

## RESISTANCE GENETIQUE AUX SARCOMES AVIAIRES RESISTANCE ANTI-VIRALE OU ANTI-TUMORALE?

Thoraval Pierrick <sup>1</sup>, Chaussé Anne-Marie <sup>1</sup>, Esnault Evelyne <sup>1</sup>, Bouret Danielle <sup>2</sup>, Luneau Gillette <sup>2</sup>,  
Coudert Françoise <sup>1</sup>, Dambrine Ginette <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de virologie et d'oncologie aviaire, Station de pathologie aviaire et de Parasitologie,  
INRA, 37380 Nouzilly, France.

<sup>2</sup> Unité Poule Histocompatibles, Domaine du Magneraud, INRA, Saint Pierre d'Amilly 17700 Surgères,  
France.

### Résumé

Le virus du sarcome de Rous (RSV) est capable de provoquer chez le poulet le développement de tumeurs du tissu conjonctif. Ce rétrovirus porte dans son génome à la fois les gènes nécessaires à sa réplication (gènes gag, pol et env) et l'oncogène v-src responsable de la cancérisation. L'évolution des tumeurs induites par le RSV est variable d'un oiseau à l'autre et cette variabilité est génétiquement contrôlée. Nous avons sélectionné sur plusieurs générations deux sous populations divergentes de poulets, l'une présente le caractère progressif (augmentation de la taille de la tumeur et mort possible de l'oiseau), l'autre présente le caractère régressif (diminution de la taille de la tumeur et rejet éventuel). Afin d'analyser les caractères impliqués dans la sensibilité ou la résistance génétique au développement des tumeurs induites par le RSV, nous avons cherché à induire des tumeurs en présence ou en absence de production virale. Nous avons pour cela mis au point l'induction de tumeur par inoculation d'ADN ne contenant que les séquences du gène v-src. Puis nous avons comparé dans nos deux lignées divergentes le devenir des tumeurs induites par le virus ou par l'ADN v-src. Les résultats obtenus montrent que des poulets résistants aux tumeurs induites par le virus peuvent être sensibles aux tumeurs induites par l'ADN v-src. Ces lignées de poulets constituent un modèle expérimental particulièrement intéressant pour identifier les marqueurs génétiques associés à ce phénomène et pour rechercher les gènes responsables de la résistance anti-virale.

### Introduction

L'infection par les rétrovirus aviaires est un phénomène couramment observé dans les troupeaux de production. La seule prophylaxie que l'on possède à l'heure actuelle est l'éradication des poules infectées. L'introduction de gènes de résistance dans les schémas de sélection pourrait constituer une alternative dans la lutte contre les tumeurs rétrovirales. Les sarcomes aviaires constituent à cet égard un modèle expérimental de choix. Les objectifs de nos travaux visent à la compréhension des mécanismes de résistance aux sarcomes aviaires.

Le virus du sarcome de Rous est capable de provoquer le développement de tumeurs du tissu conjonctif dont l'évolution variable d'un oiseau à l'autre est génétiquement contrôlée. Les gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ainsi que les locus rétroviraux endogènes semblent être impliqués dans le contrôle de la résistance aux sarcomes aviaires. Ainsi, certains haplotypes du CMH ont été associés à la résistance au développement des sarcomes aviaires alors que d'autres haplotypes étaient reliés à un phénotype de sensibilité. Le CMH ne semble pas être le seul locus impliqué dans la résistance ou la sensibilité des poulets au développement des tumeurs viro-induites,

de nombreux phénomènes interviennent dans le contrôle des réactions immunitaires qui se mettent en place lors du développement tumoral. Dans ce contexte, l'expression des protéines virales endogènes qui résulte de séquences étroitement apparentées aux génomes rétroviraux aviaires peut moduler le développement des tumeurs induites par les virus exogènes. Certains locus rétroviraux endogènes conduisent en effet à la traduction constitutive de protéines rétrovirales qui s'expriment pendant le développement embryonnaire et induisent un état de tolérance immunitaire vis à vis d'une infection rétrovirale exogène, favorisant ainsi le développement des tumeurs. Ainsi, l'effet des locus endogènes a déjà été décrit dans la progression et la régression des sarcomes dans des lignées congéniques (Plachy et al., 1985).

### Description du modèle expérimental

Nous avons sélectionné depuis plusieurs générations deux sous-populations de poulet d'haplotype B19 divergentes, l'une présentant le caractère "progressif" (augmentation de la taille des tumeurs et mort possible de l'animal) appelée lignée P, l'autre le caractère "régressif" (diminution de la taille de la tumeur et rejet éventuel) appelée lignée R.

La divergence des lignées P et R a été obtenue à la suite d'une seule opération de sélection (Dambrine et al., 1986). Le choix des reproducteurs avait été effectué par progeny test, selon les critères suivants :

- pour les pères, le critère retenu avait été la moyenne du volume maximum des sarcomes apparus chez leur descendants. Ainsi, il avait été possible de discriminer des pères dits "régresseurs" lorsque le volume des sarcomes se situait dans le tiers inférieur et des pères dits "progresseurs" lorsque ce volume se situait dans le tiers supérieur.

- pour les mères, c'est le critère "écart de la moyenne de la mère à la moyenne du père" qui avait permis de différencier les mères "régresseurs" (écart négatif) des mères "progresseurs" (écart positif).

Pour les générations ultérieures, le choix des reproducteurs a été effectué parmi les collatéraux des sujets expérimentaux, selon les critères précédemment définis (Thoraval et al., 1992)

### **Rôle du CMH dans la résistance ou la sensibilité des poulets aux tumeurs induites par le RSV**

Les poulets progresseurs et régresseurs possédaient le même haplotype B19, d'après les données fournies par les réactions d'hémagglutination dans lesquelles sont détectés les antigènes érythrocytaires de classe IV codés par les gènes de la région B-G. De plus, après hybridation des ADN de ces poulets avec une sonde B-G (isolée dans le laboratoire de M. Miller, Davis USA), tous les sujets étudiés présentaient un diagramme de restriction (RFLP) identique, confirmant ainsi les tris sérologiques initiaux. Cependant, l'analyse de l'ADN des mêmes individus à l'aide des sondes B-F (classe I) et B-L b (classe II) (isolées dans le laboratoire de C. Auffray, CNRS, Villejuif) nous a conduits à mettre en évidence 3 sous-types homozygotes (H1, H2 et H3) ainsi que les diagrammes hétérozygotes correspondants (Chaussé et al., 1990). Ces trois sous-types étaient également répartis entre les progresseurs et les régresseurs à l'exception du sous-type H1 mis en évidence exclusivement chez les progresseurs. En deux générations, nous avons sélectionné des poulets homozygotes pour chacun des sous types à la fois chez les progresseurs et chez les régresseurs. L'analyse par sous-type indique qu'il existe des animaux P et R pour chacun des sous-types identifiés (à l'exception des poulets H1 qui sont tous progresseurs). Ces résultats semblent indiquer que la résistance ou la sensibilité aux tumeurs induites par le virus du sarcome de Rous pourrait ne pas être, du moins dans nos lignées P et R, directement liée au CMH.

### **Les locus rétroviraux endogènes**

Les locus rétroviraux endogènes sont également des gènes candidats pour expliquer la résistance ou la sensibilité aux tumeurs induites par le virus du sarcome de Rous. Une première analyse avait montré qu'un large polymorphisme (16 diagrammes de restriction différents) pouvaient être mis en évidence au sein de la population de poulet B19. La souche de poulets B19 appartient à la race Leghorn blanche qui sert de référence en matière d'endogènes rétroviraux. De ce fait, il nous a été possible d'identifier parmi tous les fragments révélés par la sonde correspondant au génome du rétrovirus auxiliaire RAV-2 ceux qui correspondent à un locus rétroviral exprimé. Pour identifier ces différents locus, nous avons utilisé des ADN "dits de référence" obtenus à partir d'animaux dont les locus rétroviraux endogènes ont été identifiés. Ces ADN nous ont été fournis par M. Boichard (Génétique Factorielle, INRA de Jouy en Josas). Ces ADN de référence et ceux issus des poulets B19 ont été digérés par les enzymes Bam HI ou Sac I et hybridés après transfert avec la sonde RAV-2. Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence au moins 3 locus rétroviraux endogènes au sein de notre troupeau B19. Ces locus, ev-1 et ev-9 correspondent à des locus soit silencieux (ev-1, gs-chf-) soit partiellement exprimés (ev-9; gs-chf+, exprimant les protéines d'enveloppe). Un troisième locus a également été identifié qui ne possède pas d'analogie avec les locus connus chez les poulets Leghorn blanc.

Toutefois, ces analyses ne nous permettent pas de conclure quant au rôle des locus rétroviraux endogènes dans la régression ou la progressions des tumeurs induites par le RSV.

### **Mise au point d'un modèle d'étude de la résistance/sensibilité aux tumeurs en l'absence d'infection rétrovirale**

L'infection par le virus du sarcome de Rous induit chez le poulet le développement de réponses immunitaires anti-virales et anti-tumorales, d'où la complexité des phénomènes de sensibilité ou de résistance aux tumeurs viro-induites. Ces réponses immunitaires peuvent en effet être dirigées contre des antigènes différents (antigènes rétroviraux gag, pol et env pour la réponse anti-virale et antigènes produits lors de la transformation des cellules par l'oncogène src pour la réponse anti-tumorale). Il nous a paru important de disposer d'un outil permettant de déterminer la part de chacune de ces réponses dans le modèle B19 que nous avons construit.

Plusieurs études, rapportées dans la littérature, ont montré qu'il était possible d'obtenir le développement de sarcome chez le poulet après injection dans le muscle d'un ADN comportant les séquences codantes de l'oncogène v-src, en l'absence de toute production virale. Nous avons donc appliqué

cette stratégie pour l'étude de la résistance/sensibilité aux sarcomes aviaires dans les différentes lignées B19. A cet effet, 60 poussins B19 d'un jour appartenant à un sous-type progressateur (H2P) ont été injectés avec des fragments d'ADN comportant les séquences codantes de l'oncogène v-src dérivées du virus RSV de la souche Schmidt Ruppin de sous groupe A. Différentes constructions ont été testées contenant les séquences src encadrées par des séquences non codantes issues du RSV de longueur variable, situées en amont et en aval du gène v-src. Les résultats obtenus nous ont permis d'identifier une séquence minimale permettant d'obtenir 100% de tumeur chez les poussins inoculés. Cette séquence contient outre l'oncogène src une courte séquence non codante en 5' et en 3' une partie de la région U3 de la LTR 3'. Cette dernière qui contient une séquence de type "enhancer" s'avère indispensable à l'induction des tumeurs. Une étude moléculaire a permis de montrer que l'ADN inoculé était retrouvé dans le génome des cellules tumorales intégré sous la forme de concatémères reconstituant ainsi un pseudo virus constitué de la séquence src encadrée par deux séquences de la LTR partiellement délétée.

#### Application du modèle

Nous avons choisi dans un premier temps à l'aide de la séquence ADN "src" (construction Acc I dérivée du génome du RSV de la souche Schmidt Ruppin de sous groupe D : RSV SR D) précédemment identifiée d'inoculer des poulets de sous-type H3 appartenant aux deux lignées P et R. Parallèlement, des poulets appartenant au même sous-type ont été inoculés avec le virus RSV SR D. Au total, 80 poulets de 4 semaines ont ainsi été inoculés. L'évolution des tumeurs a été mesurée pendant 9 semaines. Les résultats obtenus indiquent que les poulets H3 de la lignée P ou de la lignée R développent des tumeurs de manière identique après inoculation par l'ADN v-src alors que les poulets H3 de la lignée R ne développent pas de tumeurs lorsqu'ils sont inoculés avec le virus RSV SR D. Ce résultat semble donc indiquer que le système immunitaire des poulets H3 R serait capable d'éliminer les cellules tumorales lorsque celles-ci sont induites par le virus (RSV SR D) mais qu'il ne contrôlerait pas le développement de tumeurs lorsque celles-ci sont induites par l'ADN (en absence de production virale). Cette réponse immunitaire serait alors dirigée exclusivement contre des antigènes viraux et non contre des antigènes tumoraux.

#### Conclusion

Les lignées P et R que nous avons sélectionnées parmi nos poulets d'haplotype B19 représentent un modèle de choix pour l'étude de la résistance ou de la sensibilité aux tumeurs induites par le virus du sarcome de Rous. Ces lignées sont maintenant

parfaitement caractérisées pour le polymorphisme de leurs gènes du complexe majeur d'histocompatibilité, ainsi que pour leur locus rétroviraux endogènes. Si le CMH ne semble pas directement impliqué dans la progression ou la régression des tumeurs induites par le RSV, les locus rétroviraux endogènes pourraient quant à eux jouer un rôle. Les expériences que nous avons réalisées vont dans ce sens. En effet, nous avons montré qu'il existait, chez les animaux régresseurs (H3R), une différence lorsque les tumeurs étaient induites par un virus répliquatif (RSV SR D) ou en absence de réplication virale (ADN v-src). Les animaux H3R qualifiés de régresseur (absence de développement tumoral) lorsqu'ils sont inoculés par le virus deviennent progressateur (développement tumoral) lorsqu'ils sont inoculés par l'ADN correspondant au gène v-src. Les réactions immunitaires mises en jeu lors de la réaction de rejet de la tumeur seraient donc plutôt dirigées contre les déterminants antigéniques des gènes viraux (produits des gènes gag, pol ou env). Ce phénomène n'est observé que chez les animaux de la lignée régresseur (H3R), les animaux de la lignée progressateur (H3P) étant sensible au développement tumoral que les tumeurs soient induites par le virus ou par l'ADN v-src. Les animaux H3P seraient donc incapables de produire une réaction immunitaire dirigée contre les déterminants des gènes viraux. Les locus rétroviraux endogènes pourraient expliquer cette différence. Parmi les locus connus, certains sont exprimés (production de protéines gag ou env). Cette expression est mise en place très tôt au cours du développement embryonnaire, si bien que les animaux deviennent tolérants à l'expression de ces protéines. On peut alors imaginer que les poulets de la lignée H3P possèdent des locus rétroviraux endogènes exprimant ces protéines gag ou env et sont donc tolérants lorsqu'ils sont inoculés avec le virus RSV à l'expression à la surface des cellules tumorales des protéines gag ou env produites par le virus exogène. Les réactions immunitaires sont alors faibles et la tumeur peut se développer. Suivant la même hypothèse, les poulets de la lignée H3R posséderaient des locus rétroviraux endogènes n'exprimant pas les protéines gag ou env. Ces animaux seraient alors capables de reconnaître comme étrangères ces protéines produites par le virus exogène à la surface des cellules tumorales et ainsi de rejeter la tumeur. Nous testons actuellement cette hypothèse en analysant la répartition et l'expression des locus rétroviraux endogènes au sein des deux lignées P et R. Nous avons également entrepris d'étudier la ségrégation à la fois du phénotype Progressateur ou Régresseur et des locus rétroviraux endogènes lors de croisement entre les lignées H3P et H3R.

#### Références

**Chaussé A.M., Thoraval P., Coudert F., Auffray C. and Dambrine G., Avian Dis., 1990, 34, 934-940.**

**Dambrine G., Millet N., Boyer J.P., Coudert F et Cauchy L., Sci. Tech. Anim., 1986, 11, 15-24.**

**Plachy J., Korek E., Hlozaneck I. and Zdenkova E., Folia Biol., 1985, 31, 235-340.**

**Thoraval P., Chaussé A.M., Coudert F. and Dambrine G., Avian Immunology in Progress, collection les Colloques de l'INRA, Paris, n°62, 1993, 211-217.**