

## ***Le spermatozoïde transgénique : une piste de recherche féconde ?***

La possibilité de manipuler les gènes par transgénèse, en particulier chez les mammifères, constitue sans nul doute une des avancées les plus marquantes de ces dernières décennies dans le domaine de la biologie et de la médecine. En effet, la transgénèse a ouvert de façon spectaculaire la voie de l'étude *in vivo* de la fonction et de la régulation des gènes, et de l'étude des mécanismes intervenant dans les processus de développements normaux et pathologiques (*m/s* 1986, n° 5, p. 253 et 1992, n° 3, p. 268). De plus, par la production de modèles animaux présentant des maladies de même phénotype que certaines maladies humaines, cette approche a d'ores et déjà permis de progresser de façon considérable dans la compréhension de certaines maladies et conduira, à terme, à la mise au point de nouvelles thérapeutiques. Elle devrait aussi permettre la production de tissus et d'organes « humanisés » et le développement de xénogreffes. La transgénèse est également un outil capital pour le développement d'animaux à valeur ajoutée avec la production de protéines à visée pharmaceutique ou agro-alimentaire (*m/s* 1999, n° 8/9, p. 1058 et 1999, n° 12, p. 1476). Les premières approches de transgénèse classique font appel à la micro-injection d'ADN recombinant linéaire dans le pronucléus mâle d'œufs fertilisés [1] qui sont ensuite réintroduits dans l'oviducte de femelles pseudogestantes. Aujourd'hui, plusieurs alternatives existent, notamment la recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires multipotentes et l'utilisation de rétrovirus comme vecteurs du transgène. Cependant, si ces techniques ont connu des développements majeurs chez la souris, leur extrapolation aux animaux domestiques tels que les bovins, par exemple, se heurte encore à de très nombreux obstacles [2]. Par consé-

quent, la nécessité de diversifier les approches de transgénèse se fait toujours ressentir. C'est dans ce contexte que sont nées les techniques récentes de clonage chez les souris, les ovins, les caprins et les bovins, et que plusieurs équipes de recherche internationales intensifient les travaux visant à utiliser le spermatozoïde comme vecteur de transgénèse.

Les premières indications qu'un ADN exogène pouvait être introduit dans un spermatozoïde ont été obtenues par Brackett *et al.* [3] qui ont montré que l'incorporation d'ADN dans la tête de spermatozoïdes de lapin incubés avec de l'ADN marqué à la thymidine tritiée était possible. C'est près de vingt ans plus tard que ce domaine de recherche devait, pour un temps, devenir une nouvelle spécialité italienne avec les travaux de F. Arezzo et ceux du groupe de C. Spadafora (Université La Sapienza, Rome, Italie). Ainsi, le premier auteur montrait que de l'ADN homologue ou hétérologue pouvait pénétrer dans les spermatozoïdes d'oursin et que le transgène était transmis et exprimé dans l'embryon de la même espèce [4]. La même année, Spadafora *et al.* [5] publiaient un article dont l'impact devait être considérable et dans lequel ils prétendaient mettre en évidence, après incubation, l'incorporation d'ADN hétérologue dans des spermatozoïdes épидидymaires de souris et obtenir ainsi 30 % de descendance transgénique. Cependant, ces travaux devaient être rapidement et très vivement contestés, notamment par le groupe de Palmiter [6] qui, tentant de reproduire l'expérience, ne put obtenir aucune souris transgénique sur 1300 analysées. Le grand scepticisme qui s'ensuivit quant à l'intérêt de cette approche ne devait cependant pas décourager tous les chercheurs puisque Camaioni *et al.* [7] montraient, chez le sanglier et le taureau,

que 39 % à 78 % des spermatozoïdes étaient marqués au niveau du segment équatorial et de la région post-acrosomique, après leur incubation avec de l'ADN plasmidique tritié. De même, le groupe de Lavitrano (Université La Sapienza, Rome, Italie) devait à nouveau se manifester par la publication d'expériences réalisées dans leur laboratoire et celui de A.A. Kiessling à Boston (MA, USA), faisant état de l'incorporation d'ADN au niveau de la tête des spermatozoïdes de souris [8]. D'après ces dernières tentatives, alors que le taux d'incorporation d'ADN par les spermatozoïdes de souris était uniforme (90 %), le nombre d'animaux transgéniques obtenus par rapport au nombre total de foetus pouvait varier de 0 % à 100 %, selon les expériences, avec une moyenne de 7,4 %. D'après ces mêmes auteurs, cette disparité pouvait résulter de l'existence de facteurs spécifiques d'origine encore inconnue. Toutefois, de façon surprenante dans cette expérience, la descendance des souris ne devait pas être testée. Antérieurement, la même équipe de recherche avait mis en évidence une protéine spermatique de 30-35 kDa, conservée chez de nombreux vertébrés et susceptible de se lier spécifiquement à l'ADN [9].

Au cours de leurs différentes études, Lavitrano *et al.* [10] ont proposé que les grands fragments d'ADN (~7kb) étaient plus facilement incorporés dans la tête des spermatozoïdes que ceux compris entre 150 et 750 pb, en raison probablement de l'existence d'un phénomène d'internalisation actif. Enfin, plus récemment, les résultats obtenus chez la souris par Zoraqi et Spadafora [11] indiquaient que l'ADN plasmidique incorporé dans le spermatozoïde était intégré au niveau du génome à un site identique dans deux « clones » testés. Ces auteurs suggéraient que la topo-iso-

mérase II pouvait jouer un rôle dans le processus de recombinaison non homologue, puisqu'une séquence consensus de cette enzyme était adjacente au site d'intégration.

Bien que très controversés, les travaux du groupe de C. Spadafora ont été à l'origine de nombreuses études portant sur différentes espèces. Ainsi, Chourrout et Perrot [12] ont essayé d'adapter l'idée d'incubation de spermatozoïdes avec diverses constructions d'ADN chez la truite arc-en-ciel, mais en vain, puisque aucun poisson transgénique n'a pu être produit. En revanche, chez le porc, Lauria et Gandolfi [13] ont semble-t-il obtenu environ 12 % d'animaux transgéniques par cette méthode. Cependant, le type de transmission du transgène semblait être de type « mosaïque » puisque aucun porc de la première génération ne l'exprimait.

En 1996, Kroll et Amaya [14] devaient développer une nouvelle approche de transgénèse chez le xénope en incubant les noyaux des spermatozoïdes avec un plasmide linéarisé, en présence d'une enzyme de restriction permettant la décondensation de l'ADN génomique du spermatozoïde (méthode REMI pour *restriction enzyme-mediated integration*) [15, 16]. Après transfert des noyaux « transgéniques » dans des œufs non fertilisés par *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI), ces auteurs ont pu obtenir 36 % de xénopes transgéniques contre 19 % sans la méthode REMI. L'existence d'un mécanisme naturel de protection des spermatozoïdes contre la pénétration accidentelle d'ADN exogène a même été postulée [13].

Une autre stratégie révolutionnaire, contournant le problème des difficultés ou des incertitudes de la transfection directe dans le spermatozoïde, a été récemment développée par l'équipe de R.L. Brinster à Philadelphie (PN, USA). Après micro-injection d'une préparation de cellules testiculaires (fraîchement isolées ou après congélation) de souris donneuses dans les tubules séminifères d'une souris hôte stérile, ces auteurs ont pu mettre en évidence la reprise d'une spermatogenèse normale chez environ 18 % à 36 % des souris micro-injectées [17-19]. Bien que beaucoup plus lourde à développer que les tech-

niques précédemment décrites, cette approche ouvre la voie à la transfection *in vitro* des cellules germinales de la souris donneuse avant de les réinjecter dans une souris receveuse. Elle permet aussi d'envisager la restauration de fertilité chez des individus stériles, voire d'inaugurer des tentatives de thérapie génique germinale. Ce même groupe a, par ailleurs, montré qu'il était possible d'obtenir la production de spermatozoïdes de rat et de hamster chez la souris [20, 21]. Ces résultats étonnants permettent aussi d'imaginer le recours à cette technique comme moyen pour fabriquer des gamètes d'espèces en voie de disparition ou à très haute valeur économique ou encore, comme le voudraient certains, pour fabriquer des spermatozoïdes humains dans une souris ou un rat mâle [22] !

A court terme, il apparaît néanmoins que la méthode utilisant l'incorporation d'ADN dans la tête du spermatozoïde, si, bien sûr, elle s'avérait reproductible, soit la plus simple et la plus rapide à appliquer pour fabriquer des mammifères transgéniques. Puisque la pénétration de l'ADN exogène dans la tête du spermatozoïde semble être le point critique dans cette approche, quelques équipes se sont récemment intéressées au développement d'approches originales de transfert du transgène à travers la membrane plasmique, s'inspirant de celles développées dans le domaine de la thérapie génique. Ainsi, Tsai *et al.* [23] ont utilisé l'électrotransfert d'ADN exogène dans les spermatozoïdes du mollusque *Haliotis divorsicolor supportexta* (ormeaux) : le transgène était intégré au niveau du génome puisque 65 % de la descendance était transgénique. De plus, ils ont montré que l'électroporation, dans leurs conditions expérimentales, n'affectait pas le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. D'autres auteurs tels que Muller *et al.* [24] ont appliqué une méthode semblable sur les poissons, notamment la carpe commune (*Cyprinus carpio L.*), le poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*) et le tilapia (*Oreochromis niloticus*) et ont ainsi pu montrer que 3 % à 4 % des larves obtenues après fécondation des œufs par les spermatozoïdes ayant incorporé l'ADN exogène pos-

sédaient le transgène. L'électroporation a également été tentée par Horan *et al.* [25] chez de gros mammifères, notamment le porc, espèce chez laquelle 75 % des spermatozoïdes incorporent l'ADN exogène au niveau de la région post-acrosomique. Cependant, ces résultats obtenus chez le porc restent peu encourageants puisque ces mêmes auteurs ont montré que l'électroporation n'entraînait que 5 % à 10 % d'augmentation du taux d'incorporation d'ADN par rapport à la simple incubation des spermatozoïdes avec le transgène. Enfin, Bachiller *et al.* [26] ont réalisé des expériences de transfection relativement efficaces dans la tête des spermatozoïdes de souris à l'aide de liposomes, mais sans toutefois réussir à obtenir une descendance transgénique.

Ces différentes études mettent en évidence une grande variabilité interspèce de l'efficacité des transfusions et montrent, en fait, que la membrane plasmique du spermatozoïde représente un obstacle important à l'incorporation d'ADN exogène dans le génome de ces cellules. D'où la tentation de réaliser des brèches dans cette barrière naturelle, d'autant qu'il est devenu possible, depuis peu, d'obtenir des fécondations et des descendance chez la souris par ICSI avec des spermatozoïdes « morts » [27, 28]. C'est un travail de ce type qui a permis de conclure que le pourcentage de blastocystes contenant des blastomères fluorescents passait de 26 % avec des spermatozoïdes de souris intacts à 64-87 % avec des spermatozoïdes dont la membrane plasmique avait subi divers traitements : triton X-100, cycles répétés de congélation-décongélation et de congélation-séchage [29]. Après ICSI, Yanagimachi et ses collaborateurs ont mis en évidence que, sur 11 fondateurs transgéniques accouplés avec des souris non transgéniques, 8 ont engendré 27 % à 50 % (40 % en moyenne) d'animaux exprimant le transgène. Ils ont établi que le transgène était intégré au niveau du génome de la souris et que sa transmission était de type « mendélien ».

Si cette étude démontre la possibilité d'obtenir une descendance transgén-

nique de mammifère en utilisant des spermatozoïdes comme vecteur de transgénèse, le taux de réussite de cette expérience, par rapport à la transgénèse classique par injection dans le pronucléus, est à relativiser, puisque ces auteurs ont sélectionné les embryons après trois jours de culture avant de les réimplanter. En outre, certaines étapes de cette technique doivent être étudiées plus en détail. Par exemple, il est possible que les traitements de perméabilisation des membranes spermatiques puissent aussi engendrer des lésions au niveau de l'ADN génomique du spermatozoïde et avoir des conséquences néfastes sur la physiologie des animaux produits. De plus, le mode d'insertion du transgène dans le génome du spermatozoïde et, *a fortiori*, dans le génome du zygote n'est pas encore élucidé. Enfin, un élément non négligeable intervient dans ces mécanismes d'insertion d'un transgène: la compaction de l'ADN. En effet, le noyau des cellules germinales subit, pendant la différenciation des cellules haploïdes (la spermiogenèse), un certain nombre de modifications parmi lesquelles l'expression séquentielle d'histones, de protéines de transition et de protamines conduisant à l'extraordinaire compaction de la chromatine du spermatozoïde. Cette condensation de l'ADN, ainsi que les variations interspèces qui sont susceptibles d'exister à ce niveau, représentent autant d'éléments qui pourraient expliquer les différences d'efficacité de la technique, observées d'une espèce à une autre. Il reste que cette nouvelle approche, une fois affinée techniquement, devrait s'avérer très utile pour le développement de la transgénèse dans le domaine de la recherche et représente également une avancée significative pour le secteur de l'élevage, grâce aux perspectives de développement d'animaux à forte valeur ajoutée. Une conclusion importante que l'on peut aussi tirer de ce travail est la nécessité pour les praticiens de l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) de réaliser les ICSI dans des conditions de qualité sanitaire maximale, dans la mesure où la possibilité d'incorporation d'ADN exogène à l'ADN spermatique et sa transmission ne sont plus de simples hypothèses ■

## RÉFÉRENCES

- Gordon JW, Ruddle FH. Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Meth Enzymol* 1983; 101: 411-33.
- Wall RJ, Kerr DE, Bondioloi KR. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *J Dairy Sci* 1997; 80: 2213-24.
- Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski. <sup>3</sup>H uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 353-3.
- Arezzo F. Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information. *Cell Biol Int Rep* 1989; 13: 391-404.
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 1989; 57: 717-23.
- Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD. No simple solution for making transgenic mice. *Cell* 1989; 59: 239-41.
- Camaioni A, Russo MA, Odorisio T, Gandolfi F, Fazio VM, Siracusa G. Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads. *J Reprod Fertil* 1992; 96: 203-12.
- Maione B, Lavitrano M, Spadafora C, Kiessling AA. Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol Reprod Dev* 1998; 50: 406-9.
- Lavitrano M, French D, Zani M, Frati L, Spadafora C. The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 161-9.
- Lavitrano M, Zani M, Lulli V, *et al.* Mechanism of sperm-DNA interaction: spermatozoa as vectors for introducing exogenous DNA into eggs. In: A Lauria, F Gandolfi, eds: *Embryonic development and manipulation: trends in research and application*. London: Portland Press, 1992: 165-74.
- Zoraqi G, Spadafora C. Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 291-300.
- Chourrout D, Perrot E. No transgenic rainbow trout produced with sperm incubated with linear DNA. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1992; 1: 282-5.
- Lauria A, Gandolfi F. Recent advances in sperm cell mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 255-7.
- Kroll KL, Amaya E. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* 1996; 122: 3173-83.
- Schiestl RH, Petes T.D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7585-9.
- Kuspa A, Loomis WF. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8803-7.
- Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11298-302.
- Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11303-7.
- Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial transplantation. *Nat Med* 1996; 2: 693-6.
- Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 1996; 381: 418-21.
- Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogenic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod* 1999; 60: 515-21.
- Sofikitis N. Rodents make human sperm. BBC news online network, february 3 1999, <http://news.bbc.co.uk/hi/english/sci/tech/newsid-271000/271446.stm>.
- Tsai HJ, Lai CH, Yang HS. Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis divorsicolor* supertexta). *Transgenic Res* 1997; 6: 85-95.
- Muller F, Ivics Z, Erdelyi F, Papp T, Varadi L, Horvath L, Maclean N. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1992; 1: 276-81.
- Horan R, Powell R, Bird JM, Gannon F, Houghton JA. Effects of electroporation on the association of foreign DNA with pig sperm. *Arch Androl* 1992; 28: 105-14.
- Bachiller D, Schellander K, Peli J, Ruther U. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol Reprod Dev* 1991; 30: 194-200.
- Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perry AC, Yanagimachi H. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod* 1998; 58: 1407-15.
- Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 639-41.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 1999; 284: 1180-3.

**Pierrick Auvray  
Thierry Guillaudoux  
Bernard Jégou**

*Groupe d'Étude de la Reproduction chez le Mâle, Inserm U. 435, Université de Rennes I, Campus de Beaulieu, avenue du général-Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France.*

**TIRÉS À PART**

B. Jégou.