



HAL
open science

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

Ginette Dambrine, E Esnault, E Chambonnet, D Bourret, G Luneau,
Françoise Coudert, F Mongin

► **To cite this version:**

Ginette Dambrine, E Esnault, E Chambonnet, D Bourret, G Luneau, et al.. PROBLÈMES LIÉS A L'UTILISATION DE VECTEURS RÉTROVIRAUX POUR LE TRANSFERT DE GÈNES CHEZ LE POULET. Annales de Recherches Vétérinaires, 1988, 19 (1), pp.86-87. hal-00901809

HAL Id: hal-00901809

<https://hal.science/hal-00901809v1>

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.

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 DAMBRINE¹, E ESNAULT¹, E CHAMBONNET², D BOURRET³, G LUNEAU³, Françoise COUDERT¹ et F MONGIN⁴

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.

La réussite d'un tel programme repose aussi sur la faisabilité de l'injection de vecteurs. Pour atteindre les cellules germinales, il est nécessaire d'intervenir précocement dans l'œuf embryonné, mais cette opération s'accompagne d'un traumatisme souvent fatal (Flamant 1986. Utilisation de vecteurs dérivés du virus de l'érythroblastose aviaire (AEV) pour le transfert de gènes chez les embryons de poulet. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard Lyon I). C'est pourquoi, nous avons amélioré les techniques d'injections des embryons de 24 h et les conditions d'incubation des œufs. Nous sommes parvenus à annuler les anomalies de développement des embryons et nous avons augmenté sensiblement le taux d'éclosion (de 0,5 % à 5-10 %).

Les différents niveaux de contrôle que nous venons de décrire sont destinés à conduire le système de transfert le plus fiable possible.

Références

- Gavora JS, Spencer JL, Gowe RS, Harris DL, 1980. Lymphoid leucosis virus infection : effects on production and mortality and consequences in selection for high egg production. *Poult Sci* 59:2165-2178.
- Hughes SH, Kosik E, Fadly AM, Salter DN, Crittenden LB, 1986. Design of retroviral vectors for the insertion of foreign deoxyribonucleic acid sequences into the avian germ line. *Poult Sci* 65:1459-1467
- Salter DN, Smith EJ, Hughes SH, Wright SE, Fadly AM, Wilter RL, Crittenden LB, 1986. Gene insertion into the chicken germ line by retroviruses. *Poult Sci* 65:1445-1458.
- Shuman RM, Shoffner RN, 1986. Gene transfer by avian retroviruses. *Poult Sci* 65:1437-1444.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMIDS FOR THE INDUCIBLE EXPRESSION IN EUKARYOTIC CELLS OF A PROTEIN CODED BY THE HUMAN C-MYC LOCUS

DEDIEU JF, GAZIN C, RIGOLET M and GALIBERT F

Laboratoire d'Hématologie Expérimentale, Centre Hayem, Hôpital St-Louis, 2 place du Dr Fournier, 75010 Paris, France

The human c-myc proto-oncogene is composed of three exons, the last two of which encode a 62 kd phosphoprotein with DNA binding properties (Cole 1986). Nucleotide sequence analysis has shown a large open reading frame (ORF) overlapping exon 1, with a coding capacity of 188 amino acids (Gazin *et al* 1984). This coding capacity is actually used in human cells, since the existence of the corresponding mRNA and protein (MYCHEX1) have recently been demonstrated by Bentley and Groudine (1986) and Gazin *et al* (1986) respectively. In order to facilitate biochemical and biological studies of MYCHEX1, we have constructed several recombinant plasmids which express in an inducible way the MICHEX1 protein in eucaryotic cells. Plasmid pLMS is composed of a 1.45 kb fragment of the Murine Mammary Tumor Virus LRT containing the glucocorticoid inducible promoter followed by a 1.1 kb of human c-myc first exon containing the entire ORF and a 240 bp fragment of SV40 bearing the polyadenylation signals of the viral genome. This construct was transfected into murine LMTK- cells and the resulting clones were isolated and tested for basal and inducible expression of the transfected gene. One of these (LT8) was studied in detail. We first examined by primer extension the production of mRNA specifically originating from the construct. We showed that there is a detectable level of basal expression of MYCHEX1 mRNA in the absence of added glucocorticoids. Treatment of cells with 10^{-7} M or 10^{-6} M dexamethasone for 8 hours increases the mRNA levels by about 5 and 2 fold respectively. The production of MYCHEX1 protein in the LT8 cell line was tested by PAGE of cellular extracts and subsequent immunoblotting using antipeptide sera that recognize in human cells extracts MYCHEX1 protein in the form of two related polypeptides of 32 and 58 kDa apparent molecular weight. These sera also recognize in LT8 cell line extracts the same molecular species. Finally, the level of production of MICHEX1 protein in the LT8 cell line was monitored by an ELISA test using the same sera as mentioned above. This test shows that the protein levels in cellular extracts parallel the mRNA levels obtained under different induction conditions. From the pLMS plasmid we derived two additional constructs. Plasmid pLMSFS, in which the ORF of exon 1 has been