

METHODOLOGIES ET APPLICATIONS POTENTIELLES DE LA TRANSGENESE CHEZ LE POULET

Thoraval, P., Afanassieff, Marielle, Olayat, Sophie, Lasserre, F.,
Coudert, Françoise et Dambrine Ginette.

Laboratoire de Virologie et d'Oncologie Aviaire, INRA, Station de Pathologie
Aviaire et de Parasitologie 37380 Nouzilly.

Résumé

La création d'animaux transgéniques constitue actuellement un modèle d'étude de choix dans les laboratoires et tend à devenir une biotechnologie à part entière. Si cette approche méthodologique est bien maîtrisée chez les mammifères grâce à la micro-injection, elle est maintenant possible bien que délicate à réaliser chez les oiseaux. Plusieurs méthodologies mettant en oeuvre des vecteurs rétroviraux, la micro-injection, la manipulation des cellules embryonnaires précoces ou des cellules germinales primordiales ont été développées simultanément. Certaines ont abouti à l'obtention de poulets transgéniques. Les transgènes ainsi introduits ne sont pour l'instant que des gènes modèles (la plupart du temps d'origine bactérienne). Mais l'on peut d'ores et déjà envisager l'obtention de poulets transgéniques dont les transgènes pourraient permettre l'amélioration d'un caractère physiologique, l'installation d'une résistance à une maladie tumorale ou même la production *in ovo* de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique ou agronomique.

Introduction

Les caractères biologiques des espèces avicoles ont facilité l'application de programmes de sélection génétique. Ils se sont traduits par une amélioration constante des performances zootechniques. Dans un futur proche, le sélectionneur pourra bénéficier, en plus du perfectionnement des méthodes de la génétique classique, de méthodes alternatives résultant de la biologie moléculaire et en particulier la transgénèse. Les volailles constituent en outre une espèce dont la taille, la prolificité et la structure de production caractérisée par la diffusion d'un nombre limité de souches, sont des facteurs compatibles avec l'application de méthodes de transgénèse. Pour envisager la production de poulets transgéniques, il est nécessaire de répondre à deux types de questions :

- 1) De quelle(s) méthodologie(s) dispose-t-on pour effectuer l'insertion d'un transgène?
- 2) Quel(s) transgène(s) peut-on choisir pour conférer au poulet transgénique un avantage prépondérant ?

Les approches méthodologiques de la transgénèse chez le poulet

Chez la poule, la micro-injection directe du transgène dans l'oeuf fécondé, couramment pratiquée chez les mammifères est impossible à réaliser car l'oeuf est rapidement entouré de l'albumen et de la coquille qui le rendent inaccessible. Toutefois, M. Perry (1988) a mis au point une technique permettant, en dehors de la coquille, le développement d'un embryon de poulet du stade une cellule jusqu'à l'éclosion du poussin. Ainsi, l'oeuf fécondé devient accessible à la micro-injection. Un poulet transgénique a été obtenu par cette technique (Love et al., 1994) qui est cependant difficile à mettre en oeuvre et dont les rendements restent encore faibles. Par conséquent, il a fallu recourir à d'autres méthodes.

L'utilisation de vecteurs rétroviraux

Parmi celles-ci, l'emploi de rétrovirus comme vecteur de transgène a été développé. Les rétrovirus (virus à ARN)

présentent en effet une propriété particulièrement avantageuse en matière de transfert de gènes, puisque leur génome s'intègre obligatoirement dans l'ADN de la cellule qu'ils infectent. Le rendement d'intégration du transgène est en outre beaucoup plus efficace après infection par un rétrovirus que par les techniques classiques de transfection. De plus, le génome des rétrovirus, relativement court, comporte seulement trois ou quatre gènes, parfaitement identifiés. Ces gènes viraux sont encadrés par un groupe d'éléments appelé LTR (Long terminal Repeat) qui renferme les structures "promoteur" assurant l'expression de ces gènes. Des vecteurs rétroviraux ont été élaborés (figure 1) dérivant soit du virus de la réticuloendothéliose (Watanabe et Temin, 1983), soit des ALSV (Avian Leukosis ans Sarcoma Viruses) (Benchaïbi et al., 1989; Cosset et al., 1991). Dans les deux cas, les gènes viraux responsables de la multiplication du virus et de son pouvoir pathogène ont été enlevés et remplacés par les gènes que l'on souhaite transférer. Le génome viral hybride ainsi construit, appelé "vecteur rétroviral" est produit par une lignée de cellules dite transcomplémentante sous forme de virions, capables d'infecter une seule fois les cellules animales sans s'y multiplier.

Rétrovirus dérivés des ALSV

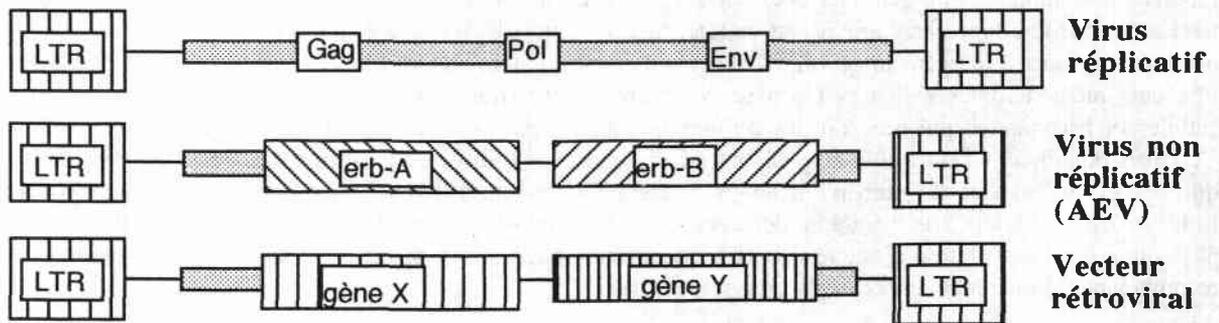


Figure 1 : Représentation schématique de virus du groupe des ALSV. Le virus répliquatif porte les gènes *gag*, *pol* et *env* nécessaires à la formation des particules virales, il peut donc se multiplier. Le virus non répliquatif porte à la place des gènes *gag*, *pol* et *env* des gènes d'origine cellulaire, les oncogènes responsables de son pouvoir transformant. Il est incapable de se multiplier seul et nécessite pour cela la présence concomitante d'un virus répliquatif. Nous avons utilisé l'AEV, virus de l'érythroblastose aviaire, pour construire un vecteur rétroviral. Les oncogènes *erb-A* et *erb-B* ont été respectivement remplacés par des gènes marqueurs. Ce vecteur rétroviral est produit à partir d'une lignée cellulaire transcomplémentante qui synthétise les protéines *gag*, *pol* et *env*.

Des poulets transgéniques ont été obtenus avec les vecteurs rétroviraux dérivés du virus de la réticuloendothéliose (Bosselman et al., 1989). Cependant, l'utilisation de ce type de virus ne présente pas une garantie maximale de sécurité car il est amphotrope et capable d'infecter plusieurs espèces dont l'homme. Nous avons pour notre part choisi de développer des vecteurs rétroviraux à partir des ALSV qui ont eue la particularité de n'infecter que les cellules d'oiseaux. Nous avons utilisé des suspensions virales pour infecter des embryons de poulet à un stade précoce du développement (stade blastoderme, juste après la ponte; à ce stade l'embryon est déjà composé de 40.000 à 80.000 cellules) et obtenu ainsi des poulets transgéniques (Thoraval et al., 1995). Les rendements sont cependant peu élevés puisque 16,5% des poussins éclos ont intégré le transgène. Un coq résultant de cette opération a transmis le transgène à 2,7% de sa descendance. La transmission germinale du transgène dans les générations successives issues du poulet fondateur suit les lois de Mendel. Le transgène est capable de s'exprimer sous la forme d'une protéine fonctionnelle et aucune altération résultant de l'intégration du vecteur rétroviral n'a été observée.

A terme, l'utilisation des vecteurs rétroviraux sera limitée par la taille du transgène qu'ils pourront véhiculer, et par le ciblage de l'insertion du transgène dans l'ADN ou de son expression dans un tissu spécifique car le rétrovirus s'intègre au hasard dans toutes les cellules en division. Il est donc primordial de développer des méthodes alternatives.

Utilisation de cellules embryonnaires précoces pluripotentes

L'une de ces approches consiste à exploiter la capacité de transplantation des cellules embryonnaires au stade blastoderme juste après la ponte. Ces cellules peuvent être prélevées, manipulées au laboratoire et ré implantées

blastoderme juste après la ponte. Ces cellules peuvent être prélevées, manipulées au laboratoire et réimplantées dans un embryon du même stade. Cette opération se traduit par la création de poussins chimères composés de cellules des deux individus de départ. Des poulets chimères ont ainsi été obtenus entre des lignées Leghorn blanche et Barred Plymouth Rock d'une part (Pettite et al., 1990) et Leghorn Blanche et Leghorn Dorée d'autre part (Thoraval et al., 1995). Les cellules réimplantées dans l'embryon receveur participent à l'élaboration de plusieurs tissus ou organes du futur poussin, dont les mélanocytes (plumage), la lignée érythropoïétique (cellules du sang) ou le tissu germinale (les gamètes). La réimplantation des cellules est d'autant plus efficace lorsque l'on retarde en l'irradiant le développement de l'embryon receveur sans compromettre sa viabilité (Carscience et al., 1993; Thoraval et al., 1995). Des poulets chimères ont ainsi été obtenus dont le plumage était composé de plus de 75% de cellules originaires du donneur (figure 2). Dans d'autres cas, la lignée germinale était composée exclusivement de cellules provenant du donneur et 100% de leur descendance correspondait au phénotype du donneur (Carscience et al., 1993).

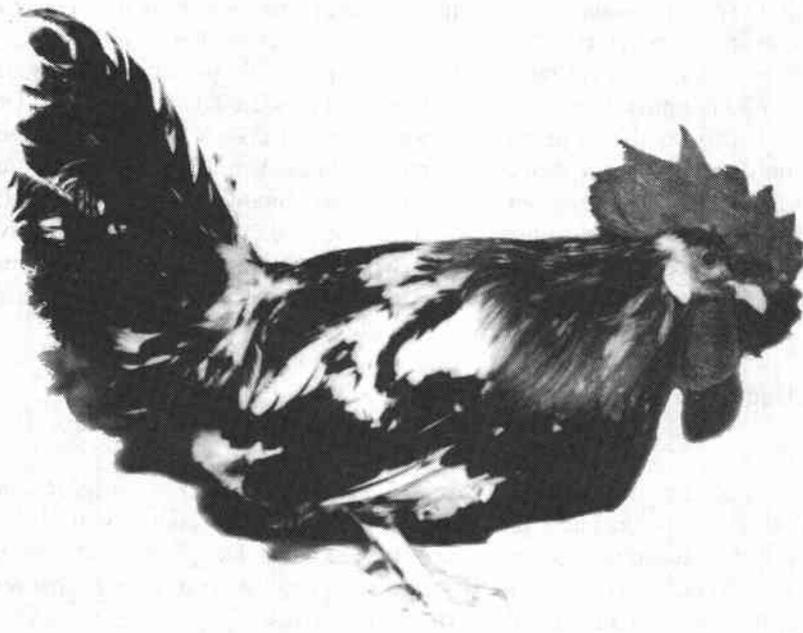


Figure 2: Le poulet chimère résulte du développement de deux types de cellules embryonnaires : les cellules Leghorn blanche, qui donnent un plumage blanc et les cellules Leghorn dorée, qui fournissent les tâches de plumage roux.

Ces résultats offrent des perspectives tout à fait séduisantes. En effet, il est maintenant possible de cultiver pendant quelques semaines ces cellules embryonnaires au stade blastoderme avant de les réimplanter dans un embryon receveur. Cette phase de manipulation *in vitro* des cellules embryonnaires sera utilisée pour introduire dans le génome de ces cellules un transgène porté ou non par une structure rétrovirale. Cette nouvelle technologie devrait permettre d'augmenter les rendements d'obtention de poulets transgéniques. Dans un avenir proche, il devrait être également possible, comme cela existe déjà chez la souris, de réaliser sur les cellules embryonnaires en culture un processus de recombinaison homologe, dans lequel le transgène se substituerait rigoureusement au gène correspondant dans le génome de la cellule traitée.

D'autres techniques en cours d'élaboration ont comme support, pour véhiculer le transgène, les cellules primordiales germinales (cellules précurseurs des gonades) (Vick et al., 1993; Alloli et al., 1994). Ces techniques devraient également aboutir à une amélioration des rendements en matière de transgénèse aviaire.

Les applications potentielles de la transgénèse chez le poulet

La seconde question posée concerne le choix du ou des gènes à transférer. Nous nous limiterons ici sans vouloir être exhaustif à donner trois exemples d'applications potentielles. Ces applications concernent les domaines de la

physiologie, de la pathologie ou de la biotechnologie.

Etude du contrôle génétique du métabolisme des lipides

L'amélioration d'un caractère physiologique (croissance, ponte) résulte d'interactions polygéniques et de ce fait, l'animal transgénique qui aura reçu l'un des gènes intervenant dans ce processus n'exprimera pas forcément le bénéfice attendu. D'autre part, les gènes codant pour des hormones ont été caractérisés et des facteurs de croissance impliqués dans la reproduction et la croissance du poulet ont été clonés. Cependant, des poulets transgéniques ayant intégré le gène de l'hormone de croissance par l'intermédiaire d'un vecteur rétroviral présentent un taux d'hormone plus élevé que les poulets normaux mais sont de la même taille que ces derniers (Bosselman et al., 1990).

Il existe cependant des cas où la transgénèse peut apporter une perspective d'application dans le domaine de la physiologie, parmi ceux-ci, le contrôle génétique du métabolisme des lipides est d'ores et déjà envisagé. L'analyse du niveau d'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la lipogénèse et le transport des triglycérides (enzyme malique, acétyl-CoA carboxylase, synthétase des acides gras, delta-9 désaturase, apoprotéines A1, B et VLDL II) a été réalisée dans deux lignées de poulet grasses et maigres obtenues par Leclercq et al. (1980) à la Station de Recherche Avicole de Tours. Le laboratoire de M. Douaire à l'ENSA de Rennes a montré que le taux relatif des ARNs de l'Apoprotéine A1 et de la delta-9 désaturase ainsi que l'activité enzymatique de cette dernière, étaient fortement corrélés au caractère d'adiposité (Douaire et al., 1992). Des travaux *in vitro* ont montré que le gène codant pour la delta-9 désaturase pouvait exercer un effet majeur et être au centre de la régulation de toute une voie métabolique, la synthèse et la sécrétion des triglycérides. Il est donc raisonnable de penser que dans un avenir proche, le gène visant à rendre génétiquement maigre les poulets de chair aura été identifié et qu'il pourra être utilisé comme gène candidat dans des expériences de transgénèse.

Résistance génétique aux maladies viro-induites

En pathologie, la résistance aux maladies virales est un domaine dans lequel la transgénèse pourrait déboucher, à moyen terme. Des données expérimentales préliminaires ont été obtenues pour le virus de l'influenza (Garber et al., 1991) et le virus de la maladie de Newcastle (Cosset et al., 1991). Des gènes cellulaires ou viraux rendant les cellules résistantes à l'infection ont été identifiés pour ces deux types de virus et sont ainsi des candidats de choix pour tenter d'obtenir des poulets transgéniques, résistants à ces virus.

Dans le cas des tumeurs viro-induites, une étape supplémentaire a été franchie puisque des lignées de poulets transgéniques résistants aux virus leucosiques aviaires ont d'ores et déjà été décrites (Salter et al., 1993). Ces poulets résultent de l'injection du gène de la protéine d'enveloppe de ces virus dont la présence à la surface des cellules bloque une infection ultérieure. Ces animaux sont devenus réfractaires à l'infection virale et sont donc incapables de développer des tumeurs.

Le blocage de la pénétration ou de l'expression de l'agent infectieux n'est pas la seule voie d'approche pour créer des poulets transgéniques résistants aux tumeurs. Dans le cas de la maladie de Marek, provoquée par un virus Herpès, on sait que des gènes portés par une région chromosomique particulière, le complexe majeur d'histocompatibilité (ou complexe B chez le poulet), sont responsables de la résistance aux tumeurs induites par ce virus. Ainsi, les poulets d'haplotype B21 infectés par le virus sont résistants à la maladie de Marek. Cette résistance est un caractère dominant monogénique. Le complexe B comporte des gènes intervenant dans la réponse immune (gènes de classe I ou de classe II) ainsi que d'autres gènes, dont le rôle est encore mal défini. Cependant, on peut espérer dans un avenir proche que le ou les gènes B21 responsables de la résistance à la maladie de Marek soient identifiés. Leur transfert, par les techniques de transgénèse, à des poulets sensibles devrait alors conférer la résistance à la maladie de Marek et constituer ainsi une alternative à la vaccination qui n'apporte pas dans tous les cas le degré de protection attendu.

Production de protéines recombinantes dans l'oeuf

L'une des applications majeures de la transgénèse aviaire en biotechnologie pourrait être la production de protéines recombinantes dans l'oeuf. En effet, la composition en protéine de l'oeuf et leur biosynthèse sont

maintenant bien connues. Les gènes codant pour les deux protéines majeures de l'albumen, l'ovalbumine et le lysozyme ont été bien étudiés au niveau moléculaire, et la régulation de leur expression commence à être élucidée. Il devrait être possible dans un avenir proche de modifier les gènes codant pour les protéines de l'albumen afin de diriger l'incorporation de protéines recombinantes directement dans le blanc d'oeuf. La purification de ces protéines ne devrait pas alors poser de problème majeur puisque plusieurs protéines endogènes de l'oeuf comme le lysozyme, l'ovalbumine ou l'avidine sont déjà purifiées à partir de l'oeuf pour des applications industrielles ou autres.

Une large catégorie de protéines pourraient être produites dans l'oeuf de poule et particulièrement celles qui sont actuellement synthétisées à partir de culture de cellules de mammifères. Parmi celles-ci, la production d'immunoglobulines dans les oeufs de poules transgéniques pourrait avoir dès à présent plusieurs applications. En effet, les immunoglobulines s'accumulent à la fois dans le jaune d'oeuf et dans l'albumen. Chaque jaune d'oeuf peut contenir jusqu'à 400 mg d'IgY, une forme particulière d'IgG, alors que l'albumen contient des quantités moindre d'IgM ou d'IgA (Burley et Vadehra, 1989). Les IgY aviaires ne fixent pas le complément de mammifère, mais se lient à la protéine A de *Staphylococcus aureus*. Ces caractéristiques font des IgY un matériel particulièrement intéressant pour les tests immunocytochimiques ou les dosages immunoenzymatiques de type ELISA. Les techniques de transgénèse pourraient être utilisées pour permettre une production élevée dans le jaune d'oeuf ou dans l'albumen, de clones particuliers d'IgY. Les IgY peuvent également être utilisées comme agents prophylactiques. Des IgY purifiées de poules immunisées à l'aide de rotavirus et administrées à des souris induisaient en effet une protection passive contre l'infection par des rotavirus murins (Bartz et al., 1980). Ainsi la protection de l'homme ou de l'animal contre les maladies entériques à l'aide d'IgY est une possibilité qu'il convient de considérer. Une extension de cette approche grâce à l'obtention de poules transgéniques pourrait être la production d'anticorps "humanisés" à des fins thérapeutiques.

Dans cette optique, la production de poules transgéniques présenterait un certain nombre d'avantages : la faible durée du temps de génération (six mois), la quantité d'oeufs pondus par une poule (250/an) et la simplicité de la collecte des oeufs comparativement à la traite du lait par exemple. De plus, les espèces avicoles figurent parmi les espèces domestiques dont les coûts de production sont les plus faibles et de ce fait la transgénèse aviaire à des fins de production de protéines recombinantes pourrait être promise à un riche avenir.

Conclusion

A l'heure actuelle, l'utilisation des vecteurs rétroviraux est une méthodologie opérationnelle pour l'obtention de poulets transgéniques à des fins expérimentales. La transgénèse constitue en effet une stratégie irremplaçable pour identifier le rôle *in vivo* des gènes impliqués dans des phénomènes physiologiques complexes ou dans des mécanismes de résistance aux maladies. Des méthodes alternatives sont en cours d'élaboration qui permettront à terme de s'affranchir de l'utilisation des vecteurs rétroviraux. La disponibilité de telles méthodes devrait s'accompagner d'un développement important des applications de la transgénèse aviaire dans différents domaines de recherches pouvant aboutir à des améliorations zootechniques, ainsi que dans des perspectives de productions biotechnologiques.

Références bibliographiques

- Allioli N., Thomas J. L., Chebloune Y., Nigon V. M., Verdier G. and Legras C. 1994 *Dev. Biol.*, 165, 30-37.
Bartz C. R., Conklin R. H., Tunstall C. B. and Steele J. H. 1980 *J. Infect. Dis.*, 142, 439-441.
Benchaïbi M., Mallet F., Thoraval P., Savatier P., Xiao J. H., Verdier G., Samarut J. and Nigon V. M. 1989 *Virology*, 169, 15-26.
Bosselman R. A., Hsu R., Boggs T., Hu S., Bruszewski J., Ou S., Kozar L., Martin F., Green C., Jacobsen F., Nicolson M., Schulz J. A., Seman K. M., Richell N. and Stewaert R.G. 1989 *Science*, 243, 533-535.
Bosselman R. A., Hsu R., Briskin M. J., Boggs T., Hu S., Nicolson M., Souza L. M., Schultz J. A., Rishell W. and Stewart R. G. 1990 *J. Reprod. Fertil.*, 41, 183-195.
Burley R. W. and Vadehra D. V. 1989 *The Avian Egg*, p. 472, John Wiley and Sons.
Carscience R. S., Clark M. E., Verrinder-Gibbins A. M. and Etches R. J. 1993 *Development*, 117, 669-675.
Cossat F. L., Legras C., Thomas J. L., Molina R. M., Chebloune Y., Faure C., Nigon V. M. and Verdier G. 1991 *J. Virol.*, 65, 3388-3394.
Cossat F. L., Bouquet J. F., Drynda A., Chebloune Y., Rey-Senelongue A., Kohen G., Nigon V. M., Desmettre

- P. and Verdier G. *Virology*, 185, 862-866.
- Douaire M.; Le Fur N., Mounier-El Khadir J. M., Langlois P., Flamant F. and Mallard J. *Poult. Sci.*, 71, 1911-1920.
- Garber E., Chute H. T., Condra J. H., Gotlib L., Colonno R. J. and Smith R. G. 1991 *Virology*, 180, 754-762.
- Leclercq B., Blum J. C. and Boyer J. P. 1980 *Br. Poult. Sci.*, 21, 107-113.
- Love J., Gribbin C., Mather C. and Sang H. 1994 *Bio/technology*, 12, 60-63.
- Perry M. M. 1988 *Nature*, 331, 70-72.
- Petitte J. N., Clark M. E., Liu G., Verrinder-Gibbins A. M. and Etches R. J. 1990 *Development*, 108, 185-189.
- Salter D. W., in *Manipulation of the Avian genome* (Etches R. J. and Verrinder Gibbins A. M., eds), pp. 135-150, CRC Press.
- Thoraval P., Afanassieff M., Cosset F. L., Lasserre F., Verdier G., Coudert F. and Dambrine G. 1995 *Trans. Res.* in press.
- Thoraval P., Lasserre F., Coudert F. and Dambrine G. 1995 *Poult. Sci.*, 1995, in press.
- Vick L., Luke G. and Simkiss K. 1993 *J. Reprod. Fertil.*, 98, 637-641.
- Watanabe S. and Temin H. M. 1983 *Mol. Cell. Biol.*, 3, 2241-2249.