretinal cells infected *in vitro* with an avian lymphomatosis virus. XVI meeting of the European Tumor Virus Group, p 33). Ces observations nous ont conduits à retenir la souche Leghorn Dorée en tant que révélateur de l'innocuité des vecteurs.

En raison de baisses de performances zootechniques dues à l'infection par les virus leucosiques (Gavora *et al* 1980), les vecteurs rétroviraux devront conduire à l'obtention de poulets transgéniques, non virémiques. C'est pourquoi, les différentes étapes expérimentales de ce projet sont réalisées chez des souches de poulets exemptes de virus leucosique. De plus, Nigon *et al* (1986 use of avian erythroblastosis virus to produce vectors for gene transfer in poultry. 7th European Poultry Conference, M Larbier Ed, Paris, p 38-44) entreprennent la construction de vecteurs en système helper-free, capables de produire un seul cycle infectieux pour conduire à l'insertion de gènes étrangers dans les cellules germinales sans rendre les poulets virémiques. L'absence de virémie est contrôlée dans un premier temps par un test ELISA spécifique de l'antigène de groupe des virus leucosiques (protéine p 27) qui permet d'identifier et d'éliminer les poules porteuses de virus dans les troupes de reproduction. Nous contrôlons la souche Leghorn Dorée depuis 1982 et nous avons entrepris en 1985, l'éradication de la souche à hautes performances zootechniques destinée à l'application finale des transferts de gènes.