

**Evaluation des pré-normes du CEN pour le monitoring  
d'organismes génétiquement modifiés**

Programme d'appui scientifique  
à la normalisation

volet II

**Rapport final**

Services fédéraux des  
AFFAIRES SCIENTIFIQUES,  
TECHNIQUES ET CULTURELLES



RAPPORT FINAL: PRGM NO/50/012

**TITRE: EVALUATION DES PRÉ-NORMES DU CEN/TC233 POUR LE  
MONITORING D'ORGANISMES GENETIQUEMENT MODIFIES**

**COORDINATION: DR. W. MOENS  
COLLABORATEURS PRINCIPAUX: DR. J-M. COLLARD ET JEAN-CLAUDE DUMON  
ASSISTANCE TECHNIQUE: DIRK VERBRUGGE  
ASSISTANCE ADMINISTRATIVE: D. CARLIER**

**RÉSUMÉ:**

LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE FIXAIT COMME CADRE INITIAL L'ÉVALUATION DES PRE-NORMES CEN TC233 N° 11-15 ET 20-21 RELATIVES AU MONITORING DES OGM.

DANS CE CONTEXTE, TROIS MODÈLES DE MONITORING D'OGM ONT ÉTÉ TESTÉS QUI CONCERNAIENT SPÉCIFIQUEMENT:

1. LE TRAÇAGE DE GÈNES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DANS DES ENVIRONNEMENTS NON-CLINIQUES (JM. COLLARD)
2. L'ÉVALUATION DU TRAÇAGE DE VECTEURS RECOMBINANTS VIRAUX UTILISÉS EN THÉRAPIE GÉNIQUE (JC. DUMON)
3. LA DÉTECTION DE PLANTES TRANSGÉNIQUES DANS DES ALIMENTS À USAGE HUMAIN OU ANIMAL.(D. VERBRUGGE)

**RESULTATS: PROPOSITIONS AUX ADMINISTRATIONS CONCERNÉES:**

DANS LES TROIS MODÈLES, LES PRE-NORMES DU CEN SE SONT AVÉRÉES TRÈS GÉNÉRALES SINON INUTILES. DANS LE CAS DU TRAÇAGE DE GÈNES DANS L'ENVIRONNEMENT, CES PRE-NORMES SONT SATISFAISANTES PARCE QU'ELLES COUVRENT UN DOMAINE EXTREMEMENT VASTE ET VARIÉ DONT ON NE PEUT PAS PRÉVOIR LA DIVERSITÉ DES SITUATIONS DE MONITORING SPÉCIFIQUES. DANS LE CAS DU TRAÇAGE DES VECTEURS RECOMBINANTS VIRAUX, LES PRÉ-NORMES SONT PEU SATISFAISANTES CAR DANS LE CAS DU TRAÇAGE DES PLANTES TRANSGÉNIQUES DANS L'ALIMENTATION, CES PRE-NORMES SONT TROP VAGUES. EN EFFET, LE TYPE DE GÈNE À TRACER EST CELUI D'OGM AUTORISÉS DE MISE SUR LE MARCHÉ POUR LESQUELS DES DONNÉES MOLECULAIRES TRÈS DÉTAILLÉES EXISTENT ET À RECHERCHER DANS DES MATRICES PHYSICO-CHIMIQUES QUI FONT L'OBJET D'AUTRES NORMES. DANS CE CAS, IL EST PARFAITEMENT JUSTIFIÉ D'ENVISAGER LA MISE AU POINT DE NOUVELLES NORMES DÉTAILLÉES TRÈS COMPLÈTES.

LES SEULS ÉLÉMENTS NORMATIFS PRÉCIS ET SPÉCIFIQUES RECOMMANDABLES DANS LES TROIS CAS SONT CERTAINEMENT LES SÉQUENCES NUCLEOTIDIQUES NÉCESSAIRES POUR TRACER UNE CIBLE GÉNÉTIQUE DONNÉE PAR LES MÉTHODES DE PCR. LES MÉTHODES EN AMONT DE LA PCR SONT PLUS VARIÉES ET DÉPENDENT DE LA MATRIÈRE ENVIRONNEMENTALE OU ALIMENTAIRE AUXQUELLES ELLES S'APPLIQUENT.

#### 4. Traçage de gènes de résistance à la tétracycline dans des boues activées (J-M. Collard). (Avec l'aide des Services techniques de l'Hopital Erasme)

Modele d'échantillonnage: Acides nucléiques abondants, hautement hétérogènes où la cible de traçage est fortement diluée et donc en compétition avec des AND compétiteurs.

### 1. Objectifs visés

Le but du présent projet était d'évaluer techniquement les prénormes issues du Working Group 3 du Technical Committee (TC)233 du CEN relatives aux procédures qui visent à détecter et surveiller des micro-organismes génétiquement modifiés (à l'exclusion des virus) disséminés dans l'environnement.

Les trois pré-normes du CEN considérées dans cette partie du travail sont les suivantes:  
**prEN 12685**: Biotechnologie - Organismes modifiés disséminés dans l'environnement - Guide des stratégies de surveillance pour les disséminations volontaires de microorganismes génétiquement modifiés, à l'exclusion des virus (Décembre 1996) (fournie en annexe I);  
**prEN 12686**: Biotechnologie - Organismes modifiés disséminés dans l'environnement - Guide des stratégies d'échantillonnage pour les disséminations volontaires de microorganismes génétiquement modifiés, à l'exclusion des virus (Décembre 1996) (fournie en annexe II);  
**prEN 12687**: Biotechnologie - Organismes modifiés disséminés dans l'environnement - Guide pour la caractérisation de l'organisme génétiquement modifié par l'analyse de la modification génomique (Décembre 1996) (fournie en annexe III).

L'examen de ces pré-normes a révélé que les documents prEN 12685 et prEN 12686 fournissaient à l'expérimentateur des listes de points ou de paramètres directeurs qu'il convient de prendre en considération afin de déterminer la validité d'une stratégie d'échantillonnage ou de surveillance. Pareillement, la pré-norme prEN 12687 fournit des critères qui permettent de trouver une méthode ou une combinaison de méthodes appropriées à l'analyse de la modification génomique, en fonction de l'objectif de l'analyse.  
Aucune méthode ou protocole relatif à l'échantillonnage et la surveillance d'OGM disséminés dans l'environnement n'est cependant décrit dans ce type de norme.

Etant donné qu'aucune dissémination volontaire de microorganismes génétiquement modifié n'a encore eu lieu en Belgique, et qu'aucun protocole spécifique n'est fourni par les pré-normes, nous avons eu recours à un cas d'étude. Celui-ci vise à détecter la présence et à identifier la distribution de certains déterminants de résistance à la tétracycline dans des échantillons prélevés dans des boues activées de stations d'épuration. Des résultats préliminaires avaient démontré la présence des souches résistantes à la tétracycline dans les boues activées. Ces souches résistantes pouvaient être isolées sur un milieu PCA (Plate Count Agar) utilisé pour l'isolement des bactéries aérobies mésophiles et contenant différentes concentrations de tétracycline (5, 10 et 20 µg/ml).

Notre étude a donc été réalisée en utilisant les paramètres qu'il convenait de prendre en considération dans les pré-normes précitées du CEN. Les listes de paramètres nous a aidé dans l'élaboration et la rédaction des protocoles expérimentaux. Cette approche est qualitative et la technique de surveillance basée au niveau de l'ADN.

### 2. Méthodologie

#### 2.1. Choix de la stratégie et de la technique de détection

Nous avons voulu dans un premier temps développer un approche de surveillance qualitative basée au niveau de l'ADN. La technique utilisée vise à extraire l'ADN directement de l'échantillon à étudier et à rechercher la présence d'un gène par amplification génétique. Cette

détection rapide et spécifique des gènes d'intérêt est une approche qui est de plus en plus utilisée en écologie microbienne comme en témoignent les récentes publications scientifiques dans le domaine.

La technique choisie vise donc à extraire directement l'ADN des micro-organismes présents dans l'échantillon (brut ou prétraité en fonction de sa provenance) et d'ensuite purifier les acides nucléiques pour permettre une recherche rapide des gènes d'intérêt par une méthode *in vitro* d'amplification de fragment d'ADN (PCR ou Réaction de polymérisation en chaîne). La présence ou l'absence des fragments amplifiés peut ensuite être visualisées sur gel d'agarose après migration. Cette électrophorèse d'ADN peut être suivie éventuellement par une hybridation moléculaire permettant à la fois de contrôler la nature du produit PCR et d'améliorer la sensibilité de détection de la technique suivant la méthode d'hybridation envisagée.

La méthode de détection choisie utilise une technique mise au point et validée au SBB pour l'extraction et de purification de l'ADN total à partir de cultures de champignons et d'échantillons cliniques (Van Vaerenbergh *et al.* 1995; Haynes *et al.* 1995).

Le protocole est décrit *in extenso* dans l'annexe I. L'extraction de l'ADN implique une lyse directe non alcaline des micro-organismes dans l'échantillon améliorée par une étape de rupture (agitation vigoureuse) en présence billes de verre pour détruire les structures les plus résistantes (diamètre des billes: 10  $\mu$ m). L'ADN extrait est précipité et ensuite purifié sur une colonne à centrifuger de polyvinylpyrrolidone (PVPP) afin de retenir les inhibiteurs de PCR tels que les acides humiques et fulviques présents dans les sols qui peuvent être co-extraits. Il est en effet important que le protocole d'extraction fournisse des échantillons d'acide nucléique d'une pureté suffisante pour assurer la reproductibilité des résultats PCR et éviter de faux négatifs (pREN12687).

Une autre étude réalisée par Bertelet (1996) démontre également l'efficacité de la purification sur une colonne de polyvinylpyrrolidone pour retenir les acides humiques à partir d'extraits de sols afin d'obtenir un ADN sans inhibiteurs de PCR.

### 3. Résultats

#### 3.1. Choix des amorces spécifiques

La résistance à la tétracycline est déterminée par trois mécanismes, à savoir l'efflux de tétracycline, la protection ribosomique et l'inactivation de l'antibiotique. Les deux premiers mécanismes sont les plus répandus et leurs gènes acquis via des plasmides ou des transposons. Ils ont été décrits à la fois chez les bactéries à Gram<sup>+</sup> ou à Gram<sup>-</sup>, aérobies ou anaérobies, démontrant une large distribution parmi le règne bactérien (Speer *et al.* 1993, Roberts 1994, 1996, 1997). A l'heure actuelle, les gènes codant pour ces mécanismes ont été classifiés en 21 classes (A-E, G, H, K, L, M, O, A(P), B(P), Q, S, T, U, V, X, otrA et otrB) sur base des séquences génétiques (la description de la classification est reprise *in extenso* en Annexe IV). Pour l'étude à réaliser, nous nous sommes restreints aux déterminants les plus fréquemment rencontrés chez les bactéries à Gram-négatif, à savoir TetA, B, C, D, et E. Il faut également souligner que certains de ces déterminants sont présents sur des vecteurs de clonage dérivés de pBR322 (TetC) ou de RK2 (TetA), ainsi que sur des transposons dérivant de Tn1721 (TetA) ou Tn10 (TetB), et donc utilisés comme gènes de sélection dans diverses constructions génétiques. Les classes A, C et G (pJA8122) sont phylogénétiquement proches et apparentées aux classes B, D (RA1), E (pSL1456) et H (pVM111) (Figure 1).

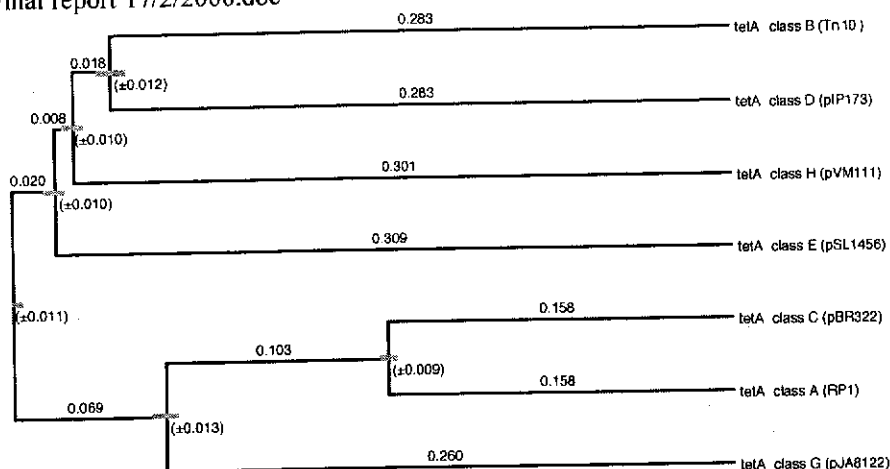


Figure 1: UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) tree of *tetA* gene sequences of classes A through E, G and H. The length of the horizontal lines connecting one sequence to another is proportional to the estimated genetic distance between the sequences (GeneWorks®, Release 2.5).

Ces gènes (A-E, G, H) codent pour une protéine d'export de la famille des 12-TMS (12 segments trans-membranaires) de la super-famille des "facilitateurs majeurs" (major facilitator superfamily: MFS) (Figure 2). Cette protéine fonctionne comme un système d'antiport électro-neutre qui catalyse l'échange d'un complexe tétracycline-cation métallique divalent pour un proton (Paulsen *et al.*, 1996).

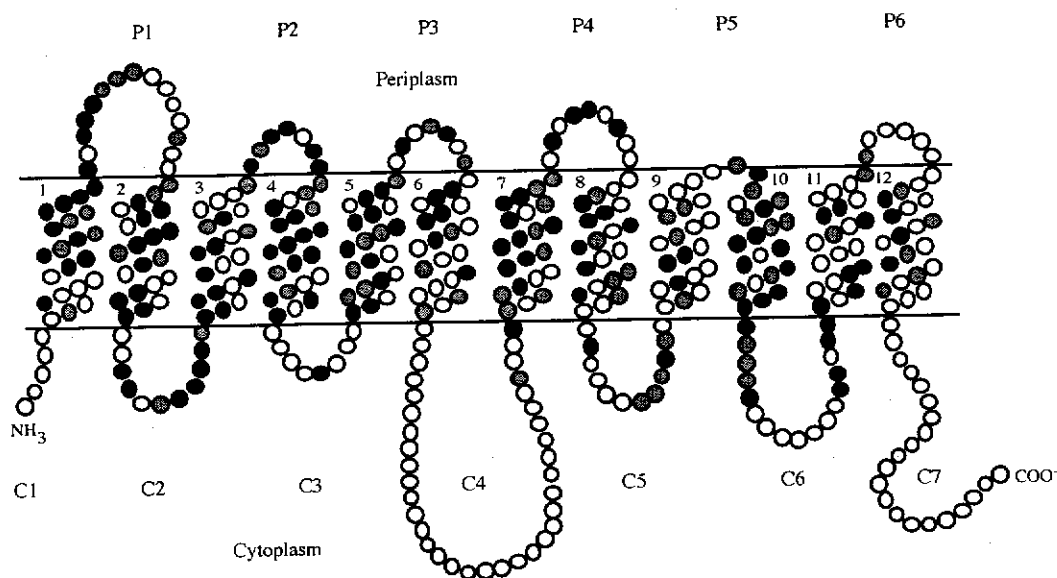


Figure 2: Model of class E TetA membrane topology. Periplasmic and cytoplasmic segments are labeled P1 through P6 and C1 through C7, respectively. Black and grey circles, positions that are identical and similar in all six TetA sequences (Classes A, B, C, D and E), respectively. After Allard J.D. and K.P. Bertrand (1993).

Ces gènes de résistance sont inductibles et uniquement trouvés chez les bactéries à Gram-négatif (Tableau 1).

<i>Actinobacillus</i>	Tet B
<i>Aeromonas</i>	Tet A, B, D, E
<i>Citrobacter*</i>	Tet A, B, C, D
<i>Edwardsiella*</i>	Tet A, D
<i>Enterobacter*</i>	Tet B, C, D
<i>Escherichia*</i>	Tet A, B, C, D, E
<i>Haemophilus</i>	Tet B
<i>Klebsiella*</i>	Tet A, D
<i>Moraxella</i>	Tet B
<i>Pasteurella</i>	Tet B, D, H
<i>Pleisomonas</i>	Tet A, B, D
<i>Proteus*</i>	Tet A, B, C
<i>Pseudomonas</i>	Tet A, C
<i>Salmonella*</i>	Tet A, B, C, D, E
<i>Serratia*</i>	Tet A, B, C
<i>Shigella*</i>	Tet A, B, C, D
<i>Yersinia*</i>	Tet B, D
<i>Vibrio</i>	Tet A, B, C, D, E, G

\* Enterobacteriaceae

adapted from M.C. Roberts (1994)

**Tableau 1:** Distribution des déterminants Tet codant pour un système d'efflux chez les bactéries à Gram-négatif

Afin de détecter spécifiquement chacun de ces déterminants, les séquences nucléotiques de chaque déterminant ont été téléchargées grâce au logiciel SRS (Sequence Retrieval System) accessible sur BEN (Belgian Embnet Node), et alignées pour leurs homologies par le logiciel GeneWorks® 2.5. Des amorces spécifiques ont été recherchées dans des séquences présentant peu d'homologie entre les différents déterminants, en tenant compte de différents paramètres tels que: la spécificité, la longueur, la Tm, la formation de duplex, la formation de structure en épingle à cheveux (hairpin stems), etc.

### 3.2. Validation des amorces spécifiques

Les différentes paires d'amorces conçues ont été testées pour leur spécificité sur de l'ADN de référence, extrait à partir de souches d'*Escherichia coli*. Toutes les paires d'amorces conçues (Tableau 2) se sont révélées spécifiques pour l'amplification de la séquence voulue dans les conditions expérimentales indiquées (Tableau 3).

### 3.3. Protocole d'échantillonnage et d'extraction d'ADN

Les sites de prélèvement étaient des stations d'épuration à boues activées et l'objectif était de rechercher la présence dans la boue activée de déterminants de résistance à la tétracycline des classes A à E et ce, sans étape de cultivabilité des micro-organismes.

Sites de prélèvements:

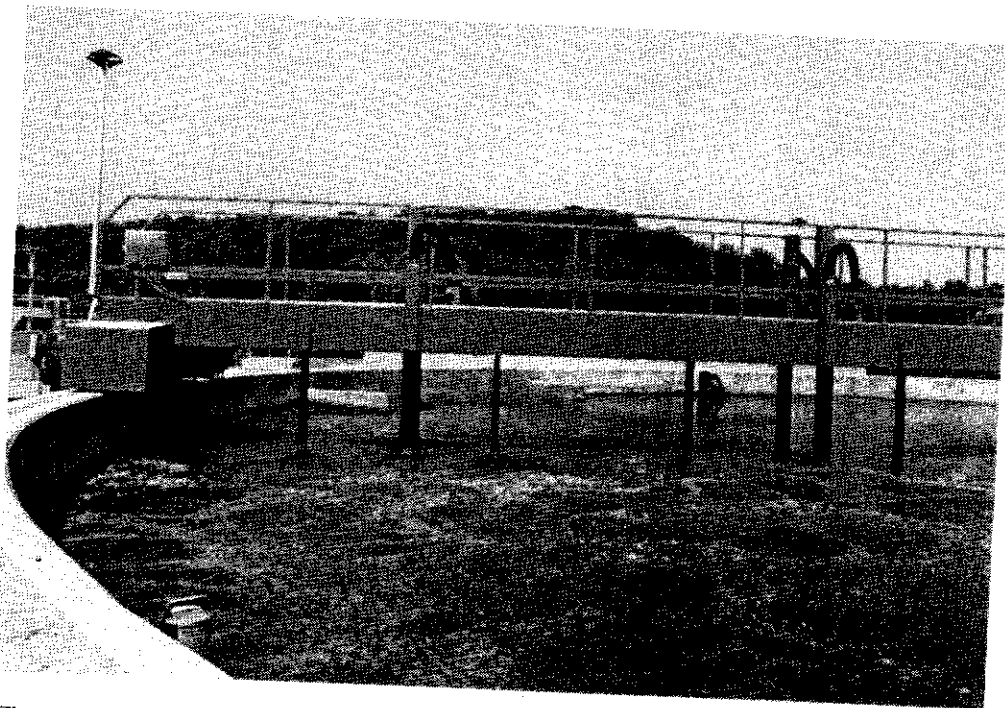
- la Station d'épuration de l'hôpital Erasme (Figure 3) S1 & S2 (2 échantillonnages: un en hiver et un en été);
- la Station d'épuration de la Dyle (Figure 4) (Basse Wavre; 165.000 équivalent-habitants) S3 (échantillonnage l'été);
- la Station d'épuration de la Lasne (Rosière; 125.000 équivalent-habitants) S4 échantillonnage l'été).

Determ.	Oligo name	Primer sequence	Product size (bp)	Primer position	Tm (°C)	Accession no.
TetA	TETAFW4	GGCCTCAATTTCTGACG	568	511	59	X0006
	TETARV2	CATAGATCGCCGTAAGAGG		1078	61	
TetA	TETAFW4	GGCCTCAATTTCTGACG	372	511	59	X0006
	TETARV1	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC		882	60	
TetB	TETBFW3	GAGACGCAATCGAATTCGG	574	586	62	V00611
	TETBRV2	TGAAGGTCATCGATAGCAGG		1159	59	
TetB	TETBFW3	GAGACGCAATCGAATTCGG	228	586	62	V00611
	TETBRV1	TTTAGTGGCTATTCTCCTGCC		813	60	
TetC	TETCFW2	TCCTTGATGCACCATTCC	410	472	63	J01749
	TETCRV1	AGCAAGACGTAGCCCAGCG		881	64	
TetC	TETCFW3	TGCTCAACGGCCTCAACC	379	503	63	J01749
	TETCRV1	AGCAAGACGTAGCCCAGCG		881	64	
TetD	TETDFW2	GGATATCTCACCGCATCTGC	436	459	61	X65876
	TETDRV1	CATCCATCCGGAAGTGATAGC		894	62	
TetD	TETDFW4	CAAGAAAGCGCAGGTATCAGC	315	580	62	X65876
	TETDRV1	CATCCATCCGGAAGTGATAGC		894	62	
TetE	TETEFW2	AACCACATCCTCCATACGCG	452	597	63	L06940
	TETERV2	CGATTACAGCTGTCAGGTGGG		1048	63	
TetE	TETEFW3	TCCATACGCGAGATGATCTCC	442	607	62	L06940
	TETERV2	CGATTACAGCTGTCAGGTGGG		1048	63	

**Tableau 2:** Amorces nucléotidiques utilisées pour l'amplification génétique et conçue à l'aide du programme GeneWorks® 2.5 et Oligo5 sur base des séquences publiées et sur base de l'alignement des séquences.



**Figure 3:** Station d'épuration des eaux usées de l'hôpital Erasme à Bruxelles (Débit journalier moyen: 700 m<sup>3</sup>). Boues activées.



**Figure 4:** Station d'épuration d'eaux usées urbaines (Vallée de la Dyle, Wavre). 165.000 équivalent-habitants; boues activées.

Le protocole d'échantillonnage a été établi en fonction des paramètres directeurs de la pré-norme CEN prEN 12686 - Biotechnologie - Organismes modifiés disséminés dans l'environnement - Guide des stratégies d'échantillonnage pour les disséminations volontaires de microorganismes génétiquement modifiés, à l'exclusion des virus (Décembre 1996). Le protocole devait permettre d'obtenir une représentativité correcte de l'ensemble des microorganismes présents dans les boues activées. Comme déjà dans chaque station la liqueur des

rue J. Wytzman, 14 B-1050 Bruxelles

Tel: 322-6425293

Fax: 322-6425292

Email: wmoens@sbb.ihe.be

WWW: <http://biosafety.ihe.be>



boues activées était agitée par un pont mécanique tournant injectant de l'air, un échantillon d'environ 150 ml a donc été prélevé à une profondeur d'environ 10 à 20 cm dans la liqueur à trois endroits distincts du bassin d'aération. Les échantillons ont été stockés à quatre degrés pendant le transport vers le laboratoire. Des paramètres tels que la température extérieure, la température dans la liqueur, le pH, la concentration en boues, la DBO et DCO en entrée et en sortie ont été relevés sur place et enregistrés, lorsque disponibles. Ces échantillons ont ensuite été mélangés dans des proportions de volume égal (3 x 100ml) au laboratoire et dix aliquotes prélevées pour l'extraction directe des acides nucléiques.

L'ADN purifié à partir des dix parties aliquotes a été ensuite regroupé, pour être le plus représentatif possible de l'ensemble des micro-organismes présents dans la boue activée.

### 3.4. Amplifications des séquences recherchées

Cet ADN a été ensuite dilué et utilisé pour la recherche des déterminants A, B, C, D et E par PCR (35 cycles).

Les ADN provenant des différentes stations d'épuration ont été criblés à différentes concentrations d'ADN pour la présence des cinq déterminants de résistance à la tétracycline (TetA à TetE) (Figure 5 et Tableau 4). Un contrôle positif sur les différents ADN extraits a été réalisé avec des primers universels pour les Eubactéries (Forward: AGTTTGATCCTGGCTCAG ; Reverse: TACCTTGTTACGACTTACCC). Les résultats montrent que les quatre échantillons (S1-S4) sont positifs uniquement pour les déterminants A et C. Un signal est également présent pour la présence de rDNA provenant d'Eubactéries. Les produits PCR ont été également transférés par la technique de Southern blotting sur une membrane de nylon et les hybridations n'ont pas été réalisées suite à l'arrêt du programme.

Ces résultats ont été également comparés à ceux obtenus sur 14 souches de *Samonella Hadar* résistantes à la tétracycline. Ces souches ont été isolées à partir de selles dans différents laboratoires cliniques belges en 1996 et 1997. L'ADN total (génomique et plasmidique) a été extrait de chaque souche selon la méthode décrite par Chen and Kuo (1993) (Figure 6). Les amplifications génétiques à partir de chaque ADN ont donné un produit PCR de taille attendue pour les déterminants A et C (une souche positive), mais étaient négatives pour les déterminants B, D et E dans les conditions expérimentales.

## 4. Conclusions de l'étude.

Il ressort de l'étude que les déterminants des classes A et C sont prédominants à la fois dans les échantillons environnementaux prélevés en station d'épuration, ainsi que dans les isolats cliniques étudiés. Une étude épidémiologique étendue à d'autres stations d'épuration (ou d'autres environnements) et d'autres types bactériens isolés dans les hôpitaux ou les laboratoires de diagnostic microbiologique permettrait de confirmer la corrélation positive observée dans ce travail. D'autres études antérieures ont reporté une distribution différente dans les déterminants codant la résistance à la tétracycline. Il a été démontré que la classe E était prédominante dans les bactéries à Gram-négatif isolées à partir de sédiments marins Norvégiens et Danois (Andersen and Sandaa, 1994). La classe B était le déterminant prédominant (B: 73%; A: 21,7%; C: 8%) dans des bactéries coliformes isolées d'échantillons fécaux humains et animaux (Boston: 1978-1980) (Marshall *et al.*, 1983). TetB prédominait également dans des isolats de bactéries entériques à Gram-négatif récoltées à partir de cochons élevés aux Etats-Unis (Lee *et al.*, 1993). 82% de 18 isolats d'*Actinobacillus actinomycetemcomitans* résistants à la tétracycline provenant de maladies périodontales de patients de Seattle hybridaient avec la sonde du déterminant TetB (Roe *et al.*, 1995). Par contre, la classe A prédominait parmi des bactéries résistantes à la tétracycline isolées à partir de poissons provenant du sud-est des Etats-Unis (DePaola *et al.*, 1993).

Ces résultats suggèrent donc que des réservoirs spécifiques pour les déterminants d'efflux de tétracycline existent dans la nature, avec des distributions différentes en fonction du lieu et de la source du prélèvement.

## Recommandations

Comme nous l'avons déjà indiqué dans l'introduction, les pré-normes prEN 12685 et prEN 12686 fournissent à l'expérimentateur des listes de points ou de paramètres directeurs qu'il convient à prendre en considération afin de déterminer la validité d'une stratégie d'échantillonnage ou de surveillance. Pareillement, la pré-norme prEN 12687 fournit des critères qui permettent de trouver une méthode ou une combinaison de méthodes appropriées à l'analyse de la modification génomique, en fonction de l'objectif de l'analyse. C'est donc aux expérimentateurs, en fonction du but poursuivi, de passer en revue ces paramètres et de décider de leur pertinence avant de les intégrer dans leurs protocoles expérimentaux.

Les protocoles techniques seront quant à eux à rechercher dans la littérature scientifique ou dans des livres ou éditions de revue fournissant les méthodes les plus couramment utilisées en biologie moléculaire ou en microbiologie moléculaire, comme par exemple:

- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. 1990. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc.
- B. A. White. 1993. *Methods in Molecular Biology: PCR protocols*. Humana Press Inc.
- A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas and F. J. De Bruin. 1996. *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers.

La constante évolution de la technologie dans le domaine des techniques de biologie moléculaire entrainerait également que des normes trop techniques, une fois implémentées, deviendraient vite obsolète. C'est probablement d'ailleurs pour cette raison que leurs auteurs se sont bornés à décrire des principes plutôt que des techniques ou des protocoles.

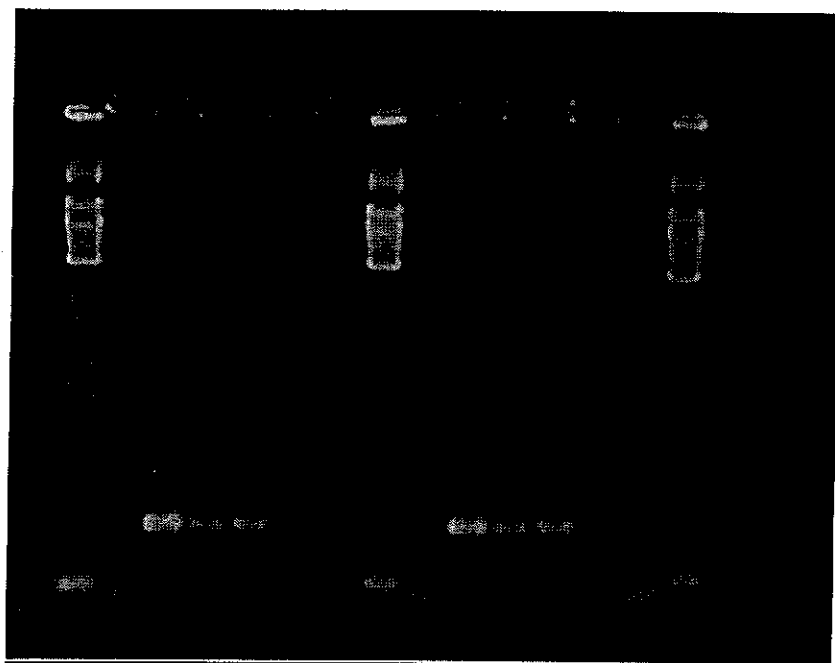


Figure 5: Electrophorèse en gel d'agarose 1.5% des produits PCR résultant d'une amplification de l'ADN purifié avec les amorces TetA (FW4-RV1) et TetC (FW3-RV1). Le DNA provient des boues activées du 1er prélèvement de la station d'épuration de l'hôpital Erasme (S1).

		Concentration de l'ADN total
Puit 1	123 bp ladder	
Puit 2	control négatif	
Puit 3	RPI	0.06 ng
Puit 4	DNA extrait des boues activées	160 ng
Puit 5	DNA extrait des boues activées	16 ng
Puit 6	DNA extrait des boues activées	1.6 ng
Puit 7	DNA extrait des boues activées	0.16 ng
Puit 8	123 bp ladder	
Puit 9	control négatif	
Puit 10	pBR322	0.04 ng
Puit 11	DNA extrait des boues activées	160 ng
Puit 12	DNA extrait des boues activées	16 ng
Puit 13	DNA extrait des boues activées	1.6 ng
Puit 14	DNA extrait des boues activées	0.16 ng
Puit 15	123 bp ladder	

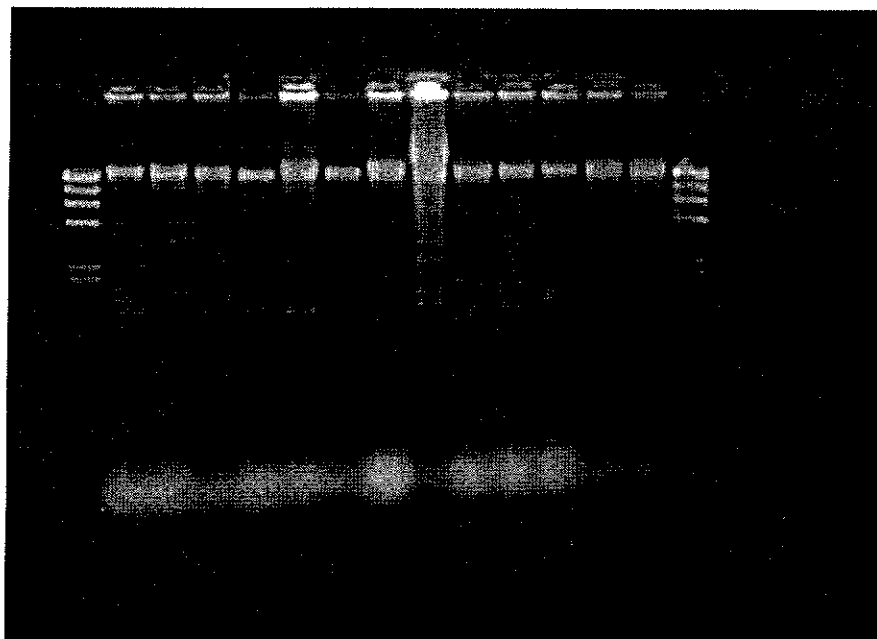


Figure 6: Electrophorèse en gel d'agarose 1.0% de l'ADN total non digéré extrait de différentes *Salmonella enterica* (serotype Hadar) Tet<sup>R</sup> isolées à partir de fèces d'origine humaine. S: résistance à la streptomycine; T: résistance à la tétracycline; A: résistance à l'ampicilline; Nal: résistance à l'acide nalidixique.

	AND total	Antibiogramme	Origine
Puit 1	$\lambda$ HindIII		
Puit 2	<i>S. Hadar</i> 97 A1225/1	S T A Nal	Geel
Puit 3	<i>S. Hadar</i> 96 BR1148	S T A	Bruxelles

rue J. Wytsman, 14 B-1050 Bruxelles

Tel: 322-6425293

Fax: 322-6425292 Email: wmoens@sbb.ihe.be WWW: <http://biosafety.ihe.be>

Puit 4	<i>S. Hadar</i> 97 HN1370/2	ST A Nal	Dinant
Puit 5	<i>S. Hadar</i> 96 VL963/5	ST A Nal	Kortrijk
Puit 6	<i>S. Hadar</i> 97 VL1088/3	ST Nal	Kortrijk
Puit 7	<i>S. Hadar</i> 97 LG1388	ST Nal	Verviers
Puit 8	<i>S. Hadar</i> 96 LV526/1	ST	Leuven
Puit 9	<i>S. Hadar</i> 96 HN636	ST A Nal	Namur
Puit 10	<i>S. Hadar</i> 97 VL1234/1	ST Nal	Odenaarde
Puit 11	<i>S. Hadar</i> 96 LG792	ST Nal	Liège
Puit 12	<i>S. Hadar</i> 97 A1356/1	ST A	Antwerpen
Puit 13	<i>S. Hadar</i> 96 A5444	ST A Nal	Boom
Puit 14	<i>S. Hadar</i> 97 BR1089/11	ST	Bruxelles
Puit 15	$\lambda$ HindIII		

Template	Source	Determinant Primers Class	TetA FW4-RV1	TetA FW4-RV2	TetB FW3-RV1	TetB FW3-RV2	TetC FW3-RV1	TetC FW2-RV1	TetD FW4-RV1	TetD FW2-RV1	TetE FW3-RV2	TetE FW2-RV2
RPI	<i>P. aeruginosa</i>	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tn1741	<i>E. coli</i>	A	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
pRT11 (Tn10)	<i>E. coli</i>	B	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
pBR322	<i>E. coli</i>	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
pSL106 (RA1)	<i>Aeromonas</i>	D	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
pUC119::tetD	<i>P. piscida</i>	D	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
pPI173	<i>S. ordonez</i>	D	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
pSL1504	<i>E. coli</i>	E	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
pUC119::tetG	<i>V. anguillarum</i>	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pVM111	<i>P. multocida</i>	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 3: Primer specificity. Primers were designed by means of GeneWorks® (Release 2.5) and Oligo5 on the basis of published sequences and sequence alignment (Figure 1). PCR signal of expected size: + strong; - none, NT not tested.

	TetA	TetB	TetC	TetD	TetE	Primers for Eubacteria
Activated sludge (Hospital treatment plant) sample 1	+	-	+	-	-	+
Activated sludge (Hospital treatment plant) sample 2	+	-	+	-	-	+
Activated sludge (Urban treatment plant: Wavre)	+	-	+	-	-	+
Activated sludge (Urban treatment plant: Lasne)	+	-	+	-	-	+

Table 4: Screening of direct DNA extracts from environmental samples with the different primer pairs. PCR signal of expected size: + strong; (+) weak; - none.

## **Protocoles**

### **DNA extraction and purification**

#### **a) Extraction**

The direct DNA extraction protocol used in the present study was adopted from methods described by Van Vaerenbergh *et al.* (1995) and Haynes *et al.* (1995). Aliquots (0.2 ml) of the liquor of the activated sludge were mixed with 0.6 ml of lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 50 mM, SDS 3%) in a 2 ml screw-capped polypropylene microtube (Biospec) containing conditioned glass beads (half a tube; 0.1 mm diameter), and 0.6 ml of Tris-HCl saturated phenol-chloroform-isoamyl alcohol (50:49:1) was added. The tubes were shaken for 2 min at high speed on a Mini-Beadbeater (Biospec Products, Stratech Scientific, Luton, UK) to lyse the more resistant cell structures and incubated for 30 min at 65°C. After centrifugation for 15 min at 14,000 rpm in a microfuge, the supernatant was transferred to a sterile microtube. The nucleic acids were ethanol-precipitated in presence of potassium acetate 0.3 M for 1 hour at -80°C and pelleted at 14,000 rpm for 15 min at 4°C. The pellet was washed with cold 70% ethanol, dried under vacuum and dissolved in 500 µl autoclaved MilliQ water.

Glass beads (Biospec) of 0.1 mm diameter were incubated overnight in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, washed with MilliQ water, boiled in KHCO<sub>3</sub> 5%, washed with autoclaved MilliQ water, and desiccated at 80°C under vacuum.

#### **b) Purification**

The DNA solutions were purified by centrifugation (5,000 rpm, 5 min) through a spin column filled with about conditioned polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). PVPP was dispensed in a Mobicol column (MoBiTec, Göttingen, Germany) washed with 0.1 M HCl, rinsed with distilled water and autoclaved, and enclosed by two filters (pore size: 35 µm). The purified extracts (clear and colorless) were ethanol-precipitated in presence of potassium acetate 0.3 M for 1 hour at -80°C and pelleted at 14,000 rpm for 15 min at 4°C. The pellet was washed with cold 70% ethanol, dried under vacuum and dissolved in 50 µl TE buffer pH 8.0. The DNA concentration of the purified extracts, representing total community DNA, was determined spectrophotometrically at A<sub>260</sub>. The DNA was then stored at -20°C until used.

To condition PVPP, fines were removed by repeated washes of 100 g in 1 l of distilled water until the upper phase was clear. The PVPP was then placed in a glass column and washed with 0.1 M NaOH until the effluent had a pH of 4-6. Neutrality was restored by washing with 20 mM phosphate buffer pH 7.5 and the conditioned PVPP was stored in the same buffer at room temperature until used.

### **High stringency PCR**

#### **a) DNA extracted from cell cultures**

DNA amplification was performed in a Perkin-Elmer Cetus Thermal Cycler 9600. The amplification reaction mixture contained the amplification buffer (Tris-HCl pH 8.3, 50 mM; KCl 50 mM; 0.1 mg.ml<sup>-1</sup> bovine serum albumin (Sigma Cohn fraction V); MgCl<sub>2</sub> 3 mM; 200 µM of each dNTP (Pharmacia Biotech); 20 pmoles of each amplimer, 1 unit of *Taq* polymerase (Perkin-Elmer)), 20 ng of the template DNA, autoclaved MilliQ water up to 50 µl final volume. After denaturation at 94°C for 1 min, the samples were submitted to 30 cycles of - denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min - and by an additional extension step of 10 min at 72°C.

#### **b) DNA extracted from environmental samples**

DNA amplification was performed in a Perkin-Elmer Cetus Thermal Cycler 9600. The amplification reaction mixture contained the amplification buffer (Tris-HCl pH 8.3, 50 mM; KCl 50 mM; 0.1 mg.ml<sup>-1</sup> bovine serum albumin (Sigma Cohn fraction V); MgCl<sub>2</sub> 3 mM; 200 µM of each dNTP (Pharmacia Biotech); 20 pmoles of each amplimer, 2 units of *Taq* polymerase (Perkin-Elmer)), 100 ng of the template DNA, autoclaved MilliQ water up to 50 µl final volume. After denaturation at 94°C for 1 min, the samples were submitted to 35 cycles of - denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min - and by an additional extension step of 10 min at 72°C.

**Liste de références**

- Andersen, S.R, and R.A. Sandaa. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among Gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine-sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:908-912.
- Bertelet, M., L.G. Whyte, and C.W. Greer. 1996. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. *FEMS Microbiol. Lett.* 138:17-22.
- Chen, W.-P, and T.-T Kuo. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acid Res.* 21:2260.
- DePaola, A., W.E. Hill, and F.M. Harrel. 1993. Oligonucleotide probe determination of tetracycline-resistant bacteria isolated from catfish ponds. *Mol. Cell. Probes* 7:345-348
- Haynes, K. A., T. J. Westerneng, J. W. Fell, and W. Moens. 1995. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of the large subunit ribosomal DNA. *J. Med. Vet. Mycol.* 33:319-325.
- Lee, C.Y., B.E. Langlois, and K.A. Dawson. 1993. Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1467-1472.
- Marshall, B., C. Tachibana, and S.B. Levy. 1983. Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose fermenting coliforms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24:835-840
- Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1996. Proton-depenent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60:575-608.
- Roberts, M.C. 1994. Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. *Trends in Microbiol.* 2:353-357.
- Roberts, M. C. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* 19:1-24.
- Roberts, M. C. 1997. Genetic mobility and distribution of tetracycline resistance determinants. *Ciba Found. Symp.* 207:206-218.
- Roe, D.E., P.H. Braham, A. Weinberg, and M.C. Roberts. 1995. Characterization of tetracycline resistance in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 10:227-232
- Van Vaerenbergh, B. Grootaert, and W. Moens. 1995. Validation of a method for the preparation of fungal genomic DNA for the polymerase chain reaction (PCR) and random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *J. Mycol. Méd.* 5:133:139.

**Liste des publications découlant des recherches**

- Collard, J. M., D. Verbrugge, B. Bartholdy, M. L. Chasseur-Libotte, and W. Moens. 1997. Rapid detection and typing of tetracycline resistance determinants in clinical isolates, activated sludges and other environmental samples by PCR. 11th Forum for Applied Biotechnology. Ed. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 62/4b, pp 1857-1858.

**Liste des posters découlant des recherches**

“Detection and typing of tetracycline resistance determinants (Classes A-E) in clinical isolates and environmental samples by PCR. COLLARD J.-M., D. VERBRUGGE, M.-L. CHASSEUR-LIBOTTE and W. MOENS. MAREP International Conference on Marker/Reporter Genes in Microbial Ecology. Stockholm, Sweden, 14-17 juin 1997.

“Rapid detection and typing of tetracycline resistance determinants in clinical isolates, activated sludges and other environmental samples by PCR.” COLLARD J.M., D. VERBRUGGE, B. BARTHOLDY, M.L. CHASSEUR-LIBOTTE and W. MOENS. 11th Forum for Applied Biotechnology. Gent, 25-26 septembre 1997.

“Detection and typing of phylogenetically-related efflux determinants encoding tetracycline resistance in clinical isolates and environmental samples by PCR. COLLARD J.-M., D. VERBRUGGE, M.-L. CHASSEUR-LIBOTTE and W. MOENS. 1st Symposium of the Belgian Society for Microbiology. Leuven, 17 octobre 1997.

\*\*\*\*\*



Modèle : DNA/RNA rares

## 1. Introduction.

Dans le cadre de nos travaux de recherche sur la biosécurité et la qualité des vecteurs viraux de thérapie génique humaine, nous avons évalué l'applicabilité et la pertinence des pré-normes issues du Working Group 3 du Technical Committee (TC) 233 du CEN relatives aux procédures de caractérisation des organismes génétiquement modifiés (pré-normes: 12682, 12683, 12687), ainsi que le draft standard WI 81 qui traite de l'échantillonnage et de l'inoculation d'organismes génétiquement modifiés. Nous avons également revu la pré-norme 12689 qui traite de l'évaluation de la pureté des produits à base de micro-organismes. Bien que, en Belgique et pour l'instant, les vecteurs de thérapie génique sont utilisés en espace confiné (directive Européenne 90/219), et que de surcroît ces vecteurs destinés à une thérapie humaine sont couverts par les règles « GMP » de l'industrie pharmaceutique et doivent répondre aux critères de l'inspection de la pharmacie, nous avons également apprécié les pré-normes portant la stratégie d'échantillonnage et de surveillance d'organisme modifié disséminé dans l'environnement (pré-norme 12684 et 12688).

### 1.1. Importance de l'étude dans le cadre du projet.

Les pré-normes CEN concernant l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés sont répertoriées dans le tableau n°1. Nous avons caractérisé ces pré-normes en fonction des champs d'application suivants: dissémination volontaire, applicabilité en santé humaine, et inclusion des virus comme micro-organismes.

**Tableau n°1:** pré-norme du CEN impliquée dans la dissémination volontaire d'organisme génétiquement modifié.

n°WI	n° prEN	dissémination volontaire	application en santé humaine	virus compris
64/56	12687	-	-	oui
58/57	12682	-	-	oui
59	12683	-	-	oui
63/60	12686	oui	non	non
60	12984	oui	non	oui
61/65	12685	oui	non	non
65	12688	oui	non	oui
66	12689	-	non	oui
81		-	-	oui

Étant donné que le champ d'application des pré-normes 12685 et 12686 ne couvrait pas l'utilisation des virus, nous avons donc tenu compte des normes suivantes:

**prEN 12682 (WI 58/57):** Biotechnologie - Organismes modifiés disséminés dans l'environnement - Guide pour la caractérisation de l'organisme génétiquement modifié par l'analyse de l'expression fonctionnelle de la modification génomique (Décembre 1996).

**prEN 12683 (WI 59):** Biotechnologie - Organismes modifiés disséminés dans l'environnement - Guide pour la caractérisation de l'organisme génétiquement modifié par l'analyse de la stabilité de la modification génomique (Décembre 1996).

**prEN 12684 (WI 60):** Biotechnologie - Organismes modifiés disséminés dans l'environnement - Guide des stratégies d'échantillonnage pour la dissémination volontaire de virus génétiquement modifiés (Décembre 1996).

**prEN 12687 (WI 64/56):** Biotechnologie - Organismes modifiés disséminés dans l'environnement - Guide pour la caractérisation de l'organisme génétiquement modifié par l'analyse de la modification génomique (Décembre 1996).

**prEN 12688 (WI 65):** Biotechnologie - Organismes modifiés disséminés dans l'environnement - Guide des stratégies de surveillance pour la dissémination volontaire de virus génétiquement modifiés (Décembre 1996).

**prEN 12689 (WI 66):** Biotechnologie - Organismes modifiés disséminés dans l'environnement - Guide pour l'évaluation de la pureté, l'activité biologique et la stabilité des produits à base de micro-organismes (Décembre 1996).

**WI 81:** Biotechnologie - Équipement - Guide pour les procédures d'échantillonnages et d'inoculation (Septembre 1996).

## **1.2. Interaction internationale.**

Pour ce qui est de la production virale, nous interagissons avec les firmes Transgène de Strasbourg et Q One Biotech de Glasgow pour ce qui concerne les adénovirus, avec le Deutsches Kerbforschungszentrum de Heidelberg pour ce qui concerne les adénovirus-associés, et avec le Laboratoire de Pathologie Moléculaire et de Thérapie Génique de l'Université de Bordeaux pour ce qui concerne les rétrovirus.

Nous interagissons également avec le Dana-Faber Cancer Institute de Boston pour la recherche des récepteurs des adénovirus, et avec l'American Home Product du New Jersey pour la recherche des récepteurs des rétrovirus.

## **1.3. Objectifs.**

Notre objectif expérimental, est la mise au point d'un modèle permettant d'évaluer le risque d'infection des lignées de cellules germinales par les vecteurs viraux de thérapie génique. Afin d'optimiser la validité de nos expérimentations, nous avons systématiquement contrôlé et validé chaque étape de notre démarche expérimentale.

## **Modèle expérimental.**

Nous produisons des vecteurs viraux exprimant la « Green Fluorescent Protein (GFP) » comme transgène. Ces vecteurs purifiés et titrés nous servent à infecter des primo culture de testicules de rat avec des multiplicités de particules infectieuses croissantes (MOI). Après infection nous déterminons par cytométrie de flux (FACS) le pourcentage et la nature des cellules exprimant la GFP. Cette technique une fois validée nous servira ensuite de référence ainsi que de norme pour reproduire cette expérimentation en modèle humain (primo culture ou organo culture).

## **Objectifs dans le cadre de la normalisation.**

Dans le cadre de la normalisation, en plus d'évaluer les pré-normes émises par le CEN, nous avons revu la littérature afin de déterminer la filiation virologique de tout les vecteurs viraux de thérapie génique et surtout, nous avons adopté certaines pratiques de travail et nous avons mis au point ou comparé une série de test nous permettant de déterminer la limite de signification de nos expérimentations.

## **2. Méthodologie dans le cadre de la normalisation.**

Les pratiques de travail particulières que nous avons adopté, concerne surtout la maintenance de culture cellulaire eucaryote: Ces cultures sont maintenue sans adjonction d'antibiotique dans le milieu et la contamination par mycoplasme est systématiquement évalué par la méthode de Hoechst à chaque décongélation d'ampoule.

Travaillant avec la GFP comme gène rapporteur, nous avons déterminé: les méthodes de fixation cellulaire n'altérant pas le signal GFP, ainsi que les limites de sensibilité de ce signal.

Ensuite nous avons comparé différentes méthodes de production, de purification et de titration virale.

Enfin nous avons comparé différentes techniques d'obtention de primo culture de testicules, tant en modèle de rongeur qu'en modèle humain.

### **2.1 Détection de la GFP.**

## **Conservation du signal GFP par FACS en fonction de la méthode de fixation cellulaire.**

Nous avons testé différentes méthodes de fixations cellulaires (acétone, méthanol, acétone méthanol, formaldéhyde, glutaraldéhyde, Triton) afin de déterminer les méthode de fixation n'altérant pas le signal GFP. Ces méthodes sont: la fixation au formaldéhyde, la fixation au glutaraldéhyde suivis d'un traitement au Triton.

### **Évaluation par FACS de la sensibilité du signal GFP par faux positif.**

Pour déterminer la sensibilité du signal GFP, nous avons pris différents type cellulaires n'exprimant pas la GFP, nous en avons mesuré la fluorescence spécifique de la GFP en inter essais et intra essais. Le signal est négatif en moyenne  $\pm$  SD pour  $97.3 \pm 3.0$  % des cellules en intra essais et de  $95.2 \pm 4.0$  % des cellules en inter essais.

### **Évaluation la limite de détection GFP par FACS.**

Pour déterminer la limite de détection du signal GFP nous avons contaminé une population de cellules n'exprimant pas la GFP à des concentrations diverses par les mêmes cellules exprimant constitutivement la GFP, la limite de détection est 1.5 %. Si le nombre de cellules exprimant la GFP est inférieur à 1.5 % du nombre de cellules totales, nous savons pas dire si il y a réellement un population de cellules exprimant la GFP.

### **Détection de la GFP sur coupe Histologique en fonction de la fixation cellulaire.**

Nous avons comparé les méthodes de préparation de coupes histologiques par cryostat ou par fixation à la paraffine, de tissus infecté par un virus génétiquement modifié exprimant la GFP. La méthode par cryostat ne nécessite pas nécessairement l'utilisation d'une amplification du signal GFP (par exemple par utilisation d'un anticorps anti-GFP). La méthode de fixation en paraffine est en cours d'évaluation.

## **2.2. Production virale**

### **Production d'adénovirus.**

En ce qui concerne l'adénovirus delta E1 et delta E3, exprimant la GFP. Le plasmide à été transfecté par la méthode de phosphate de calcium en cellules 293 T et 911, nous avons obtenu un pourcentage de transduction de l'ordre de 9 % en cellules 293 T et seulement de l'ordre du 0,2 % pour les cellules 911. Nous n'avons pas mis en évidence d'autre méthode de transfection (Lipofectin, TFX...) qui améliorerait de manière significative le rendement et le coefficient de variation de cette production.

### **Production d'adénovirus associé (AAV).**

En ce qui concerne la transfection d'un plasmide d'AAV, nous avons montré que l'utilisation du poly éthylène imine associé à un adénovirus défectif, pouvait augmenter l'efficacité de transfection d'un plasmide parvoviral.

## **2.3. Purification virale et titration**

### **Purification et titration d'adénovirus.**

Nous avons montré que le rendement ainsi que la contamination de protéine lors de la purification d'adénovirus recombinant ne nécessitait pas de précipitation au Poly Ethylène Glycol 8000 (PEG) et que l'utilisation de gradient de sucrose associé à un gradient de césium n'était pas nécessaire. Par contre nous avons montré que le type de centrifugeuse était important, les techniques de purification de l'adénovirus utilisant un volume de 15 ml ne sont pas directement transposable au centrifugeuse d'un volume utile de 3.7 ml, même après précipitation au PEG. Pour des raisons de faisabilité, nous envisageons de valider une méthode de purification de l'adénovirus par colonne de chromatographie de cellulose sulfate.

Pour la titration de l'adénovirus par bioessais et coloration au « Crystal Violet », nous avons montré que l'utilisation des cellules complémentantes 911 offrait un meilleur coefficient de variation pour la détermination du titre viral que les cellules 293 ou 293T.

## **Purification et titration d'adénovirus-associés.**

A l'heure actuelle nous ne sommes pas parvenu à transposer la méthode de purification de MVM par gradient discontinu sucrose et chlorure de césium aux adénovirus-associés. Par contre nous avons montré que certains facteurs physiques était déterminant sur le pouvoir de transduction de ce type de vecteur.

### **2.4. Réalisation de Primo culture de testicule.**

Nous avons comparé différentes méthode de réalisation de primo culture de testicules de rongeur et d'humain. Nous avons remarqué que le pourcentage de viabilité cellulaire était optimum lors d'une utilisation de la trypsine 0.25 % pendant 30 minutes suivi d'une action de la collagénase pendant 30 minutes. Le pourcentage de viabilité cellulaire était pour cette méthode de  $97 \pm 1$  %, alors qu'elle était de  $85 \pm 5$  % pour l'utilisation de la collagénase pendant 90 minutes et de  $50 \pm 15$  % lors de l'action de la trypsine pendant 4 heures.

### **2.5. Réalisation d'organo culture de testicule humain.**

Nous ne sommes pas parvenu à réaliser d'organo culture de testicules de rat ou de souris. Par contre nous avons montré que les techniques d'organo culture de cerveau était transposable aux testicules Humain. Ce qui nous reste à mettre au point c'est de pouvoir réaliser stérilement des coupes suffisamment fines pour pouvoir distinguer les différentes morphologies cellulaires. Pour ce qui de la validation de la méthode, nous avons réalisé une digestion combinée trypsine et collagénase de ces organo cultures que nous passons ensuite par FACS, si la méthode est valide nous devons alors retrouver le même pattern obtenus par FACS à partir de primo culture.

### **2.6. Réalisation d'injection intra testiculaire de vecteurs viraux exprimant la GFP sur le rat.**

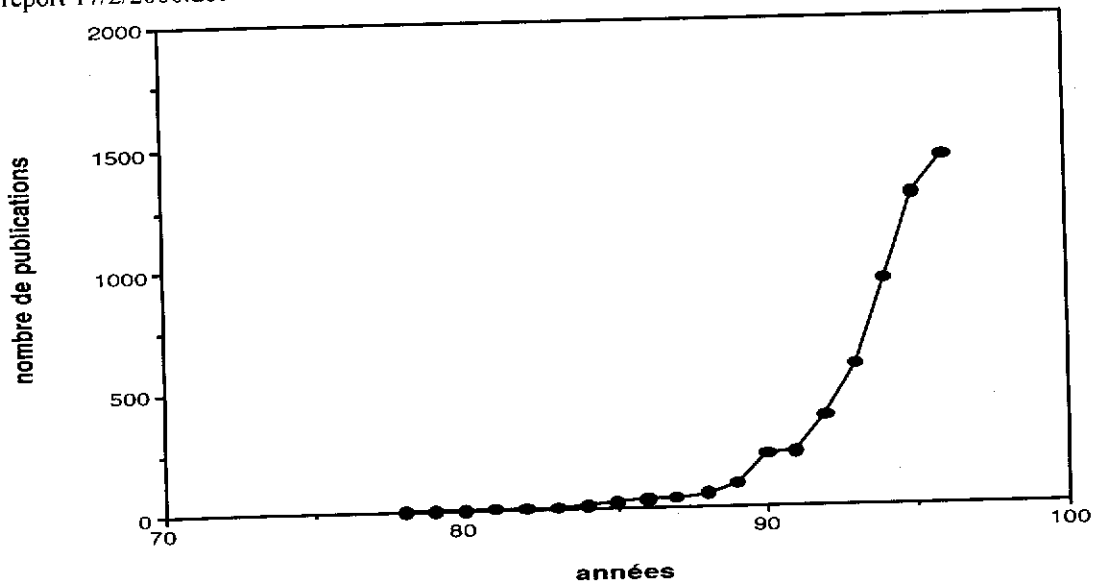
Sur rat anesthésié nous avons réalisé (en collaboration du Dr. L Tenenbaum: IRIBHN) des injection intra cérébrale d'un vecteur AAV exprimant la GFP (vecteurs connus pour infecter les cellules neuronales) ainsi qu'une injection intra testiculaire du même vecteurs et du même lot en intra testiculaire. Les résultats sont encore en cours d'évaluation.

## **3. Résultats**

### **3.1 Filiation virologique des vecteurs de thérapie génique.**

Comme décrit dans le rapport d'activité contrat NO/50/012 échéance 30 mars 1997, nous avons décrit la filiation virologique de tous les vecteurs utilisés en thérapie génique. Depuis 1979, le nombre de travaux de recherche concernant la thérapie génique est en progression exponentielle (Figure 1).

**Figure 1:** évolution du nombre de publications scientifiques concernant la thérapie génique par années.



L'utilisation de vecteurs viraux représentent 46 % de l'ensemble des publications scientifiques de thérapie génique répertoriées par la banque bibliographique Medline. Nous avons d'abord revu la littérature pour déterminer la filiation virologique des vecteurs viraux utilisés ou susceptible d'être utilisés en thérapie génique humaine (voir Tableau n°2)

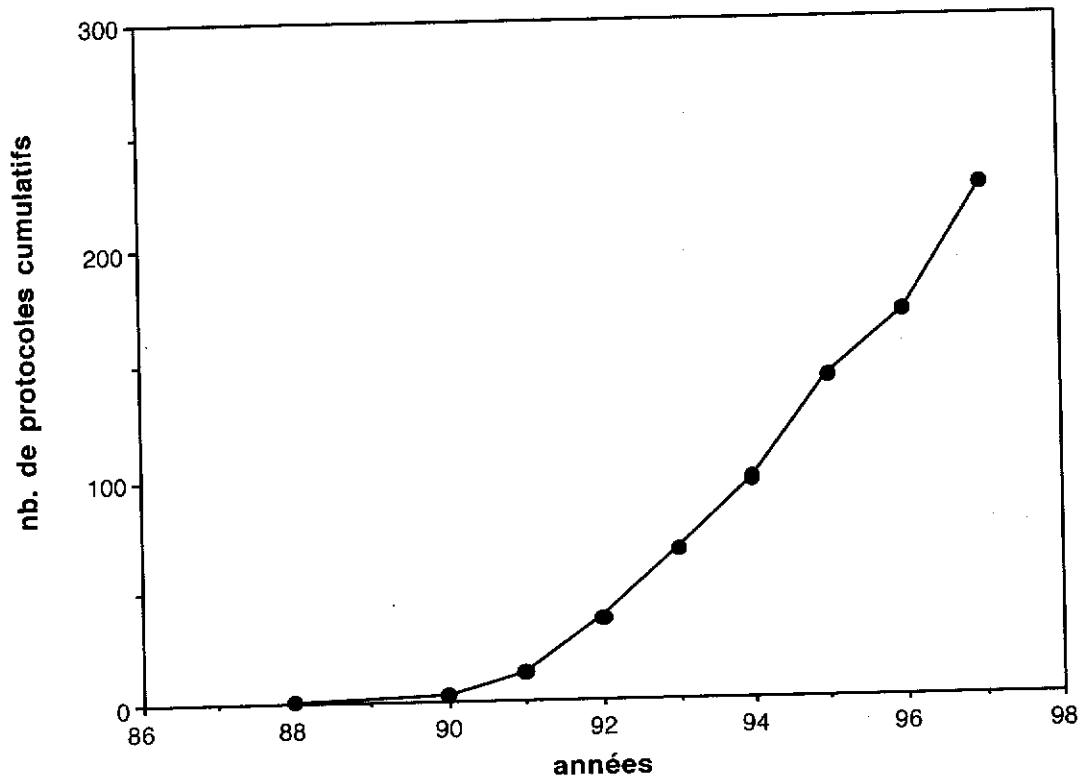
**Tableau 2:** espèce virale susceptible d'être utilisée ou utilisée en thérapie génique humaine et nombres de publications associés (nb), classé en fonction du genre et des caractéristiques génomiques (l'astérisque mentionne le caractère intégratif de ces vecteurs).

Caractéristique génomique	Famille	nb.	genre	espèce
DNA, RNA transcriptase reverse	<b>Retroviridae*</b>	1485	Mammalian type C retrovirus	Reticuloendotheliosis virus Murine leukemia virus Gibbon ape leukemia virus Harvey murine sarcoma virus
	<b>Hepadnaviridae</b>	26	Spumavirus Lentivirus Orthohepadnavirus	Simian foamy virus HIV-1 Hepatitis virus B
DNA double brin	<b>Poxviridae</b>	25	Othopoxvirus Suipoxvirus Avipoxvirus	Vaccinia virus Swinpoxvirus Canary poxvirus Fowlpox virus
	<b>Adenoviridae</b>	643	Mastadenovirus	Human adenovirus 2 Human adenovirus 5
	<b>Herpesviridae</b>	53	Simplex virus Lymphocryptovirus Cytomegalovirus	Herpes simplex type1 Epstein barr virus Human cytomegamlovirus
	<b>Papovaviridae</b>	45	Polyomavirus	Simian Virus 40 BK virus
	<b>Baculoviridae</b>	9	Papilloma virus	Bovine Papilloma virus
DNA simple brin	<b>Parvoviridae</b>	120	Dependovirus* Parvovirus	Adeno-associated virus 2 Minute mice virus H1

			Erythrovirus	Lu III B19
ARN simple brin négatif	<b>Rhabdoviridae</b>	25	Vesiculovirus	Vesivular stomatitis virus
	<b>Paramyxoviridae</b>	6	Lyssavirus Paramyxovirus	Rabies virus Human parainfluenza virus
ARN simple brin positif	<b>Togaviridae</b>	7	arbovirus groupe A	Semliki Forest Virus
				Sindbis virus

Nous avons ensuite déterminé la filiation virologique des vecteurs de thérapie génique humaine des protocoles d'essai clinique. Depuis le premier essai de thérapie génique en 1989, 329 protocoles de thérapie génique sont enregistré dans le monde, ce qui correspondrait à 2557 patients susceptible d'être traités. Au 12-5 1998, 244 protocoles de thérapie génique on été enregistrée auprès du National Institute of Health (NIH). La figure 2, montre la croissance cumulative du nombre de protocole de thérapie génique enregistré auprès du NIH en fonction du temps.

**Figure 2.** Étude du nombre cumulatifs de protocole humain de thérapie génique enregistré auprès du NIH en fonction du temps.



En clinique humaine les vecteurs viraux sont utilisés dans 71 % des protocoles mondiaux et dans 79 % des protocoles acceptés auprès du NIH. Le tableau 3 montre le nombre de protocole enregistré auprès du NIH en fonction de l'espèce virale dont dérive le vecteur de thérapie génique.

**Tableau 3:** Nombre (nb) de protocoles enregistrés auprès du NIH en fonction de l'espèce virale d'où découle les vecteurs viraux de thérapie génique.

Famille	genre	espèce	nb de protocole
<b>Retroviridae</b>	Mammalian type C retrovirus	murine leukemia virus	119
<b>Poxviridae</b>	Othopoxvirus	Vaccinia virus	6
	Avipoxvirus	Canary pox virus	7
		Fowlpox virus	2
<b>Adenoviridae</b>	Mastadenovirus	Human adenovirus 2	4
		Human adenovirus 5	45
<b>Herpes Viridae</b>	simplex virus	Herpes simplex 1	1
<b>Parvoviridae</b>	Dependovirus	Adeno-associated virus 2	5

- En Belgique les vecteurs viraux utilisés en thérapie génique humaine sont :
1. Un rétrovirus exprimant le gène suicide de la Thimidine kinase
  2. Un adénovirus exprimant le gène P53
  3. Un virus de la vaccine exprimant un épitope du gène mage