

TABLE DES MATIERES

<u>TABLE DES MATIERES</u>	5
<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	15
<u>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES</u>	17
<u>INTRODUCTION</u>	23
<u>I. LA TECHNIQUE DE CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS</u>	29
<u>A. FONDEMENT THEORIQUE DE LA TECHNIQUE DE CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE (figure 1)</u>	29
<u>B. PROBLEMES A RESOUDRE POUR L'ETABLISSEMENT D'UNE PROCEDURE FIABLE ET EFFICACE DE CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS</u>	29
<u>1. Problèmes d'ordre technique</u>	31
1.1. Obtention d'un grand nombre d'ovocytes receveurs utilisables pour le transfert nucléaire	31
1.1.1. Disponibilité en ovocytes receveurs	31
1.1.2. Enucléation des ovocytes receveurs	31
1.2. Fusion des membranes de l'ovocyte receveur et de la cellule donneuse	31
1.3. Activation des ovocytes receveurs	32
1.4. Culture des embryons reconstitués par transfert nucléaire	32
1.5. Variabilité des résultats	32
<u>2. Problèmes d'ordre biologique</u>	32

C. <u>ETUDE DE LA TECHNIQUE DE CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS A PARTIR DE L'EXEMPLE DU CLONAGE EMBRYONNAIRE</u>	33
1. <u>Préparation des ovocytes receveurs</u>	34
1.1. Maturation <i>in vitro</i> des ovocytes receveurs	34
1.1.1. Méthode	34
1.1.2. Qualité sanitaire des ovocytes maturés <i>in vitro</i>	36
1.2. Enucléation des ovocytes receveurs	37
1.3. Pré-activation des ovocytes receveurs	39
1.4. Congélation des ovocytes receveurs	39
2. <u>Préparation des cellules donneuses</u>	45
2.1. Origine de l'embryon donneur	45
2.2. Isolement des cellules donneuses	45
2.3. Congélation de l'embryon donneur	46
3. <u>Reconstitution en série d'embryons par transfert nucléaire</u>	46
3.1. Insertion du blastomère sous la zone pellucide	46
3.2. Fusion des membranes cellulaires du blastomère et de l'ovocyte receveur	47
3.3. Activation de l'ovocyte receveur	48
4. <u>Culture des embryons reconstitués</u>	48
5. <u>Transplantation des embryons clonés dans l'utérus de receveuses</u>	49
6. <u>Rendement de la procédure - Taille des clones</u>	49
D. <u>ASPECTS FONDAMENTAUX DU CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE : REMODELAGE ET REPROGRAMMATION</u>	50
1. <u>Remodelage</u>	50
2. <u>Reprogrammation</u>	50
3. <u>Mécanismes responsables du remodelage et de la reprogrammation</u>	51
➤ <u>POINTS FORTS A RETENIR</u>	53

**II. NOUVELLES DONNES EN MATIERE DE CLONAGE PAR
TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS55**

A. LES NOUVELLES SOURCES DE NOYAUX DONNEURS

4.1.3. La percée : Dolly	76
4.2. Les succès du clonage somatique dans l'espèce bovine	78
<u>Etude 1</u> (13)	78
<u>Etude 2</u> (65)	79
4.3. Espoirs	84
B. <u>CONGELATION DES EMBRYONS CLONES</u>	85
C. <u>CLONAGE ET SEXAGE</u>	86
➤ <u>POINTS FORTS A RETENIR</u>	88
 III. <u>RENDEMENTS ET POTENTIALITES DE DEVELOPPEMENT DU CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS</u>	89
A. <u>EFFICACITE GLOBALE DU CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS</u>	89
1. <u>Clonage embryonnaire chez les bovins : revue non exhaustive</u>	89
2. <u>Clonage somatique chez les bovins : revue non exhaustive</u>	90
B. <u>DEVELOPPEMENT IN VITRO DES EMBRYONS BOVINS CLONES</u>	91
1. <u>Développement in vitro des embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux embryonnaires</u>	91
1.1. Efficacité moyenne	91
1.2. Qualité morphologique des blastocystes clonés	92
2. <u>Développement in vitro des embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux somatiques</u>	93
2.1. Efficacité moyenne	93
2.2. Qualité morphologique des blastocystes clonés	93
3. <u>Facteurs de variation du rendement in vitro</u>	94
3.1. Variabilité du développement in vitro des embryons reconstitués	94

3.2 Influence du cycle cellulaire sur le rendement du clonage	95
3.2.1. Rappels sur le cycle cellulaire	95
3.2.1.1. Le cycle mitotique (Métézeau <i>et al.</i> (1994) et Etienne (1998), d'après Fréret (22))	95
3.2.1.2. L'état de quiescence (Métézeau <i>et al.</i> (1994) et Campbell (1999), d'après Fréret (22))	96
3.2.1.3. Les protéines de régulation du cycle cellulaire (Etienne (1998), d'après Fréret (22))	96
3.2.1.4. La méiose et la maturation ovocytaire (Campbell <i>et al.</i> (1996), d'après Fréret (22))	96
3.2.2. Effets du MPF sur le noyau transféré : interactions nucléocytoplasmiques	97
3.2.3. Maintien de la diploïdie dans les embryons reconstitués et effets sur le développement <i>in vitro</i> des embryons reconstitués	98
3.2.4. Quiescence des cellules donneuses de noyaux et effets sur le développement <i>in vitro</i> des embryons reconstitués	98
3.3. Qualités intrinsèques des cellules donneuses bovines	99
3.3.1. Influence du stade de développement de l'embryon donneur lors de clonage embryonnaire	99
3.3.2. Influence de l'âge, du nombre et de la taille des cellules d'un embryon donneur sur l'efficacité de la procédure de clonage embryonnaire	103
3.3.2.1. Influence de l'âge et du nombre de cellules de l'embryon donneur sur le développement des embryons reconstitués par transfert nucléaire	104
3.3.2.2. Influence de la taille des blastomères de l'embryon donneur sur le développement des embryons reconstitués par transfert nucléaire	107
3.3.3. Influence de l'état de différenciation cellulaire des cellules donneuses	110
3.3.3.1. Rappels sur la différenciation cellulaire (Alberts <i>et al.</i> (1995), d'après Fréret (22))	110
3.3.3.2. Variation des résultats du clonage en fonction du type cellulaire	110
3.4. Qualités intrinsèques des ovocytes receveurs bovins	111
3.4.1. Influence de l'âge de l'ovocyte receveur	111

3.4.2. Critères morphologiques de sélection des ovocytes maturés <i>in vitro</i> pour le clonage par transfert nucléaire	112
3.5. Conditions de culture <i>in vitro</i> des ovocytes et des embryons reconstitués	113
3.5.1. Influence des conditions de la maturation <i>in vitro</i> des ovocytes sur le développement des embryons reconstitués par transfert nucléaire (35)	113
3.5.2. Influence des conditions de culture <i>in vitro</i> des embryons reconstitués par transfert nucléaire sur leur développement ultérieur (35)	116
C. <u>DEVELOPPEMENT IN VIVO DES EMBRYONS BOVINS CLONES</u>	117
1. <u>Efficacité moyenne</u>	117
1.1. Développement <i>in vivo</i> des embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux embryonnaires	117
1.2. Développement <i>in vivo</i> des embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux somatiques	118
2. <u>Variabilité du développement <i>in vivo</i> des embryons bovins clonés</u>	119
3. <u>Syndrome placentaire</u>	120
➤ <u>POINTS FORTS A RETENIR</u>	121
IV. <u>NORMALITE ET IDENTITE DES BOVINS CLONES</u>	123
A. <u>CARACTERISTIQUES DES VEAUX CLONES A LA NAISSANCE</u>	123
1. <u>Quelques études</u>	124
Etude 1 (72)	124
Etude 2 (24)	126
Etude 3 (25)	133
Etude 4 (32)	135
Etude 5 (56)	139
2. <u>Le syndrome du « gros veau »</u>	141
2.1. Bases physiologiques et moléculaires du syndrome du « gros veau »	141
2.1.1. L’empreinte génomique	141

2.1.2. Les facteurs cytoplasmiques	142
2.2. L'hérédité du syndrome du « gros veau »	142
2.3. Conséquences cliniques et économiques du syndrome du « gros veau »	142
B. <u>CARACTERISTIQUES DE CROISSANCE DES VEAUX CLONES</u>	143
C. <u>CARACTERISTIQUES DES BOVINS CLONES ADULTES</u>	145
D. <u>LES CLONES : DES INDIVIDUS IDENTIQUES ?</u>	145
1. <u>Les variations génétiques</u>	145
2. <u>Les facteurs environnementaux</u>	146
3. <u>Discussion</u>	146
E. <u>QUEL EST L'AGE DES BOVINS CLONES ?</u>	147
➤ <u>POINTS FORTS A RETENIR</u>	149
V. <u>INTERETS DU CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE DES BOVINS</u>	151
A. <u>INTERETS DU TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS POUR LA RECHERCHE FONDAMENTALE</u>	151
B. <u>INTERETS DES CLONES BOVINS EN EXPERIMENTATION ANIMALE</u>	152
1. <u>Diminution du nombre d'animaux nécessaires (16)</u>	152
2. <u>Utilisation des clones bovins pour l'expérimentation</u>	153
2.1. <u>Utilisation des clones bovins en immunopathologie (27)</u>	153
2.2. <u>Etude de l'influence des facteurs d'environnement</u>	153
2.3. <u>Etude du comportement alimentaire (27)</u>	153
2.4. <u>Autres applications</u>	153
C. <u>INTERETS DU CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE DANS LA GESTION DES RESSOURCES GENETIQUES BOVINES</u>	153
1. <u>Créer un fonds génétique dans l'espèce bovine</u>	153
2. <u>Aider à la réalisation de programmes de croisement originaux</u>	154

3. <u>Gestion des races de petits effectifs</u>	154
D. <u>LES CLONES BOVINS ET L'ELEVAGE</u>	155
1. <u>Les stratégies de sélection actuelles dans l'élevage bovin</u>	155
1.1. Déterminisme génétique des caractères (15)	155
1.2. Les facteurs du progrès génétique (15)	156
2. <u>Perspectives d'application du clonage par transfert nucléaire dans l'élevage bovin</u>	156
2.1. Amélioration de la connaissance de la valeur génétique des reproducteurs .	156
2.1.1. Exemple en production laitière (15, 16)	157
2.1.2. Exemple en production de viande (16)	159
2.2. Diffusion de génotypes d'élite bien connus (15, 16)	160
2.3. Diffusion commerciale potentielle de clones bovins « terminaux »	161
2.4. Synergie entre le clonage et les biotechnologies de la connaissance du génome (15, 16, 42)	162
E. <u>CLONAGE ET TRANSGENESE</u>	162
1. <u>La transgénèse : généralités</u> (4)	162
2. <u>Modalités d'obtention des bovins transgéniques</u> (figure 12)	163
2.1. Micro-injection d'ADN dans le pronucléus de l'œuf fécondé	163
2.2. Transfert de noyaux transgéniques de cellules somatiques cultivées bovines dans des ovocytes énucléés	166
3. <u>Clonage des bovins et transgénèse : perspectives d'application</u>	167
3.1. Production de protéines à usage pharmaceutique et médical	167
3.2. Création de nouveaux modèles animaux	168
3.3. Thérapies cellulaires et xénotransplantations	169
➤ <u>POINTS FORTS A RETENIR</u>	171

VI. <u>PROBLEMES POSES PAR L'UTILISATION DU CLONAGE CHEZ LES BOVINS</u>	173
A. <u>LIMITES POUR L'ELEVAGE BOVIN</u>	173
1. <u>Préservation de la variabilité génétique</u>	173
2. <u>Le contexte agricole actuel</u> (37)	174
B. <u>CONDITIONS NECESSAIRES POUR L'APPLICATION COMMERCIALE DU CLONAGE DES BOVINS</u>	175
C. <u>LE CONTEXTE ECONOMIQUE ACTUEL DE L'ACTIVITE SCIENTIFIQUE DE RECHERCHE RELATIVE AU CLONAGE</u>	175
D. <u>LES POSITIONS DU PUBLIC VIS-A-VIS DU CLONAGE</u>	176
1. <u>Les clones bovins inquiètent les associations de consommateurs japonais</u> (40)	176
2. <u>Perspectives révélées par une étude canadienne</u> (21)	177
E. <u>CLONAGE : DE L'ETHIQUE A LA POLITIQUE, DE L'ANIMAL A L'HOMME</u>	179
➤ <u>POINTS FORTS A RETENIR</u>	184
<u>CONCLUSION</u>	185
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	187

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

BLAD : bovine leucocytes adhesion deficiency

BVD : bovine viral diarrhoea

CDK : cycline dependent kinases

ES : embryonic stem

ESB : encéphalopathie spongiforme bovine

FIV : fécondation *in vitro*

FSH : follicle stimulating hormone

GV : germinal vesicle

IBR : infectious bovine rhinotracheitis

IGF-1 : insulin-like growth factor-1

IGF-2 : insulin-like growth factor-2

LH : luteinising hormone

MII : métaphase II, ou métaphase de deuxième division réductionnelle de méiose

MPF : maturation/meiosis/mitosis-promoting factor

NEBD : nuclear envelope breakdown

PAG : pregnancy associated protein

PBS : phosphate buffered saline

PCC : premature chromosome condensation

PCR : polymerase chain reaction

PGC : primordial germ cells

QTL : quantitative trait loci

T3 : triiodothyronine

T4 : thyroxine

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<u>Figure 1</u> : Principales étapes de la technique de clonage par transfert de noyaux chez les bovins.....	30
<u>Figure 2</u> : Principales étapes de la technique de clonage par transplantation nucléaire utilisée chez les bovins : exemple du clonage embryonnaire.....	35
<u>Figure 3</u> : Production de cellules présumées ES transgéniques bovines par micro-injection d'ADN (A) ou par transfert nucléaire de cellules somatiques (B).....	73
<u>Figure 4</u> : Variabilité du nombre de blastocystes clonés transférés chez des receveuses selon l'embryon donneur de noyaux	94
<u>Figure 5</u> : Les phases du cycle cellulaire	95
<u>Figure 6</u> : Efficacité, chez les bovins, du transfert nucléaire (blastocystes formés par embryon donneur, moyennes et écarts-type) en fonction du mode de production (<i>in vivo</i> , <i>in vitro</i>) et du stade de développement des embryons donneurs (morula, morula en cavitation, blastocyste)	101
<u>Figure 7</u> : Efficacité, chez les bovins, du transfert nucléaire (blastocystes formés par embryon donneur, moyennes et écarts-type) en fonction de l'âge et du nombre de cellules des embryons donneurs	106
<u>Figure 8</u> : Efficacité, chez les bovins, du transfert nucléaire (blastocystes formés par embryon donneur, moyennes et écarts-type) en fonction de la taille des blastomères des embryons donneurs (morulae de 6 jours composées d'un nombre intermédiaire ou élevé de cellules)	109
<u>Figure 9</u> : Aptitude des ovocytes bovins maturés <i>in vitro</i> à être activés	112
<u>Figure 10</u> : Variabilité du nombre de veaux nés par clone	119
<u>Figure 11</u> : Utilisation collective des clones femelles chez les bovins laitiers	158
<u>Figure 12</u> : Les modalités d'obtention des bovins transgéniques	164
<u>Figure 13</u> : Facteurs influençant l'enthousiasme du public canadien pour le clonage	178

<u>Tableau 1</u> :	Contamination des ovocytes et des milieux de maturation des ovocytes en fonction du statut infectieux de l'appareil génital de vaches donneuses expérimentalement infectées par le virus de l'IBR	37
<u>Tableau 2</u> :	Taux de survie et de maturation, après décongélation, d'ovocytes bovins ayant subi un protocole de cryoconservation à l'état immature (GV) ou mature (MII)	40
<u>Tableau 3</u> :	Développement, après décongélation et fécondation <i>in vitro</i> , d'ovocytes bovins ayant subi un protocole de cryoconservation à l'état immature (GV) ou mature (MII).....	41
<u>Tableau 4</u> :	Taux d'énucléation, après décongélation, d'ovocytes bovins ayant subi un protocole de cryoconservation à l'état immature (GV) ou mature (MII).....	41
<u>Tableau 5</u> :	Développement, après décongélation et transplantation de noyaux, d'ovocytes bovins ayant subi un protocole de cryoconservation à l'état immature (GV) ou mature (MII et MIIe).....	42
<u>Tableau 6</u> :	Développement d'embryons générés par transfert nucléaire réciproque entre des ovocytes bovins maturés ayant subi le protocole de cryoconservation-décongélation et des ovocytes bovins maturés frais	43
<u>Tableau 7</u> :	Rendement du reclonage des embryons bovins	56
<u>Tableau 8</u> :	Développement <i>in vitro</i> d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de gonies bovines mâles âgées de 175 jours post-fécondation	59
<u>Tableau 9</u> :	Développement <i>in vitro</i> d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de gonies bovines âgées de 48 jours post-fécondation	60
<u>Tableau 10</u> :	Développement <i>in vivo</i> d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de gonies bovines âgées de 48 jours post-fécondation	61
<u>Tableau 11</u> :	Développement <i>in vitro</i> d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de gonies bovines âgées de 105 à 185 jours post-fécondation	62
<u>Tableau 12</u> :	Développement <i>in vivo</i> d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de gonies bovines âgées de 48 jours post-fécondation.....	63
<u>Tableau 13</u> :	Lignées cellulaires embryonnaires bovines établies depuis des embryons d'origine et de stade différents	66
<u>Tableau 14</u> :	Développements <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> d'embryons reconstitués par transfert, dans des ovocytes énucléés et activés, de noyaux donneurs issus de lignées cellulaires embryonnaires bovines dérivant d'embryons de stade blastocyste ou morula	68

<u>Tableau 15</u> : Production de veaux chimériques à partir de cellules présumées ES transgéniques dérivant, soit d'embryons préimplantatoires, soit du transfert nucléaire de cellules somatiques	74
<u>Tableau 16</u> : Caractérisation immunocytochimique des cellules donneuses	80
<u>Tableau 17</u> : Développement <i>in vitro</i> d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de trois types différents de cellules somatiques bovines	82
<u>Tableau 18</u> : Nombre de gestations initiées après transfert nucléaire de cellules somatiques bovines se trouvant en phase de quiescence (G0) ou en phase de multiplication (S)	83
<u>Tableau 19</u> : Développement <i>in vivo</i> , après transfert chez des receveuses, de blastocystes produits par transplantation nucléaire de différents types de cellules somatiques bovines	84
<u>Tableau 20</u> : Efficacité de la détermination du sexe de l'embryon donneur selon le nombre de cellules prélevées	87
<u>Tableau 21</u> : Résultat des transplantations de blastocystes clonés issus de cinq embryons mâles	87
<u>Tableau 22</u> : Efficacité du clonage embryonnaire chez les bovins	89
<u>Tableau 23</u> : Efficacité du clonage somatique chez les bovins	90
<u>Tableau 24</u> : Développement <i>in vitro</i> d'embryons bovins clonés à partir de différentes sources de noyaux embryonnaires : comparaison avec le développement d'embryons témoins issus de fécondation <i>in vitro</i>	92
<u>Tableau 25</u> : Développement <i>in vitro</i> d'embryons bovins clonés à partir de différentes sources de noyaux de cellules somatiques cultivées	93
<u>Tableau 26</u> : Efficacité d'une procédure de transfert nucléaire utilisant des embryons donneurs bovins de différents stades produits <i>in vivo</i>	100
<u>Tableau 27</u> : Efficacité d'une procédure de transfert nucléaire utilisant des embryons donneurs bovins de différents stades produits <i>in vitro</i>	102
<u>Tableau 28</u> : Développement d'embryons bovins clonés après transfert chez des receveuses	103
<u>Tableau 29</u> : Influence, chez les bovins, de l'âge et du nombre de cellules de l'embryon donneur sur le développement des embryons reconstitués par transfert nucléaire	104

<u>Tableau 30</u> : Influence, chez les bovins, de la taille des blastomères d'un embryon donneur de 6 jours, composé d'un nombre moyen ou élevé de cellules, sur le développement des embryons reconstitués par transfert nucléaire	108
<u>Tableau 31</u> : Influence de la taille des follicules sur le développement d'embryons bovins reconstitués par transfert nucléaire	113
<u>Tableau 32</u> : Développement d'embryons clonés à partir d'ovocytes bovins maturés <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>	114
<u>Tableau 33</u> : Développement d'embryons bovins produits par fécondation <i>in vitro</i> d'ovocytes maturés dans des milieux constitués de substrats énergétiques diversifiés	116
<u>Tableau 34</u> : Evolution des taux de gestation après transfert à des génisses receveuses de blastocystes bovins issus de clonage embryonnaire	118
<u>Tableau 35</u> : Fréquence et caractéristiques des principales anomalies observées chez les veaux issus de clonage somatique	124
<u>Tableau 36</u> : Comparaison des poids de naissance (kg) de veaux produits par transfert nucléaire, transfert embryonnaire et insémination artificielle ou monte naturelle	125
<u>Tableau 37</u> : Pressions artérielles en O ₂ et CO ₂ , pH sanguin, concentrations plasmatiques en bicarbonates, glucose et lactate, et balance anionique de veaux clonés nouveau-nés	128
<u>Tableau 38</u> : Concentrations en hormones et métabolites d'échantillons de plasma de veaux clonés prélevés durant la première heure de vie	130
<u>Tableau 39</u> : Valeurs de quelques paramètres artériels de fœtus bovins clonés et non clonés d'âge avancé (entre 255 et 287 jours de gestation)	134
<u>Tableau 40</u> : Comparaison des poids (kg) à 205 et 365 jours de veaux produits par transfert nucléaire, transfert embryonnaire et insémination artificielle ou monte naturelle	144
<u>Tableau 41</u> : Efficacité statistique d'un animal cloné par rapport à un animal classique pour la détection d'un effet traitement expérimental	152
<u>Tableau 42</u> : Précision de l'indexation des clones femelles pour la production laitière	159
<u>Tableau 43</u> : Impact du clonage sur le progrès génétique annuel chez les bovins laitiers par rapport à un schéma utilisant le transfert d'embryons (TE) produits par des femelles de 2 ans	159

<u>Tableau 44</u> : Impact économique de l'utilisation dans un troupeau de clones bovins testés et sélectionnés	161
--	-----

<u>Tableau 45</u> : Les positions du public canadien vis-à-vis du clonage	178
--	-----

Rapport-Gratuit.com

INTRODUCTION

Le 23 février 1997, l'hebdomadaire britannique *The Observer* révélait la naissance survenue sept mois plus tôt, le 5 juillet 1996, du premier animal cloné à partir d'une cellule adulte (33). Les journaux, magazines et télévisions du monde entier se saisirent immédiatement de cette nouvelle et, par une couverture médiatique sans précédent, en assurèrent une large diffusion (21, 42, 47). Dolly – c'est le nom de cet animal cloné, une brebis de race Finn Dorset – ainsi que deux de ses « pères » scientifiques, Ian Wilmut et Keith Campbell, ne tardèrent donc pas à devenir célèbres, alors que jusque là, le clonage était resté confiné dans quelques expérimentations peu connues du grand public. Suite à l'annonce de cette naissance, chefs d'Etat et parlements, scientifiques et industriels, écologistes et spécialistes de la bioéthique, philosophes et hommes d'Eglise produisirent en quelques jours une invraisemblable et durable cacophonie (21, 47, 63). Et tout cela pour la naissance d'un mouton ! L'humanité était-elle donc si légère ? Ou bien faut-il admettre que ces réactions enflammées étaient le signe qu'il s'était produit un événement fondamental, tout autant inattendu qu'exceptionnel, pour ne pas dire à hauts risques ?

L'un des mérites de Dolly est d'avoir fait sortir du laboratoire une technologie pourtant encore balbutiante peu de temps auparavant : une alternative se présentait donc à la reproduction sexuée, considérée jusque là comme la seule voie utilisée chez les mammifères pour assurer la propagation des espèces. Et d'emblée, les dérives de l'application du clonage à l'homme ne faisaient plus aucun doute (11, 33, 34, 52). Ce qu'on appliquait aux mammifères domestiques n'allait-il pas inévitablement être aussi mis en œuvre chez l'homme ? Dès lors, n'était-il pas plus prudent d'interdire purement et simplement toute forme de clonage animal ? Toutes ces interrogations traduisent bien l'inquiétude quasi-générale alors suscitée par l'annonce de cette naissance. Pourtant, cette nouvelle doit être replacée dans son contexte : il s'agit d'abord d'un événement scientifique dont il faut prendre la mesure avant d'en apprécier la portée symbolique majeure et d'engager un débat éthique nécessaire.

Commençons donc par définir ce qu'on entend exactement par le terme de « clone ». La réponse n'est pas si simple, car l'usage a très rapidement évolué au cours de ces dernières années. Mais elle est instructive.

Etymologiquement, le mot « clone » vient du grec « klôn » qui désigne une petite branche ou une jeune pousse (51). Aujourd'hui, on définit par « clone » un ensemble d'organismes vivants génétiquement identiques, tous issus d'un organisme unique (12, 27, 30, 41, 51, 53, 55), et par « clonage », l'opération consistant à produire ces organismes (28, 52). Le clonage s'oppose par là même à la reproduction sexuée qui implique, par essence, la rencontre de deux individus distincts, et qui conduit généralement à la naissance d'organismes génétiquement différents (16, 52).

Si depuis la naissance de Dolly, la question du clonage n'a cessé de se poser avec de plus en plus d'importance, le concept n'est pourtant pas totalement innovant, la nature nous fournissant spontanément plusieurs exemples de clones.

Ainsi, le clonage est très répandu dans le règne végétal où de nombreuses espèces utilisent, principalement ou accessoirement, une forme bien particulière de reproduction asexuée, la multiplication végétative. Par ce mode de reproduction, leurs cellules ont chacune la capacité de recréer l'intégralité de l'organisme dont elles sont issues. La prolifération des mauvaises herbes, l'utilisation de fragments de tige pour bouturer ou marcotter une plante, ou encore

l'enfouissement de tubercules en terre représentent donc autant de formes courantes de clonage végétal (47, 51, 52, 53, 54).

De même, certains micro-organismes comme les bactéries se reproduisent en se clonant : en se scindant, chaque bactérie donne naissance à deux organismes dont les génomes sont - en général - parfaitement identiques (47). Cette forme rudimentaire de clonage est par ailleurs facilement reproductible : lorsqu'après isolement, on place une bactérie, voire même une cellule, dans un milieu de culture approprié pour qu'elle prolifère, on réalise aussi un clonage (52). En biologie cellulaire et en microbiologie, le terme de « clone » prend donc une nouvelle signification pour caractériser une population de cellules dérivant d'une cellule unique (51). Par extension, on parle aussi de clonage de molécules quand, par les méthodes du génie génétique, on reproduit à l'identique la molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique), support universel des caractères génétiques (51, 52).

Chez les animaux enfin, si nous mettons à part les animaux primitifs comme les amibes, les coraux ou les éponges qui se reproduisent par simples divisions cellulaires (47, 51), la reproduction sexuée semble par contre de règle, chaque organisme étant issu d'une cellule unique, l'œuf fécondé. Pourtant, il y a là encore des exceptions qui concernent entre autres les mammifères.

C'est d'abord le cas des diverses espèces de tatous, dont l'embryon commence à se diviser en huit à douze bourgeons qui poursuivent ensuite leur développement, aboutissant à autant de jeunes. Ceux-ci forment bien un clone puisqu'ils sont tous issus du même œuf (47, 51, 52). Mais c'est aussi le cas des jumeaux monozygotes, communément appelés « vrais » jumeaux, que nous pouvons rencontrer dans de nombreuses espèces, dont la nôtre. Résultant de la scission accidentelle d'un tout jeune embryon avant son implantation dans l'utérus maternel, et provenant par conséquent d'un même œuf, ils forment également un clone (27, 47, 52). Chez les mammifères, cependant, contrairement à ce qui se passe chez beaucoup de végétaux et d'animaux simples, les clones naturels ne sont pas la copie d'un adulte existant (47).

L'obtention de copies conformes d'un même animal est toujours apparue comme un enjeu, ne serait-ce que pour les besoins de la recherche : dans cette optique, se pratiquait par le passé le recensement des paires de veaux jumeaux monozygotes nés naturellement dans les élevages (51), l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) ayant d'ailleurs mis en place, dans les années soixante, un service spécialisé pour acheter les jumeaux et jumelles identiques de plusieurs races bovines (Normande, Française Frisonne Pie Noire et Pie rouge de l'Est) afin de développer les recherches sur l'alimentation et la production laitière ou les performances de reproduction (29).

Or, si le monde vivant offre régulièrement des exemples de clonage, ces événements restent toutefois encore quantitativement rares (52) : ainsi, si nous reprenons le cas des « vrais » jumeaux, et en ne considérant que l'espèce bovine, l'obtention de tels jumeaux reste exceptionnelle dans les conditions naturelles d'élevage, représentant moins de 1% des vêlages (27, 31, 41). Jusqu'à une date récente, l'obtention en grand nombre d'individus génétiquement identiques n'était donc pas envisageable pour les productions animales (53, 54). Pour obtenir des clones animaux avec des fréquences plus élevées, il est donc apparu nécessaire de recourir à des artifices (51, 52).

Dans cet objectif, on a par exemple pensé à modifier la constitution génétique des cellules sexuelles femelles chez des espèces où existe une forme bien particulière de reproduction sexuée, la parthénogenèse, qui permet à l'embryon de se développer à partir du seul gamète femelle sans contribution d'aucun gamète mâle. Ce mode de reproduction n'existe pas chez les mammifères, mais se rencontre chez certains poissons chez lesquels il suffit de bloquer précocement la première division de l'ovocyte pour obtenir une cellule qui possède le nombre

requis de chromosomes. Il en résulte alors un développement complet par parthénogenèse, et des individus femelles, tous génétiquement identiques à la femelle qui a pondu les ovocytes, sont obtenus. Cette technique, dont l'efficacité reste faible, permet néanmoins d'obtenir pour des études de génétique des clones de 10, voire 100 poissons (47, 52).

Chez les mammifères, une tout autre approche a d'abord été développée, mimant ce qui se passait à l'état naturel avec les jumeaux monozygotes quand l'embryon se sépare en deux masses de cellules : elle consiste à scinder en deux demi-embryons un embryon à un stade précoce de son développement (stade préimplantatoire) par micromanipulation, puis à réimplanter les deux moitiés dans l'utérus de receveuses synchronisées (27, 28, 29, 30, 31, 41, 47, 54). D'après Heyman *et al.* (31), Willadsen obtient de cette manière, en 1979, de « vrais » jumeaux après séparation des blastomères d'embryons ovins de stade 2 cellules. Ce premier succès a motivé de nombreuses expériences dans l'espèce bovine au cours desquelles des jumeaux ont été obtenus après bissection d'embryons de stades 4 et 8 cellules (31). Mais surtout, plusieurs auteurs (27, 29, 31, 41, 47, 52) rapportent les travaux d'Ozil *et al.* qui, en 1982, utilisent avec réussite cette méthode sur des embryons bovins de stades de développement plus avancés (morula ou blastocyste). Depuis, cette technique a été régulièrement appliquée aux embryons des espèces bovine, ovine et caprine (30), et a conduit à des taux de gestations gémellaires élevés, proches de 60% (52). Cependant, il y a des limites à cette façon de procéder, puisque par simple section d'un embryon au stade morula ou blastocyste, il n'est pas possible de disposer de clones de trois ou quatre individus (27, 28, 29, 31, 41). Le fait d'effectuer des sections embryonnaires supplémentaires n'y change pratiquement rien : en effet, couper les embryons en quatre ou en huit n'a, à ce jour, permis d'obtenir que très rarement des triplés, et une seule fois des quadruplés (28, 30).

Chez les mammifères toujours, une seconde approche par dissociation des cellules issues des premières divisions de l'œuf fécondé a également été tentée, s'inspirant de l'exemple du tatou, mais n'a abouti que très occasionnellement à la naissance de clones, avec un record toutefois, à savoir la naissance de quatre veaux issus d'un seul embryon dissocié au stade 8 cellules (31, 52). L'intérêt porté à cette technique, ainsi qu'à la précédente, est donc limité.

Heureusement, l'amélioration des connaissances relatives au début du développement de l'embryon et la mise au point de nouvelles technologies de micromanipulation ont permis de développer une troisième approche : celle-ci consiste à reconstituer en série des embryons en introduisant dans des ovocytes matures (stade métaphase II), appelés receveurs, qui ont préalablement été énucléés, les noyaux de cellules donneuses prélevées sur un même embryon, fœtus ou organisme adulte, porteurs de la même information génétique (27, 28, 29, 30, 41, 52, 53, 54). Cette technique dite de « transfert nucléaire » (ou transplantation nucléaire), appliquée à différentes sources de noyaux donneurs, permet théoriquement, au terme du développement complet des embryons ainsi reconstitués, de produire un plus grand nombre d'animaux génétiquement identiques que les techniques précédentes, et de ce fait, ouvre la voie à l'obtention de véritables clones (28, 31, 41, 53, 54).

D'ores et déjà, le terme de « clone » trouve ici une nouvelle définition, désignant cette fois un ensemble d'organismes vivants génétiquement identiques produits par transfert nucléaire.

L'idée du clonage par transplantation nucléaire n'est cependant pas toute récente, de nombreux auteurs (27, 28, 34, 41, 42, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54) relatant l'ancienneté des premières expérimentations en la matière. Ainsi, dès 1938, Spemann propose, à des fins de recherche fondamentale, l'application de ce principe chez les amphibiens. Prolongeant les travaux de Spemann, Briggs et King montrent, en 1952, que le transfert de noyaux prélevés au stade préblastula chez la grenouille *Rana pipiens* dans des ovocytes énucléés permet d'obtenir des têtards, mais en aucun cas des adultes. Pourtant, en 1962, Mc Kinel obtient de cette façon de jeunes grenouilles. A partir de là, les recherches chez les amphibiens sont surtout l'œuvre

de deux biologistes, Gurdon puis DiBerardino, qui tentent de reprogrammer l'activité de noyaux non plus embryonnaires, mais somatiques : or, excepté un succès contesté de Gurdon qui, en 1962, affirme avoir cloné des grenouilles à partir de cellules intestinales de têtards, l'utilisation de cellules somatiques prélevées sur des adultes s'est avérée plutôt décevante, conduisant au mieux à la production de larves d'apparence normale.

Mais, bien que le concept de transfert nucléaire soit relativement ancien, plusieurs auteurs (28, 34, 41, 48, 49, 53, 54, 55) rapportent qu'il faut toutefois patienter jusqu'en 1983 pour que McGrath et Solter transposent aux mammifères (en l'occurrence à la souris) la procédure de transplantation nucléaire développée chez les amphibiens. Dès lors, les premières naissances de mammifères clonés par transfert nucléaire surviennent rapidement : ainsi, plusieurs auteurs (27, 28, 29, 30, 34, 41, 47, 48, 53) rapportent les travaux de Willadsen qui, pour la première fois chez les mammifères, obtient, en 1986 à Cambridge, trois agneaux de race Suffolk après transfert de noyaux d'embryons de stade 8 cellules, deux des trois agneaux provenant du même embryon donneur. L'année suivante, aux Etats-Unis, ce sont Prather *et al.* (cités par 31, 34, 41, 42, 47, 48, 53) qui enregistrent un premier succès chez les bovins, avec la naissance d'un unique veau issu du transfert nucléaire d'un blastomère provenant d'un embryon de stade 8-16 cellules. Ces résultats ouvrent la voie à d'autres succès, notamment dans l'espèce bovine où les travaux de Bondioli *et al.*, rapportés par Heyman *et al.* (28), et ceux de Chesné *et al.* (12), aboutissent respectivement, en 1989 et en 1993, à la naissance de clones de veaux mâles de huit et cinq individus. Cette liste est pourtant loin d'être exhaustive, tant l'utilisation d'embryons à un stade précoce de leur développement comme source de noyaux donneurs (clonage embryonnaire) a été largement étendue à d'autres espèces de mammifères que les seuls ovins ou bovins. Citons par exemple les succès de Stice et Robl (1988), de Heyman *et al.* (1990) et de Collas et Robl (1991) chez le lapin, ceux de Prather *et al.* (1989) chez le porc, ceux de Yong *et al.* (1991) chez la chèvre, et enfin plus récemment, ceux de Meng *et al.* (1997) chez le singe rhésus (22, 53).

A partir de là, tout s'accélère en matière de clonage des mammifères. De nouvelles sources de noyaux donneurs (cellules germinales, cellules souches embryonnaires) sont testées en remplacement des traditionnels blastomères des jeunes embryons. Mais c'est surtout l'utilisation de cellules somatiques cultivées (clonage somatique) qui semble la plus prometteuse. La naissance, en juillet 1995, des deux agnelles Megan et Morag, obtenues par transplantation de noyaux provenant d'une culture de cellules différenciées (8), en même temps qu'elle relance le relatif désintérêt pour la procédure de transfert nucléaire qui s'était installé suite à la constatation de certaines limites de la technique de clonage embryonnaire, laisse en effet supposer que des cellules somatiques issues d'un organisme fœtal ou adulte peuvent être employées avec succès comme donneurs de matériel génétique dans une procédure de clonage par transfert nucléaire. Et de fait, après Dolly, dont la naissance se produit exactement un an après celles de Megan et Morag, ce fut ensuite au tour des agneaux Polly et Molly (Etats-Unis, juillet 1997) et des veaux George et Charlie (Etats-Unis, janvier 1998), premiers mammifères transgéniques et clonés produits par transfert de noyaux de cellules somatiques fœtales porteuses de gènes humains, de se trouver sous les feux de l'actualité (17). En France, les travaux menés à l'INRA conduisent aux naissances de la génisse Limousine Marguerite (février 1998) et du mâle croisé Holstein Narcisse (mars 1998), tous deux issus du transfert de noyaux de cellules musculaires fœtales bovines, ainsi qu'à la naissance, un peu plus tard, d'un veau mâle baptisé Lucifer, obtenu cette fois par transfert nucléaire d'une cellule de peau fœtale contenant un transgène marqueur (65). Le clonage somatique des bovins a, bien évidemment, donné lieu à d'autres réussites (13, 56), Renard *et al.* (55) rapportant par exemple les travaux de Kato *et al.* (1998), qui produisent un clone de huit veaux depuis des cellules somatiques adultes, ou encore ceux de Wells *et al.* (1999). Mais d'autres succès sont également recensés dans d'autres espèces. Ainsi, Betthausen *et al.* (2)

relatent leurs propres travaux chez le porc ainsi que ceux menés par Baguisi *et al.* (1999) chez la chèvre. La souris, d'ordinaire si difficile à cloner, n'est pas épargnée non plus (67) : le clonage devient donc un phénomène incontournable.

La plupart des spécialistes s'accordent à penser que le recours au clonage sera, dans un avenir très proche, chose courante chez les animaux de rente (52). Mais si les premiers mammifères clonés étaient des ovins, c'est pourtant dans l'espèce bovine que les perspectives d'applications du clonage, seul ou associé à une autre technique, la transgénèse, présentent les enjeux économiques les plus importants (30, 47, 51). Pour s'en convaincre, il suffit de constater que depuis l'obtention du premier veau issu de transfert nucléaire en 1987, une intense activité de recherche portant sur le clonage des bovins a été mondialement développée au sein de laboratoires institutionnels publics et de sociétés privées misant sur de futures applications commerciales (28, 29, 30, 41, 51, 52, 53).

Nous trouverons donc, dans cet engouement commercial important porté aux bovins, une justification de la limitation de notre étude consacrée au clonage par transfert nucléaire à cette espèce.

Tout d'abord, nous détaillerons, à partir de l'exemple du clonage embryonnaire, les différentes étapes de cette technique appliquée aux bovins, en essayant de montrer que la méthode aujourd'hui utilisée ne s'est pas imposée d'emblée. En effet, il aura auparavant fallu non seulement résoudre des obstacles d'ordre technique, mais aussi des obstacles d'ordre biologique concernant entre autres une question essentielle de l'embryologie, à savoir la différenciation cellulaire.

Nous poursuivrons alors en envisageant l'utilisation pour le transfert nucléaire d'autres sources de noyaux donneurs que les blastomères, comme les cellules germinales, les cellules souches embryonnaires et surtout les cellules somatiques, et nous aborderons également l'association du clonage avec d'autres techniques, à savoir la congélation des embryons clonés et surtout le sexage.

Qu'il s'agisse de clonage embryonnaire ou somatique, nous nous attarderons sur le potentiel de ces opérations en constatant, d'une part, que les rendements sont assez faibles, n'autorisant que très rarement la production de clones de grande taille, et d'autre part, que ces procédures s'accompagnent fréquemment chez les bovins d'anomalies du développement des clones, tant morphologiques (syndrome des « gros veaux ») que physiologiques (mortalité périnatale importante).

Ces échecs du clonage sont régulièrement attribués à une reprogrammation imparfaite de l'activité des gènes du noyau donneur par le cytoplasme de l'ovocyte receveur. Dans le but d'améliorer l'efficacité de cette technique, il semble donc important d'appréhender la complexité des interactions noyau-cytoplasme et, notamment, de contrôler la synchronisation des cycles cellulaires du noyau donneur et de l'ovocyte receveur. Mais la réussite du transfert nucléaire met également en jeu d'autres facteurs comme l'état de différenciation de la cellule donneuse (dont l'étude permet d'envisager les modalités de l'expression des gènes au cours du développement), les conditions de culture des ovocytes receveurs et, éventuellement, des cellules donneuses avant leur utilisation, les qualités intrinsèques respectives de ces cellules, ou encore les conditions de culture *in vitro* des embryons reconstitués. Nous percevons ainsi la valeur heuristique du clonage par transfert nucléaire qui en fait, avant toute chose, un outil de recherche en matière de biologie fondamentale.

C'est loin d'être le seul intérêt du clonage des bovins : nous ne manquerons donc pas de développer les perspectives d'applications qui suivent trois axes principaux que sont l'expérimentation animale, la gestion des ressources génétiques (s'intéressant essentiellement au maintien des populations animales de petits effectifs), et en dernier lieu, l'utilisation possible des clones bovins pour la sélection, non seulement par la diffusion du progrès génétique, mais également et peut être surtout, par leur contribution à la création de ce progrès.

Toutefois, c'est sans doute par l'association nouvelle du clonage avec une autre technique, la transgénèse, aboutissant à la production en quantité importante d'animaux transgéniques, que le clonage des bovins suscite le plus d'espoirs : car, si la production en grandes quantités par des vaches transgéniques de protéines à usage pharmaceutique et médical constitue en effet le véritable enjeu financier de cette combinatoire, d'autres champs d'applications peuvent être raisonnablement approchés, comme par exemple la création de modèles animaux de maladies humaines, ou encore la production de cellules différenciées pour la thérapie cellulaire.

Mais aussi séduisantes soit-elles, les diverses applications potentielles du clonage chez les bovins connaissent quelques limites. En sélection par exemple, ces limites sont inhérentes à la structure même de l'élevage bovin actuel. Dans un autre domaine, les rendements encore insuffisants de la technique constituent, là aussi, une limite à l'utilisation commerciale à grande échelle des clones bovins. Enfin, les craintes manifestées par le grand public à l'encontre du clonage, voire dans certains cas, les pressions exercées par les associations de consommateurs constituent autant d'obstacles à la concrétisation au quotidien de certains projets ambitieux que le clonage des bovins a permis d'appréhender.

L'avenir scientifique du clonage dépend inexorablement des investissements importants consentis par certaines firmes privées qui parient sur ses applications futures : il nous est alors apparu inévitable d'envisager le contexte économique très particulier dans lequel s'inscrivent les recherches sur le clonage.

Pour finir, afin de mieux comprendre les récentes dispositions légales prises à l'encontre du clonage par de nombreux pays, dont la France, nous terminerons ce travail en posant les bases du débat social, éthique et politique relatif au rôle et à l'utilisation de cette technologie en recherche biologique, en agriculture et en médecine.

I. LA TECHNIQUE DE CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS

A. FONDEMENT THEORIQUE DE LA TECHNIQUE DE CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE (figure 1)

L'objectif premier de la procédure de clonage par transfert nucléaire est de produire des groupes d'animaux possédant les mêmes gènes nucléaires.

Pour cela, on réalise la greffe de noyaux « donneurs » provenant de différentes sources cellulaires (pour l'essentiel, des blastomères isolés d'embryons à des stades préimplantatoires ou des cellules en culture) dans toute une série d'ovocytes matures appelés « receveurs » qui, au préalable, ont été énucléés, c'est-à-dire débarrassés de leur propre génome (27, 28, 29, 30, 41, 52, 53, 54). Sachant que les noyaux des blastomères d'un même embryon, au même titre que les noyaux des cellules d'une même culture, sont tous porteurs de la même information génétique, les œufs ainsi reconstitués possèdent tous les mêmes caractéristiques génétiques nucléaires (27, 28, 29, 30, 41). Après transplantation dans l'utérus de femelles receveuses, et au terme de leur développement complet, ces embryons reconstitués seraient donc théoriquement capables de donner naissance à autant de jeunes de la même constitution génétique que de noyaux transférés (12, 28, 47, 48, 49, 57) : cet ensemble d'êtres vivants identiques, possédant tous le même génome nucléaire, constitue un clone.

La totipotence nucléaire définit l'aptitude d'un noyau à induire le développement d'un individu normal, fertile et pouvant assurer sa descendance (12, 27). Lorsqu'après transfert de noyau dans les cytoplasmes d'ovocytes receveurs, on obtient des organismes vivants, on ne fait donc que reproduire expérimentalement cette propriété qui, dans les conditions naturelles, est celle de l'œuf fécondé (12, 41, 45).

B. PROBLEMES A RESOUDRE POUR L'ETABLISSEMENT D'UNE PROCEDURE FIABLE ET EFFICACE DE CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS

Avec l'embryon de mammifère, et notamment de bovin, la réalisation de greffes de noyaux s'est révélée beaucoup plus complexe que chez les vertébrés inférieurs. Si Willadsen obtient en 1986 trois agneaux par transplantation nucléaire, et ce, pour la première fois chez les mammifères, plusieurs difficultés se sont présentées, tant techniques que biologiques (27).

Sans détailler complètement la procédure de clonage par transplantation de noyaux, ce que nous ne manquerons pas de faire par la suite, nous montrons ci-après que la maîtrise globale de cette biotechnologie chez les bovins nécessite non seulement de contrôler certains points critiques bien précis de la technique, mais aussi de répondre à certaines difficultés d'ordre biologique.

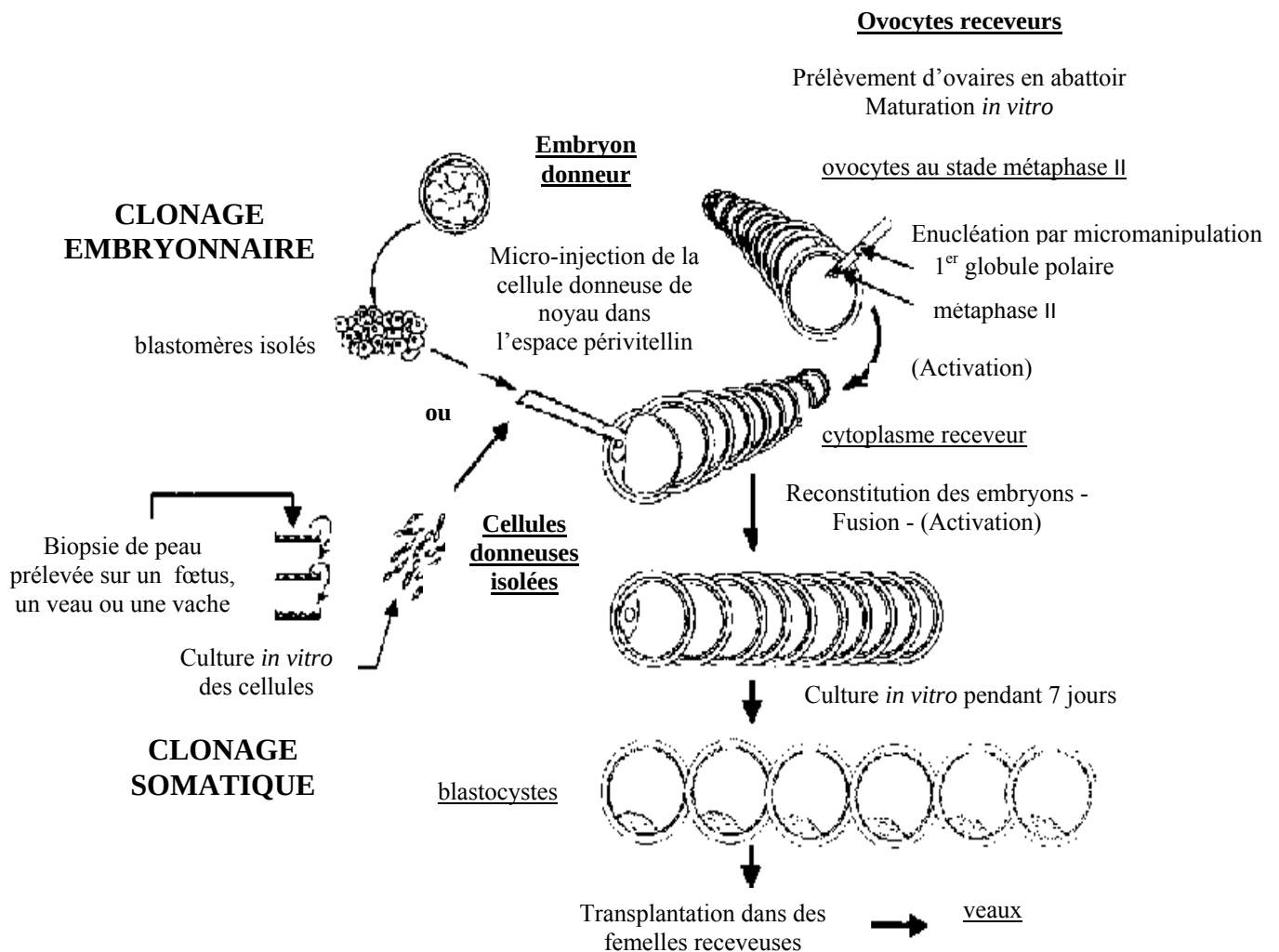


Figure 1 : Principales étapes de la technique de clonage par transfert de noyaux chez les bovins (41, 52, 53)

1. Problèmes d'ordre technique

1.1. Obtention d'un grand nombre d'ovocytes receveurs utilisables pour le transfert nucléaire

1.1.1. Disponibilité en ovocytes receveurs

Pour cloner, il faut disposer au même moment d'une source abondante, et si possible économique, d'ovocytes au stade métaphase II (métaphase de deuxième division réductionnelle de méiose), afin que le stock d'ovocytes disponibles ne constitue pas d'emblée un facteur limitant (28, 29, 30, 53). La solution adoptée consiste en une maturation *in vitro* d'ovocytes ponctionnés sur les ovaires de vaches collectés à l'abattoir, permettant d'amener ceux-ci à un stade où leur cytoplasme est compétent pour la greffe d'un noyau donneur.

1.1.2. Énucléation des ovocytes receveurs

Disposer d'ovocytes compétents en nombre important ne suffit pourtant encore pas. Il faut également pouvoir assurer l'énucléation complète de ces ovocytes, condition nécessaire pour le développement normal des embryons reconstitués par transplantation nucléaire. A ce sujet, Robl et Stice (57) rapportent certaines observations de Willadsen (1986) qui a souligné l'importance d'une énucléation bien accomplie en montrant que, lorsqu'on fusionne des blastomères issus d'un jeune embryon avec des ovocytes non énucléés, les embryons ainsi reconstitués ne forment des blastocystes qu'à un taux très faible et sont, de plus, incapables de se développer à terme après transfert dans une femelle receveuse.

Bien qu'indispensable, l'énucléation des ovocytes bovins est une étape délicate à réaliser. En effet, elle est généralement pratiquée en pénétrant délicatement à l'intérieur de l'ovocyte à l'aide d'une pipette de verre très fine et en aspirant doucement les chromosomes de la métaphase. Or, effectuer des micromanipulations à l'intérieur de cellules de petite taille sans provoquer la rupture de leur membrane plasmique n'est pas chose évidente (27, 28, 41).

Une autre difficulté tient au fait que le cytoplasme de l'ovocyte de ruminant est particulièrement opaque, en raison de sa forte densité en inclusions lipidiques (27, 28, 41, 53). De ce fait, les chromosomes ne sont pas directement visualisables sous le microscope, ce qui rend leur extraction d'autant plus difficile.

Il conviendra donc de remédier à ces obstacles pour l'établissement d'une technique d'énucléation efficace.

1.2. Fusion des membranes de l'ovocyte receveur et de la cellule donneuse

Pour faire pénétrer un noyau étranger dans le cytoplasme d'un ovocyte énucléé, il est nécessaire de faire fusionner les membranes plasmiques de la cellule donneuse et de l'ovocyte receveur. Or, d'après Robl et Stice (57), Prather *et al.* (1987) ont montré que le potentiel de fusion des ovocytes diminue lorsqu'ils subissent une période de maturation *in vitro*. L'utilisation d'ovocytes maturés *in vitro* pour la transplantation de noyaux impliquera donc d'induire, soit par des méthodes virales de fusion, soit surtout par des stimulations électriques, la fusion des deux cellules, donneuse et receveuse.

1.3. Activation des ovocytes receveurs

L'activation est une étape indispensable pour le clonage par transplantation de noyaux, Czolowska *et al.* (1984), cités par Heyman *et al.* (28), ayant constaté qu'un noyau exogène placé dans un ovocyte énucléé est incapable de synthétiser ultérieurement de l'ADN si l'ovocyte n'est pas activé.

Lors du processus normal de fécondation, l'activation de l'ovocyte est déclenchée par la pénétration du spermatozoïde (27, 28, 30, 41, 47). Mais puisque, selon Heyman *et al.* (29), Ware *et al.* (1989) ont observé que l'ovocyte de bovin est particulièrement difficile à activer en l'absence de fécondation, il importera de savoir reproduire artificiellement la cascade d'événements induite par la pénétration naturelle du spermatozoïde afin de permettre au noyau donneur, placé dans un environnement cytoplasmique adéquat, de reprendre le développement embryonnaire.

1.4. Culture des embryons reconstitués par transfert nucléaire

Chez la vache, lors de clonage par transplantation nucléaire, seuls les embryons parvenus au stade morula tardive ou blastocyste précoce peuvent être définitivement transplantés dans l'utérus de femelles receveuses (57). Pour y parvenir, le système le moins coûteux, et le moins contraignant en terme de manipulations, consiste à assurer le développement *in vitro* des embryons reconstitués par transfert nucléaire jusqu'à ces stades compatibles avec une implantation intra-utérine. Cependant, lors de sa culture *in vitro* depuis le stade unicellulaire jusqu'au stade blastocyste, l'embryon bovin présente une phase de blocage au stade 8-16 cellules, correspondant à la mise en route du génome embryonnaire (qui devient transcriptionnellement actif), et qui se traduit par un arrêt du développement (27, 28, 29, 30, 41, 53). Cette phase de blocage n'existant pas *in vivo* (27, 29, 41), il serait utile de comprendre comment l'environnement de l'oviducte maternel participe favorablement au développement embryonnaire, afin d'améliorer les systèmes de culture *in vitro* et de pouvoir ainsi obtenir, avec un bon rendement, des blastocystes de qualité (19).

1.5. Variabilité des résultats

Dès les débuts du clonage chez les bovins, l'analyse des résultats publiés a révélé une grande variabilité, non seulement dans les taux de développement *in vitro* des embryons reconstitués, mais aussi dans les taux de développement à terme de ces embryons après transfert chez des receveuses (16, 41).

De même, certaines étapes de la procédure globale de clonage par transplantation nucléaire, comme par exemple la fusion entre les cellules donneuse et receveuse, ou encore l'activation de l'ovocyte receveur, présentent également des taux de réussite très inconstants qui seraient attribuables à des différences entre groupes d'ovocytes (57).

La variabilité des résultats représente un obstacle important pour d'éventuelles applications pratiques de cette technologie du clonage, notamment dans le cadre d'un programme génétique de sélection des bovins (12, 27, 41). Accroître l'homogénéité de la réponse constitue donc un défi majeur à surmonter.

2. Problèmes d'ordre biologique

Les rendements actuels du clonage par transfert de noyaux des bovins, malgré quelques résultats spectaculaires, sont assez bas. En effet, lors de clonage à partir de noyaux embryonnaires non cultivés, seulement 3 à 10% des embryons reconstitués sont capables de

se développer à terme (27, 28, 30, 50, 53, 54, 61), et l'efficacité globale de la procédure s'avère bien plus faible encore lorsqu'on utilise des cellules en culture comme cellules donneuses de noyaux, avec des taux de naissances cette fois compris entre 0,3% et 2% (13, 42, 51, 52, 55, 56, 65).

D'autre part, à la naissance, les veaux clonés présentent souvent des anomalies physiques et/ou physiologiques, entraînant généralement de faibles taux de survie (13, 42, 52, 63).

Bien évidemment, ces déficiences limitent fortement l'impact potentiel de cette technique chez les bovins. Cependant, pour de nombreux spécialistes, des recherches à caractère fondamental devraient permettre d'améliorer la situation (15, 30, 53, 54). Entre autres, il s'agit de comprendre comment peut s'effectuer la reprogrammation des noyaux transférés, afin d'aboutir à une définition de la meilleure adéquation possible entre cytoplasme receveur et noyau donneur. A cet effet, la synchronisation des cycles cellulaires des cellules donneuse et receveuse paraît constituer l'un des points les plus importants à maîtriser (22, 47 ; voir plus loin).

D'autres éléments nécessitent toutefois d'être mieux contrôlés. Ainsi, une meilleure connaissance des événements fondamentaux impliqués lors de la différenciation cellulaire reste à acquérir, puisque l'influence de l'état différencié de la cellule donneuse sur la reprogrammation correcte du noyau transféré ne fait plus aucun doute (22).

Ces formulations plutôt vagues traduisent bien le faible niveau de compréhension de l'influence de certains points de la biologie fondamentale sur le bon déroulement du transfert nucléaire. Toutefois, on ne saurait vraiment être complet sans évoquer également le rôle joué par d'autres facteurs tels que les conditions de culture des ovocytes (35) ou des cellules donneuses avant la transplantation nucléaire (55), les qualités intrinsèques respectives des ovocytes et des cellules donneuses (origine, âge, taille) (1, 75, 76), et enfin, les conditions du développement *in vitro* des embryons reconstitués précédant leur transfert définitif dans l'utérus de receveuses (35).

C. ETUDE DE LA TECHNIQUE DE CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS A PARTIR DE L'EXEMPLE DU CLONAGE EMBRYONNAIRE

Chez les mammifères, le clonage par transplantation de noyaux ne s'est pas imposé d'emblée comme une méthode définitivement figée. En effet, depuis les premiers travaux de Willadsen (1986) jusqu'aux succès très récents du clonage somatique, de nombreuses équipes ont tour à tour contribué à faire progresser la procédure, l'évolution ayant été à la fois le résultat d'améliorations techniques (maturation *in vitro* des ovocytes, micromanipulations, culture *in vitro*) et d'études fondamentales (31, 34, 42, 47).

Si nous exploitons l'exemple du clonage embryonnaire pour présenter les différentes étapes de cette technique appliquée aux bovins, c'est d'abord parce que, jusqu'à Dolly, les animaux clonés étaient, pour l'essentiel, obtenus à partir de cellules embryonnaires indifférenciées, mais aussi parce que, hormis quelques spécificités, le clonage embryonnaire représente une bonne approche d'une procédure générale de clonage par transfert de noyaux.

L'ensemble de la procédure technique de clonage embryonnaire comprend donc, chez les bovins, les étapes suivantes (27, 28, 41) (figure 2) :

1. Obtention d'un grand nombre d'ovocytes destinés à recevoir les noyaux (ovocytes receveurs), et leur énucléation.
2. Isolement des cellules de l'embryon donneur de noyaux.
3. Reconstitution en série d'embryons à une cellule (fusion - activation).
4. Culture *in vitro* des embryons reconstitués jusqu'au stade blastocyste.
5. Transplantation de ces embryons dans l'utérus de vaches receveuses synchronisées.

Ci-après, nous ne manquerons pas de constater que la plupart de ces étapes sont en réalité un concentré d'une série de sous-étapes, nécessitant chacune de multiples choix concernant par exemple le moment exact de chaque intervention, la composition d'un milieu de culture donné, la succession des gestes de l'expérimentateur, ou encore les instruments utilisés (47).

1. Préparation des ovocytes receveurs

Pour le transfert nucléaire, on utilise des ovocytes mûrs qui, en l'absence de fécondation ou d'activation, sont normalement arrêtés au stade métaphase II de la méiose, stade où leur cytoplasme est compétent normalement pour la fécondation et ici, pour la greffe d'un noyau étranger (28, 30, 47).

Dans les conditions naturelles, cette phase de métaphase II est celle où les ovocytes se trouvent au moment de l'ovulation (30, 47). Les ovocytes employés lors du clonage des bovins peuvent donc être prélevés *in vivo* juste après l'ovulation. Mais nous allons voir qu'ils peuvent aussi être obtenus par maturation *in vitro*. Dans tous les cas, ils ne nécessitent pas de provenir de vaches de haute valeur génétique (28, 57).

1.1. Maturation *in vitro* des ovocytes receveurs

1.1.1. Méthode

Chez les bovins, lors des premières expérimentations de clonage par transplantation de noyaux, les ovocytes étaient recueillis *in vivo* après un traitement de superovulation de génisses ou de vaches qui devaient être abattues dans les quelques heures qui suivaient l'ovulation, et dont on perfusait les oviductes. La récupération post-mortem des ovocytes à partir des oviductes avait alors lieu environ 36 heures après le début des chaleurs, soit 8 à 12 heures après l'ovulation (28, 29, 41, 53, 57).

Ces méthodes ont été rapidement abandonnées parce que, même si la qualité des ovocytes ainsi obtenus était optimale, leur maturation ayant eu lieu *in vivo*, elles étaient très onéreuses en raison des limites de la superovulation et de la nécessité de l'abattage des animaux, et leur réalisation demandait par ailleurs beaucoup de temps (42, 57).

Depuis, il a été montré que des cytoplasmes préparés à partir d'ovocytes sélectionnés et maturés *in vitro* peuvent être tout aussi compétents que des cytoplasmes préparés à partir d'ovocytes maturés *in vivo* pour assurer le développement à terme d'embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux (1). Et si, initialement, les ovocytes étaient produits *in vivo*, les progrès réalisés au niveau des recherches sur la maturation et la fécondation *in vitro* chez les bovins permettent désormais de produire entièrement *in vitro* des ovocytes receveurs en grand nombre (plusieurs centaines) et à un coût très réduit, tout en contrôlant étroitement leur maturité (2, 27, 29, 41, 57).

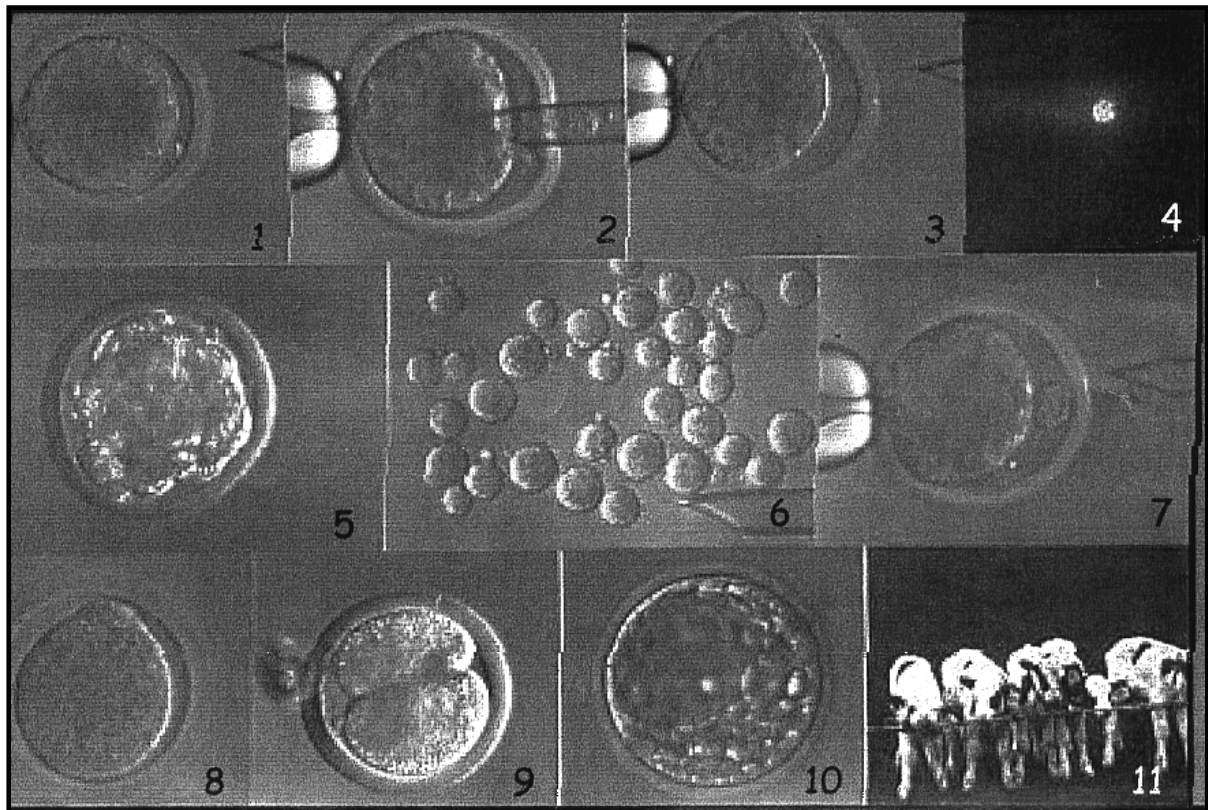


Figure 2 : Principales étapes de la technique de clonage par transplantation nucléaire utilisée chez les bovins : exemple du clonage embryonnaire (12, 27)

1. Ovocyte de vache obtenu par maturation *in vitro*.
2. Enucléation de l'ovocyte par micromanipulation.
3. Ovocyte énucléé ou cytoplasme receveur.
4. Contrôle de l'enucléation : chromosomes de la plaque métaphasique fluorescents dans la micropipette.
5. Embryon donneur au stade morula.
6. Groupe de cellules (ou blastomères) issu de cet embryon.
7. Reconstitution d'un embryon par micromanipulation à partir d'un blastomère et du cytoplasme receveur.
8. Fusion des membranes et obtention d'un embryon de stade 1 cellule.
9. Embryon cloné après 24 heures de culture (stade 2 cellules).
10. Embryon cloné après 7 jours de culture (stade blastocyste).
11. Clone de cinq veaux mâles issu du même embryon donneur.

En pratique, les ovaires de vaches de réforme sont récupérés à l'abattoir et transportés jusqu'au laboratoire dans une solution saline dont la température est, selon les équipes, maintenue entre 20°C et 38,5°C (12, 13, 30, 36, 41, 42, 47, 53, 62, 72). Les ovocytes sont alors ponctionnés de façon aseptique depuis des follicules à antrum de 1 à 10 mm de diamètre sous forme de complexes cumulus-ovocytes (1, 3, 14, 19, 27, 29, 36, 41). Seuls les complexes présentant un important espace périvitellin, des couches de cellules du cumulus assez nombreuses et intactes, ainsi qu'un cytoplasme ovocytaire homogène, sont sélectionnés pour subir une maturation *in vitro* (1, 14, 19, 36).

La maturation *in vitro* proprement dite reprend les protocoles de maturation utilisés durant la fécondation *in vitro* dans l'espèce bovine (12, 27, 41, 64) : les complexes cumulus-ovocytes sélectionnés sont cultivés *in vitro* pendant 22 à 24 heures à 38,5°C ou 39°C sur des monocouches de cellules de granulosa, dans un milieu M199 généralement supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal, 5 µg/mL de FSH (follicle stimulating hormone) bovine, 5 µg/mL de LH (luteinising hormone) bovine, 1 µg/mL d'œstradiol 17β, et des antibiotiques (100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine), l'ensemble étant placé dans une atmosphère saturée en eau contenant 5% de CO₂ dans l'air (1, 3, 14, 19, 27, 29, 36, 41, 44).

A l'issue de cette période de maturation *in vitro*, plus de 90% des ovocytes ont atteint le stade métaphase II et peuvent donc être utilisés en grand nombre pour préparer des cytoplasmes receveurs (27, 29, 41).

1.1.2. Qualité sanitaire des ovocytes maturés *in vitro*

Lorsqu'on utilise le transfert nucléaire, il est impératif de se préoccuper des risques éventuels de contamination des embryons clonés. Et dans cette optique, il convient de faire spécialement attention aux conditions sanitaires de la maturation *in vitro* des ovocytes.

A ce sujet, Thibier et Guérin (64) rapportent trois études françaises traitant des possibles infections, par divers agents pathogènes, d'ovocytes utilisés lors d'un protocole de fécondation *in vitro* (FIV). Etant donné que les différentes étapes de la maturation *in vitro* des ovocytes sont semblables, lors d'une procédure de fécondation *in vitro* ou bien lors d'un protocole de transplantation de noyaux, il nous est apparu intéressant, dans le cadre de notre travail, de relater les conclusions de ces recherches.

La première de ces études (Guérin *et al.*, 1988) montre que des prélèvements d'ovocytes de vaches tout venant, mais dont certaines étaient éliminées dans le cadre des programmes nationaux prophylactiques (brucellose et leucose bovine enzootique), pouvaient être effectués sans que les agents pathogènes ne contaminent les ovocytes ou les liquides folliculaires.

Dans la seconde investigation (Guérin *et al.*, 1989) portant sur des ovocytes prélevés sur des vaches expérimentalement contaminées par le virus de l'IBR (infectious bovine rhinotracheitis), et en phase aiguë de l'infection, il a été montré qu'en fonction du statut infectieux de l'appareil génital (ovaires, liquides folliculaires et oviductes) de ces femelles, le virus pouvait être retrouvé dans les ovocytes et le milieu de maturation (tableau 1).

Tableau 1 : Contamination des ovocytes et des milieux de maturation des ovocytes en fonction du statut infectieux de l'appareil génital de vaches donneuses expérimentalement infectées par le virus de l'IBR (64)

Présence du virus (nombre d'animaux positifs)		
Catégories	Ovocytes	Milieu de maturation
A (n = 5)	4	5
B (n = 2)	1	2
C (n = 1)	0	0
D (n = 1)	0	0

n : nombre de vaches ; A : vaches dont les ovaires et les oviductes sont contaminés ; B : vaches dont seuls les ovaires sont contaminés ; C : vache dont les ovaires (sauf le liquide folliculaire) et les oviductes sont contaminés ; D : vache non contaminée.

La dernière publication (Guérin *et al.*, 1990) ouvre, quant à elle, bien d'autres perspectives, car elle tend à démontrer qu'après contamination d'ovocytes au cours de leur maturation *in vitro* par le virus de l'IBR, le virus se trouve encore présent après neuf ou dix lavages. De plus, l'aptitude au développement des ovocytes infectés est inférieure.

Cependant, le risque de contamination d'un lot d'ovocytes par une vache en phase aiguë d'infection par le virus de l'IBR est extrêmement faible. Et en pratique, les équipes réalisant la maturation *in vitro* n'effectuent pas de contrôle sanitaire sur les vaches abattues dont les ovaires sont collectés. En France, les Directions des Services Vétérinaires imposent toutefois la destruction des ovaires et des ovocytes si un des animaux abattus se révèle positif au test de détection de l'ESB (encéphalopathie spongiforme bovine). La législation n'impose, quant à elle, que des contrôles virologiques (IBR - BVD (bovine viral diarrhoea)) et bactériologiques annuels sur les milieux de maturation qui sont collectés et congelés lors de chaque maturation *in vitro* (Chastant, communication personnelle).

1.2. Enucléation des ovocytes receveurs

Même si les ovocytes obtenus par maturation *in vitro* se trouvent au stade métaphase II, ils ne sont pas pour autant compétents pour la transplantation nucléaire : ils doivent encore être énucléés (57).

Ainsi que nous l'avons évoqué précédemment, il est très difficile d'effectuer l'enucléation des ovocytes bovins par micromanipulation sans provoquer de lyse cellulaire.

Pour éviter ceci, McGrath et Solter (cités par 28, 34, 41, 48, 49, 53, 54, 55, 61) ont mis au point, en 1983, à l'occasion de travaux menés sur des souris, un procédé permettant de rendre les techniques d'enucléation plus efficaces. Ces derniers ont en effet montré qu'en traitant, préalablement à l'enucléation, les ovocytes avec des drogues telles que la cytochalasine B ou la colchicine, qui inhibent la polymérisation des microfilaments d'actine et des microtubules

du cytosquelette de la cellule, on pouvait assouplir suffisamment la membrane plasmique de façon à aspirer directement le noyau à l'intérieur d'une petite vésicule de cytoplasme, sans provoquer de rupture des cellules. C'est cette approche qui est actuellement communément utilisée chez les bovins.

L'autre difficulté de l'énucléation est liée, comme nous l'avons également signalé auparavant, à la grande opacité du cytoplasme de l'ovocyte de vache.

De ce fait, l'extraction des chromosomes était initialement réalisée « en aveugle » (41, 57). Le principe de l'aspiration « en aveugle » repose sur le constat que les chromosomes de l'ovocyte bovin au stade métaphase II sont disposés suivant une plaque située à proximité du globule polaire : en introduisant la pipette d'extraction au voisinage de ce globule polaire, et en aspirant la portion de cytoplasme adjacente, un expérimentateur confirmé est donc théoriquement capable de procéder à une énucléation complète de l'ovocyte.

En théorie seulement, car d'une part, il arrive que le globule polaire dégénère ou migre loin des chromosomes, et d'autre part, à mesure que les ovocytes vieillissent, les chromosomes ont tendance à migrer vers le centre de l'ovocyte, loin du globule polaire (57). Dans ces conditions, les repères pour une intervention « en aveugle » sont donc modifiés, et du coup, l'énucléation des ovocytes n'est pas toujours bien accomplie puisque, par cette procédure, on considère que la proportion d'ovocytes effectivement énucléée ne dépasse pas 60% (41).

Or, l'énucléation complète des ovocytes étant indispensable pour le développement des embryons issus de transplantation de noyaux, une autre technique, développée au laboratoire par Chesné *et al.* (13), est aujourd'hui adoptée : les ovocytes sont incubés en présence d'un fluorochrome spécifique de l'ADN à faible concentration (marqueur bisbenzimidazole Hoechst 33342). Les ovocytes sont ensuite soumis à une faible excitation dans l'ultraviolet et une amplification du signal émis par une caméra à basse énergie ; il est alors possible de visualiser, avec un microscope équipé en épifluorescence, les chromosomes de la plaque métaphasique. De cette façon, on peut directement contrôler la présence des chromosomes dans la pipette d'aspiration et avoir une fiabilité de l'énucléation des ovocytes proche de 100% (27, 28, 36, 41, 48, 53). De plus, cette méthode n'altère en rien la viabilité des cellules, ce qui est essentiel (28, 29, 41).

Au total, la procédure complète d'énucléation est la suivante : les ovocytes obtenus par maturation *in vitro* sont d'abord débarrassés de leurs cellules péri-ovocytaires par un traitement enzymatique à la hyaluronidase (0,5 mg/mL) associé à une aspiration répétée dans une pipette calibrée au diamètre ovocyttaire (3, 28, 36, 41, 65). Les ovocytes sont ensuite incubés, pendant 10 à 15 minutes, en présence de cytochalasine B à une concentration variant entre 5 et 7,5 µg/mL (3, 12, 18, 28, 29, 44), et pendant 15 à 30 minutes, en présence de bisbenzimidazole (Hoechst 33342) à une concentration comprise entre 0,5 et 3 µg/mL (12, 13, 14, 29, 41, 62, 65).

L'énucléation proprement dite peut donc commencer : pour cela, chaque ovocyte est immobilisé par une micropipette de maintien dans la chambre de manipulation d'un microscope inversé (28, 48). Cette micropipette exerce une aspiration permanente. Une seconde micropipette spécialement biseautée, fixée sur un micromanipulateur, vient alors percer la zone pellucide de l'ovocyte et aspirer le globule polaire ainsi qu'une fraction de cytoplasme adjacent contenant les chromosomes de la métaphase. Le contenu de la pipette est ensuite contrôlé sous fluorescence : on doit y trouver la plaque métaphasique et le noyau du globule polaire (3, 14, 28, 36, 57, 62).

En pratiquant de la sorte, on estime que le taux d'énucléation des ovocytes est supérieur à 95%, les 5% restants étant lysés lors du processus d'énucléation lorsque les configurations de la métaphase et du globule polaire ne permettent pas leur extraction (53).

1.3. Pré-activation des ovocytes receveurs

Parmi les progrès importants réalisés dans la préparation des cytoplasmes receveurs, il faut souligner la mise au point, par l'INRA, d'une méthode originale de pré-activation des ovocytes énucléés (13). Ce traitement associe une période de « vieillissement » *in vitro* des ovocytes énucléés (correspondant à une remise en culture des cytoplasmes ovocytaires pendant une dizaine d'heures) à un refroidissement à + 10°C avant d'introduire le noyau donneur.

Pour Gall *et al.* (1996), cités par (27, 65), ce procédé permet de disposer de cytoplasmes receveurs en tout début d'interphase avec une activité MPF (maturation promoting factor) fortement diminuée. L'état du cytoplasme receveur au moment de la fusion avec un noyau exogène étant déterminant pour le remodelage de la chromatine de ce noyau, cette faible activité MPF s'avérerait favorable au développement des embryons reconstitués, car elle permettrait de limiter les risques liés à la condensation prématurée de la chromatine (1, 8).

1.4. Congélation des ovocytes receveurs

La possibilité de stocker à l'état congelé les ovocytes receveurs serait d'un grand intérêt pratique pour le transfert nucléaire, permettant d'accroître encore leur disponibilité (28, 36).

Seulement, jusqu'à présent, malgré les efforts de nombreux groupes de recherche, peu de résultats ont pu être obtenus chez les bovins à partir d'ovocytes préalablement conservés dans l'azote liquide (36). Une étude conduite par Kubota *et al.* (36) suscite toutefois quelques espoirs, et en cela, mérite d'être relatée :

Matériels et méthodes

Dans leur expérience, les auteurs soumettent des ovocytes bovins récupérés sur des ovaires d'abattoir à un protocole de cryoconservation, soit immédiatement après leur prélèvement (groupe d'ovocytes immatures, dénommé GV ; voir page suivante), soit après une période de maturation *in vitro* de 22 heures (groupe d'ovocytes maturés, dénommé MII ; voir page suivante), soit enfin après leur énucléation (groupe d'ovocytes maturés et énucléés, dénommé MIIe). Le milieu de cryoconservation comprend 5% d'éthylène glycol, 6% de 1,2-propanediol et 0,1 mol/L de saccharose, l'ensemble étant dilué dans du PBS (phosphate buffered saline) supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal : les ovocytes y sont déposés par lots de vingt avant d'être transférés dans des paillettes d'une contenance de 0,25 mL chacune. Ces paillettes sont ensuite placées dans la chambre de refroidissement d'un réfrigérateur à alcool et refroidies de 0°C à - 6,5°C à une moyenne de 1°C/min. Elles sont maintenues à cette température pendant dix minutes, puis à nouveau refroidies jusqu'à - 30°C à raison de 0,3°C/min, et finalement immergées dans l'azote liquide où elles demeurent pendant au moins 7 jours.

Au moment voulu, la décongélation des paillettes est d'abord effectuée pendant 5 secondes à l'air libre, puis celles-ci sont placées dans un bain à 30°C jusqu'à ce que la glace disparaisse complètement (ce qui demande environ 15 secondes). Après décongélation, les ovocytes sont encore plongés pendant 5 minutes dans un milieu physiologique additionné de 20% de sérum de veau fœtal. Leur viabilité est alors évaluée par l'intégrité de la membrane ovocytaire et de la zone pellucide. Les ovocytes ayant subi avec succès la totalité de cette procédure sont alors soit utilisés dans un protocole de fécondation *in vitro*, soit fusionnés avec les blastomères d'embryons bovins produits *in vitro* et se trouvant au stade 16-32 cellules, les groupes GV et MII subissant toutefois auparavant une maturation *in vitro* et une énucléation (ovocytes immatures), ou simplement une énucléation (ovocytes maturés). Parmi les embryons ainsi

reconstitués, ceux qui atteignent le stade blastocyste après une période de culture *in vitro* de 7 ou 8 jours sont enfin transplantés dans l'utérus de vaches receveuses synchronisées.

Résultats

Le tableau 2 expose les taux, après décongélation, de survie et de maturation complète (avec expulsion d'un globule polaire) d'ovocytes ayant subi le protocole de cryoconservation à l'état immature (groupe GV, pour vésicule germinative) ou mature (groupe MII, pour métaphase II), par rapport à des ovocytes frais.

Tableau 2 : Taux de survie et de maturation, après décongélation, d'ovocytes bovins ayant subi un protocole de cryoconservation à l'état immature (GV) ou mature (MII) (36)

Groupe d'ovocytes	Nombre d'ovocytes (n)	Survie morphologique (%)	Globule polaire expulsé (%) ^a	Pas de globule polaire (%) ^a
GV (congelés)	290	137 (47) ^b	74 (54)	63 (46)
MIl (congelés)	246	178 (72) ^c	100 (56)	78 (44)
Témoins (non congelés)	256	246 (96) ^d	156 (63)	90 (37)

^a Pourcentage calculé sur le nombre d'ovocytes morphologiquement non altérés.

^{b, c, d} Les taux de survie présentant des exposants différents au sein de cette même colonne sont significativement différents (test χ^2 , $P < 0,01$).

Nous pouvons constater que, après cryoconservation et décongélation, les ovocytes maturés du groupe MII présentent un taux de survie morphologique significativement supérieur à celui des ovocytes immatures du groupe GV ($P < 0,01$: 72% vs 47%), le taux de survie le plus élevé étant logiquement atteint avec le lot d'ovocytes témoins ($P < 0,01$: 72% vs 96%). Par contre, quel que soit le groupe d'ovocytes considéré, les taux de maturation des ovocytes morphologiquement non altérés sont tous semblables ($P > 0,05$: 54% à 63%).

Lorsque de tels ovocytes sont utilisés dans le cadre d'une procédure de fécondation *in vitro*, les taux de développement *in vitro* atteints sont significativement inférieurs à ceux obtenus avec des ovocytes frais (tableau 3). Pour tester si ces rendements plus faibles sont plutôt attribuables à des dommages causés par la cryoconservation au cytoplasme ou au noyau ovocytaire, les ovocytes congelés puis décongelés (et morphologiquement viables) des groupes GV, MII et MIII, ainsi que des ovocytes frais, sont inclus dans un protocole de transplantation nucléaire où les cellules donneuses sont les blastomères d'embryons bovins de 5 jours produits *in vitro*.

Ainsi, dans le tableau 4, sont rapportés, par comparaison avec le taux d'énucléation d'ovocytes frais témoins, les taux d'énucléation effective des ovocytes des groupes GV (après maturation *in vitro*) et MII ayant subi avec succès le protocole de cryoconservation-décongélation. Nous notons que le taux d'énucléation des ovocytes du groupe MII est significativement inférieur à ceux des ovocytes des deux autres lots ($P < 0,01$: 61% vs 83% et 87%).

Tableau 3 : Développement, après décongélation et fécondation *in vitro*, d'ovocytes bovins ayant subi un protocole de cryoconservation à l'état immature (GV) ou mature (MII) (36)

Groupe d'ovocytes	Nombre d'ovocytes (n)	Survie morphologique (%)	Clivage (%) ^a	Blastocystes au jour 9 (%) ^a	Nombre de receveuses (n)	Vêlages/gestations (n)
GV (congelés)	310	47 ^b	58 ^b	7 ^b	5	2/3
MIII (congelés)	272	84 ^c	60 ^b	12 ^b	7	2/2
Témoins (non congelés)	265	97 ^d	74 ^c	26 ^c	-	-

^a Pourcentage calculé sur le nombre d'ovocytes morphologiquement non altérés.

^{b, c, d} Les taux de survie, de clivage et de formation des blastocystes présentant des exposants différents au sein d'une même colonne sont significativement différents (test χ^2 , $P < 0,01$).

Tableau 4 : Taux d'énucléation, après décongélation, d'ovocytes bovins ayant subi un protocole de cryoconservation à l'état immature (GV) ou mature (MIII) (36)

Groupe d'ovocytes	Nombre d'ovocytes (n)	Enucléation (%)
GV (congelés)	76	66 (87) ^a
MIII (congelés)	119	73 (61) ^b
Témoins (non congelés)	185	154 (83) ^a

^{a, b} Les taux d'énucléation présentant des exposants différents au sein de cette même colonne sont significativement différents (test χ^2 , $P < 0,01$).

Les taux de développement *in vitro* et *in vivo* des embryons reconstitués par transplantation de noyaux à partir de tels ovocytes sont présentés dans le tableau 5. Après transfert nucléaire donc, si le taux de développement *in vitro* le plus faible est obtenu avec les ovocytes du groupe GV (5%), nous remarquons néanmoins que les ovocytes des groupes MIII et MIIe conduisent à des résultats pratiquement comparables à ceux obtenus avec les ovocytes frais témoins ($P > 0,05$: 14% à 17%). Concernant les taux de développement à terme, lorsque des blastocystes résultant du transfert de noyaux de blastomères dans des ovocytes du groupe GV (trois blastocystes) ou du groupe MIIe (deux blastocystes) ont été transplantés dans des receveuses, aucune gestation n'a été établie. Par contre, le transfert dans trois receveuses des six blastocystes produits à partir des ovocytes du groupe MIII a conduit, après 293 jours de gestation, à la naissance d'un veau femelle de 23,5 kg.

Tableau 5 : Développement, après décongélation et transplantation de noyaux, d'ovocytes bovins ayant subi un protocole de cryoconservation à l'état immature (GV) ou mature (MII et MIIe) (36)

Groupe d'ovocytes	Nombre d'ovocytes (n)	Fusion (%)	Clivage (%) ^a	Blastocystes au jour 9 (%) ^a	Embryons/receveuses (n)	Vêlages/gestations (n)
GV	64	88 ^b	68 ^b	5 ^b	3/2	0
MI	56	88 ^b	90 ^c	16 ^{bc}	6/3	1/1
MIe	86	85 ^b	88 ^c	14 ^{bc}	2/1	0
Témoins	91	84 ^b	78 ^{bc}	17 ^c	21/13	4/4

^a Pourcentage calculé sur le nombre de complexes blastomère-cytoplasme ayant fusionné.

^{b, c} Les taux de fusion, de clivage et de formation des blastocystes présentant des exposants différents au sein d'une même colonne sont significativement différents (test χ^2 , $P < 0,05$).

Les auteurs ont poussé leurs travaux plus loin encore, réalisant des transplantations nucléaires croisées entre des ovocytes maturés MI ayant été soumis à ce procédé de cryoconservation-décongélation et des ovocytes maturés MI frais. Les potentialités de développement *in vitro* des embryons ainsi reconstitués ainsi que celles d'ovocytes témoins activés par parthénogenèse sont retranscrites dans le tableau 6. Nous observons que les taux de développement jusqu'au stade blastocyste des embryons reconstitués par transplantation nucléaire réciproque sont similaires et relativement faibles, qu'on utilise des noyaux congelés ou bien des cytoplasmes congelés ($P > 0,05$: 10% vs 14%). Ces taux sont comparables à celui obtenu après activation par parthénogenèse d'ovocytes témoins congelés (17%). Par contre, l'activation par parthénogenèse d'ovocytes témoins frais conduit à des taux de développement significativement plus élevés ($P < 0,05$: 28% vs 10% à 17%).

Tableau 6 : Développement d'embryons générés par transfert nucléaire réciproque entre des ovocytes bovins maturés ayant subi le protocole de cryoconservation-décongélation et des ovocytes bovins maturés frais (36)

Source de noyaux	Source de cytoplasmes	Nombre « d'œufs » reconstitués ou d'ovocytes témoins (n)	Fusion (%)	Clivage (%) ^a	Blastocystes au jour 9 (%) ^a
Frais	Congelés	103	85 ^b	70 ^{bc}	14 ^b
Congelés	Frais	89	87 ^b	77 ^b	10 ^b
Ovocytes témoins congelés activés par parthénogenèse		78	-	60 ^c	17 ^b
Ovocytes témoins frais activés par parthénogenèse		110	-	66 ^{bc}	28 ^c

^a Pourcentage calculé sur le nombre d'embryons reconstitués ou d'ovocytes témoins activés par parthénogenèse.

^{b, c} Les taux de fusion, de clivage et de formation des blastocystes présentant des exposants différents au sein d'une même colonne sont significativement différents (test χ^2 , $P < 0,05$).

Discussion

D'après Kubota *et al.*, depuis que Lim *et al.* (1991) ont rapporté que des ovocytes bovins maturés ayant été soumis à un protocole de cryoconservation-décongélation étaient capables de se développer jusqu'au stade blastocyste après fécondation *in vitro*, plusieurs équipes ont essayé de congeler des ovocytes bovins. Seulement, les taux de survie des ovocytes soumis à une telle procédure ainsi que les taux de développement de ces ovocytes jusqu'au stade blastocyste après fécondation *in vitro* se sont régulièrement avérés très faibles.

Au contraire, dans cette étude de Kubota *et al.*, des taux relativement élevés de survie des ovocytes, de développement embryonnaire *in vitro* et de développement à terme (après fécondation *in vitro* ou transfert de noyaux) sont atteints après cryoconservation.

Pour plusieurs auteurs (Fuku *et al.*, 1992 ; Lim *et al.*, 1992 ; Aman et Parks, 1994 ; Martino *et al.*, 1996), cités par Kubota *et al.*, les ovocytes bovins sont considérés comme étant très sensibles au refroidissement, et les ovocytes immatures le sont encore plus que ceux maturés.

Les travaux de Kubota *et al.* confirment et complètent ces observations initiales en démontrant notamment, qu'après fécondation *in vitro* ou transplantation de noyaux, les taux de développement les moins importants sont obtenus avec des ovocytes ayant subi un protocole de cryoconservation-décongélation à l'état immature (groupe GV). Malgré cela, les ovocytes immatures ayant été soumis à cette procédure sont capables, au même titre que les ovocytes maturés (groupe MII), de former des blastocystes puis des veaux après fécondation *in vitro* et transfert des embryons ainsi produits dans l'utérus de vaches receveuses.

Les dommages morphologiques les plus fréquemment rencontrés chez des ovocytes soumis à un protocole de cryoconservation-décongélation consistent en des ruptures de la zone pellucide et des lyses de la membrane plasmique ovocytaire. Dans cette expérience toutefois, après cryoconservation, le taux de survie morphologique des ovocytes maturés apparaît important (jusqu'à 84%), et le taux de clivage après fécondation *in vitro* de ces mêmes ovocytes est relativement élevé comparé à celui d'ovocytes témoins (60% vs 74%).

Toujours après cryoconservation et fécondation *in vitro*, le taux de développement de ces ovocytes jusqu'au stade blastocyste est assez bon (12%), bien qu'il demeure significativement plus bas que celui d'ovocytes témoins (26%). Pour Kubota *et al.*, ceci corrobore les constatations de Martino *et al.* (1996) chez les bovins.

Dans cette expérience, le faible développement des embryons reconstitués après réalisation de transferts nucléaires croisés suggère que, à la fois les noyaux et les cytoplasmes ovocytaires doivent avoir subi des dommages importants suite à la procédure de cryoconservation-décongélation. Mais étonnamment, des taux comparables de développement jusqu'au stade blastocyste sont obtenus après transfert de noyaux provenant des mêmes embryons donneurs dans des ovocytes énucléés frais ou préalablement congelés et dégelés (17% vs 16%) : la compétence moyenne des ovocytes congelés pour les premières étapes du développement embryonnaire serait donc plutôt due à des dommages affectant le noyau durant la cryoconservation. Cela ne signifie pas pour autant que le cytoplasme ovocytaire ne subit pas d'altérations morphologiques au cours de la cryoconservation. En effet, dans la mesure où la transplantation dans des receveuses de 11 embryons clonés dérivant d'ovocytes congelés ne fournit qu'un seul veau contre quatre pour les 21 embryons clonés dérivant d'ovocytes frais (tableau 5), on peut supposer que les dommages affectant le cytoplasme ovocytaire durant la cryoconservation se manifestent, au cours du développement, plus tardivement que ceux affectant le noyau.

Dans cette étude, le taux d'énucléation effectif des ovocytes congelés au stade MII est plus bas que celui des ovocytes congelés au stade GV, bien que le groupe MII présente un taux de survie morphologique supérieur à celui du groupe GV. Selon Kubota *et al.*, cette faible efficacité de l'énucléation des ovocytes congelés au stade MII serait certainement liée à une fragmentation du globule polaire ainsi qu'à une migration de la plaque métaphasique jusque vers le centre de l'ovocyte durant la cryoconservation.

Quel que soit le groupe d'ovocytes considéré, les taux de fusion observés après transfert nucléaire apparaissent similaires, mais le taux de développement jusqu'au stade blastocyste des embryons reconstitués à partir d'ovocytes congelés à l'état immature s'avère significativement plus faible que celui des embryons reconstitués à partir d'ovocytes congelés à l'état mature.

Enfin, le fait de pratiquer l'énucléation des ovocytes maturés juste avant leur congélation ne se traduit par aucun bénéfice pour le développement. Or, plus que toute autre perspective, il semble bien, du fait de la relative facilité et de la grande efficacité de l'énucléation des ovocytes frais, que c'est la cryoconservation des ovocytes énucléés qui offre le plus grand intérêt pratique pour l'application en routine de la technique de transplantation de noyaux à partir d'ovocytes congelés.

En conclusion, les données de ces travaux de Kubota *et al.* (1998) démontrent que la cryoconservation des ovocytes à un stade immature (groupe GV) compromet la capacité de l'ovocyte à supporter un développement après fécondation *in vitro* ou transplantation nucléaire. Par contre, l'utilisation d'ovocytes ayant subi la cryoconservation à des stades matures, avant ou après énucléation, conduit à des taux de développement identiques à ceux observés avec des ovocytes frais.

Nous retiendrons ensuite que les altérations morphologiques engendrées par la cryoconservation affectent simultanément le noyau et le cytoplasme des ovocytes soumis à cette procédure.

Toutefois, le fait que des gestations aient pu être initiées et que des veaux aient été obtenus en employant (lors de transplantation de noyaux ou lors de fécondation *in vitro*) des ovocytes préalablement congelés laisse espérer que la cryoconservation des ovocytes sera, chez les bovins au moins, bientôt pratiquée à grande échelle à l'occasion des expériences de clonage par transfert nucléaire.

2. Préparation des cellules donneuses

Par cellule donneuse, on désigne la cellule qui contient le noyau donneur. Dans le cas du clonage embryonnaire, les cellules donneuses, encore appelées blastomères, proviennent d'embryons donneurs pouvant se trouver à différents stades préimplantatoires. Parallèlement à la préparation des ovocytes receveurs, il convient donc de dissocier et d'isoler les cellules d'un embryon donneur de noyaux.

2.1. Origine de l'embryon donneur

Contrairement aux ovocytes, les embryons donneurs proviennent de vaches de très haute valeur génétique inséminées avec le sperme de taureaux d'élite (47, 57). Ils sont généralement prélevés 5 à 6 jours après insémination, par les techniques désormais classiques de collecte d'embryons (12, 27, 41, 72) : ils se trouvent alors au stade morula précompacte ou compacte et possèdent, selon le délai post-fécondation, de 16 à 70 cellules non différenciées mais déjà adhérentes les unes aux autres (6, 27, 28, 41, 52, 53, 54).

Une grande disponibilité en embryons donneurs serait très utile pour la production de masse d'embryons par clonage (36). Dans cette optique, il est d'abord possible de faire préalablement subir aux vaches donneuses d'embryons un protocole de superovulation, les embryons étant ensuite récupérés comme précédemment décrit (1, 12).

Mais un autre moyen consiste à utiliser les techniques de fécondation *in vitro* pour produire entièrement *in vitro* les embryons donneurs (3, 14, 36, 41, 44, 47).

2.2. Isolement des cellules donneuses

Juste avant l'étape de transfert de noyaux proprement dite, l'embryon donneur est soigneusement dénudé de sa zone pellucide par un traitement enzymatique à la pronase ou bien par une dissolution limitée dans une solution acidifiée (3, 12, 27, 28, 41, 44).

Il convient alors de procéder à l'isolement des blastomères de l'embryon donneur. Cette opération n'est cependant pas sans poser quelques problèmes. En effet, il faut rappeler qu'au stade morula, les embryons sont constitués de cellules qui ont déjà commencé d'établir entre elles des relations intercellulaires structurales et fonctionnelles (gap-jonctions par exemple), et en conséquence, leur isolement s'avère très délicat (27, 28, 41, 57).

Pour permettre une dissociation sans lésions des blastomères de l'embryon donneur à l'aide d'une pipette de verre calibrée et rodée, la « grappe » de cellules de l'embryon débarrassé de sa zone pellucide est alors incubée pendant 15 à 30 minutes à 39°C dans un milieu dépourvu de calcium (12, 28, 42, 45, 48, 55). L'absence d'ions calcium dans le milieu permet en effet de déstabiliser les jonctions cellulaires d'un embryon au stade morula (27, 41,

47), et il devient donc possible, par pipetage, de séparer avec une grande efficacité les blastomères de l'embryon donneur.

L'isolement étant effectué, il importe de pouvoir introduire dans les meilleurs délais chaque blastomère sous la zone pellucide d'un ovocyte receveur énucléé (28). Si le transfert n'est pas réalisé immédiatement, les blastomères peuvent alors être conservés dans une microgoutte de milieu de culture M199 en attendant d'être utilisés pour la transplantation nucléaire 2 à 4 heures plus tard (12, 41). Il est également possible de les réfrigérer pour l'intervalle de temps entre la dissociation de l'embryon et le transfert des blastomères (28).

2.3. Congélation de l'embryon donneur

Actuellement, toutes les opérations de sélection à grande échelle menées dans l'espèce bovine font largement appel à la congélation (15). Travailler avec des embryons donneurs congelés permettrait donc d'anticiper les futures applications éventuelles du clonage en sélection, qui se feront à partir d'animaux de très haute valeur génétique dont les embryons sont déjà aujourd'hui commercialisés après stockage et transport dans l'azote liquide (30).

Cependant, d'une part, d'après Renard et Heyman (53), Bondioli (1991) a montré que la perte de blastomères est importante après décongélation de jeunes morulae dans l'espèce bovine. D'autre part, les rendements de la technique de clonage par transplantation de noyaux sont encore très faibles lorsque sont utilisés comme donneurs de noyaux des embryons préalablement congelés, puisque, dans ces conditions, seulement 7% des embryons reconstitués après fusion sont capables de se développer normalement *in vitro* jusqu'au stade blastocyste (contre 30% en partant d'un embryon donneur non congelé) (27, 29, 41) : ceci est une contrainte sur le plan pratique, car il faut pouvoir disposer au moment du clonage de morulae fraîchement récoltées sur la vache d'élite sélectionnée comme donneuse d'embryons ou de morulae fraîchement produites *in vitro*.

Du fait de ces difficultés, Le Bourhis *et al.* (1995), cités par plusieurs auteurs (27, 29, 41), proposent une alternative temporaire à la congélation : cette solution consiste à refroidir les embryons donneurs à 10-15°C, ce qui permet de les conserver pendant 24 heures sans diminution de viabilité, et donc de cloner des embryons prélevés sur des vaches appartenant à des élevages relativement éloignés du laboratoire.

3. Reconstitution en série d'embryons par transfert nucléaire

3.1. Insertion du blastomère sous la zone pellucide

La reconstitution consiste à associer, par micromanipulation, chaque cellule isolée de l'embryon donneur avec un ovocyte receveur préalablement énucléé, et à faire pénétrer le noyau embryonnaire dans son nouvel environnement cytoplasmique par fusion cellulaire (27, 42). Pour cela, la pipette de transfert dans laquelle se trouve le blastomère est insérée sous la zone pellucide de l'ovocyte et le blastomère y est déposé (28, 30, 41, 48, 49, 53) : à ce stade, il est d'ailleurs pertinent de remarquer que parler de transfert nucléaire est abusif, puisque c'est en fait le transfert d'une cellule entière qui est réalisé.

Actuellement, un expérimentateur confirmé peut en routine reconstituer environ une cinquantaine d'embryons par jour (53, 54).

3.2. Fusion des membranes cellulaires du blastomère et de l'ovocyte receveur

Puisque c'est une cellule entière, et non un simple noyau, qui est introduite sous la zone pellucide de l'ovocyte receveur, il est nécessaire de faire fusionner les membranes plasmiques du blastomère et de l'ovocyte pour réaliser l'introduction du noyau donneur dans le cytoplasme ovocytaire. Dans cette optique, des méthodes virales de fusion (utilisant le virus Sendai) ont d'abord été employées chez la vache (49, 57). Mais peu efficaces, ces dernières ont été délaissées au profit des méthodes d'électrofusion cellulaire.

En pratique, l'électrofusion est réalisée en milieu isotonique non conducteur (solution de mannitol ou de glucose) (28, 41, 56, 57). Elle implique que le couple ovocyte-cellule soit placé entre deux électrodes de platine distantes de 0,5 à 1 mm et reliées à un générateur d'impulsions de courant continu (41, 57) : la fusion des membranes est alors obtenue par des électrostimulations très brèves de courant continu à condition que la surface de contact entre l'ovocyte et la cellule donneuse soit placée parallèlement aux électrodes (28, 41, 57).

Ces stimulations électriques ont un double objectif (27, 28). D'une part, elles créent une agitation thermodynamique qui, en déstabilisant les couches juxtaposées de phospholipides membranaires, cause une rupture transitoire des membranes cellulaires du blastomère et de l'ovocyte receveur. En se refermant, ces membranes provoquent la formation de pores, ou petits « tunnels » membranaires, qui contribuent à former une cellule unique, et permettent au noyau de pénétrer dans son nouvel environnement cytoplasmique. D'autre part, ces stimulations électriques requises pour la fusion cellulaire servent également à déclencher l'activation de l'ovocyte receveur, c'est-à-dire à initier les mécanismes rendant l'ovocyte capable de reprogrammer le noyau transplanté afin qu'il reprenne une segmentation normale et s'engage dans le développement embryonnaire.

La fusion des membranes est généralement observée dans les 30 minutes qui suivent les stimulations électriques : le noyau diploïde se trouve alors englobé dans le cytoplasme ovocytaire et commence à être remodelé (27, 28). Il est possible de faire fusionner et activer en même temps tout un groupe d'embryons reconstitués (28).

Les paramètres d'électrostimulation ont été testés et permettent maintenant d'obtenir régulièrement entre 70 et 90% de fusions cellulaires dans l'espèce bovine (53, 54). Cependant, les mécanismes mis en jeu sont encore peu compris, et il s'avère que le nombre et l'amplitude des stimulations nécessaires pour obtenir des taux de fusion et d'activation élevés dépendent à la fois de l'âge, et plus généralement, de la qualité de l'ovocyte receveur, de la taille du blastomère injecté, et aussi de l'appareillage utilisé (28, 53, 54, 57). De même, le moment de ces électrostimulations par rapport à la période de maturation *in vitro* de l'ovocyte semble jouer un rôle important dans le développement ultérieur de l'embryon reconstitué (30). Compte tenu de ces éléments, il apparaît difficile de définir des normes d'électrofusion précises qui soient optimales en permanence.

A titre d'exemple, les paramètres d'électrostimulation les plus fréquemment utilisés pour fusionner et activer les embryons reconstitués consistent en une ou deux pulsations de courant continu de 1,2 à 1,5 kV/cm, d'une durée de 30 à 50 μ s chacune. Il est par ailleurs d'usage d'appliquer ces pulsations entre 23 et 46 heures après le début de la maturation *in vitro* des ovocytes (3, 12, 14, 18, 45, 53, 56, 62).

3.3. Activation de l'ovocyte receveur

L'activation de l'ovocyte est un processus complexe normalement induit par le spermatozoïde au cours de la fécondation (27, 28, 30, 41, 47).

Nous venons de voir que l'activation artificielle des ovocytes peut être obtenue par les stimulations électriques utilisées pour la fusion des cellules. Cet aspect a été particulièrement étudié par Ozil (1995) qui, cité par différents auteurs (30, 41, 47), a montré qu'on pouvait, par des stimulations électriques très précises, mimer partiellement la séquence d'événements induite par l'entrée du spermatozoïde lors de la fécondation (dépolariation de la membrane plasmique, augmentation de la concentration intracellulaire d'ions calcium, libération des granules corticaux, disparition de l'activité de certains facteurs cytoplasmiques, reprise de la méiose...), et déclencher ainsi la mise en route des étapes du développement précoce.

Toutefois, il est à signaler que l'activation de l'ovocyte receveur peut être également obtenue par un traitement chimique (ionophore calcique, éthanol/cycloheximide) qui est cependant moins usité que les procédés actuels de stimulations électriques (29, 31, 41, 47).

4. Culture des embryons reconstitués

Chez les bovins, il est impératif d'amener les embryons reconstitués par transplantation de noyaux au stade morula qui vivra

qui seraient responsables de la multiplication cellulaire. Mais il est probable que les cellules épithéliales de l'oviducte n'agissent pas seulement en synthétisant des facteurs importants pour le développement embryonnaire : elles interviendraient également par leur métabolisme tout entier, facilitant globalement le développement embryonnaire en produisant, transformant ou éliminant des métabolites importants ou toxiques pour l'embryon (19).

Ces considérations ont amené les équipes travaillant sur le clonage par transfert nucléaire à employer des systèmes de culture *in vitro* qui « miment » les conditions qui existent *in vivo* dans les trompes (30). Profitant des progrès réalisés dans les méthodes de culture associées à la procédure de fécondation *in vitro*, la plupart des équipes cultivent aujourd'hui les embryons reconstitués entièrement *in vitro*, en coculture sur des monocouches de cellules épithéliales tubaires ou utérines, ou en milieu synthétique (27, 29, 31, 41, 47, 53). Ces systèmes permettent de lever partiellement la phase de blocage du développement de l'embryon bovin qui existe normalement *in vitro*.

Est notamment utilisée avec succès une lignée bien établie de cellules épithéliales de rein de singe (VERO) qui se congèle parfaitement bien, et qui permet d'obtenir en coculture des taux de blastocystes de l'ordre de 30% dans des conditions standardisées (29). Les cellules de cette lignée présentent l'avantage d'être moins variables que les cultures primaires de cellules épithéliales d'oviducte, mais surtout, elles offrent un maximum de sécurité sur le plan sanitaire, étant indemnes de toute contamination virale (27, 29, 31, 41, 56, 65).

Sur ces milieux *in vitro*, la culture des embryons reconstitués jusqu'au stade blastocyste requiert, à une température de 39°C, et dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂, une période de 7 jours (12, 18).

5. Transplantation des embryons clonés dans l'utérus de receveuses

Les blastocystes clonés, développés *in vitro* pendant 7 jours, sont directement mis en place, par les techniques courantes de transfert embryonnaire, dans l'utérus de femelles receveuses dont le cycle est synchronisé avec l'âge de l'embryon (12, 27, 28, 29, 40, 41, 56). Les receveuses sont des génisses (12, 41, 45, 65), plus rarement des vaches (36), de différentes races. Il est possible de transplanter deux embryons clonés chez une même receveuse, car ils sont obligatoirement de même sexe, et ne risquent donc pas d'induire de free-martinisme (27, 29).

6. Rendement de la procédure - Taille des clones

L'efficacité actuelle de la procédure de clonage embryonnaire chez les bovins sera traitée ultérieurement de façon détaillée. Néanmoins, nous retiendrons d'ores et déjà qu'à partir d'un embryon donneur de noyaux au stade morula, il est aujourd'hui possible de produire *in vitro*, et en moyenne, un clone de six à huit blastocystes (27, 41, 47). Après transplantation de ces blastocystes clonés dans l'utérus de femelles receveuses, le taux moyen de développement à terme, c'est-à-dire aboutissant à la naissance d'un veau vivant, est généralement de 30% (28, 31, 41, 53, 54, 57, 58, 62). On en déduit donc que 10% des embryons reconstitués à partir de noyaux embryonnaires sont aujourd'hui capables de donner naissance à un veau, ce qui correspond à un rendement moyen qui est de l'ordre de deux veaux nés par embryon donneur utilisé pour le clonage (16, 41, 51, 52).

D. ASPECTS FONDAMENTAUX DU CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE : REMODELAGE ET REPROGRAMMATION

Après introduction dans un ovocyte compétent énucléé, un noyau plus ou moins différencié subit, sous l'influence de certains composants cytoplasmiques ovocytaires, une série de changements structurels et fonctionnels qui lui permettent de revenir à un stade morphologiquement et fonctionnellement ressemblant à celui du pronoyau du zygote. Ces modifications sont désignées sous les termes de remodelage (pour la structure) et de reprogrammation (pour l'activité des gènes) nucléaire (22, 30, 48, 49).

1. Remodelage

Le fait qu'un cytoplasme ovocytaire soit capable de réorganiser un noyau étranger est clairement démontré au cours de la fécondation normale. Adenot *et al.* (1990), cités par plusieurs auteurs (22, 28, 54), ont ainsi montré que, dès sa pénétration dans l'ovocyte, le spermatozoïde est l'objet d'une séquence de remaniements qui se produisent en même temps que l'achèvement de la méiose de l'ovocyte. La chromatine du noyau du spermatozoïde est en effet très vite soumise à une phase de décondensation rapide autorisant le remplacement progressif des protamines par des histones somatiques. Cette première étape est ensuite prolongée par l'élaboration d'une nouvelle enveloppe nucléaire à partir d'éléments stockés dans l'ovocyte et, finalement, la chromatine subit une phase de recondensation pour aboutir à la formation d'un pronoyau mâle.

Dans le cas de la fécondation, on ne comprend encore pas complètement comment le cytoplasme de l'ovocyte participe à la réorganisation de la membrane du noyau du spermatozoïde (54). Mais d'après Szöllösi *et al.* (1988), cités par plusieurs auteurs (8, 48, 54), après fécondation ou transfert nucléaire, l'acquisition d'une nouvelle structure membranaire par le noyau « étranger » est une condition nécessaire à la formation d'un noyau diploïde fonctionnel. Le remodelage du noyau conditionne donc son aptitude à se diviser et à permettre à nouveau la réalisation des premières étapes du développement (54). En ce sens, l'analyse moléculaire de l'organisation du noyau au cours de cette période apparaît donc essentielle pour tenter d'augmenter l'efficacité de la technique de clonage (45, 55).

Nous présenterons plus loin l'influence du cycle cellulaire (celui du noyau donneur et celui du cytoplasme receveur) sur le remodelage du noyau et le rendement du transfert nucléaire.

2. Reprogrammation

Un certain nombre d'éléments démontrent qu'un noyau donneur a tendance à se comporter comme un noyau de stade 1 cellule lorsqu'il est introduit dans le cytoplasme d'un ovocyte receveur, alors qu'il était déjà actif sur le plan transcriptionnel avant son transfert : on parle d'une reprogrammation des gènes du noyau donneur par le cytoplasme de l'ovocyte receveur (27, 47, 49, 54). Suite à cette reprogrammation, le noyau donneur est normalement capable de contrôler les étapes du développement pré-implantatoire (45, 54).

Les modifications qui débutent très précocement après l'introduction par électrofusion du noyau donneur dans un ovocyte receveur peuvent maintenant être étudiées *in vitro* de façon très précise. Par exemple, la mise au point d'une approche associant la microscopie à fluorescence à basse énergie à des marqueurs spécifiques de l'ADN permet de suivre directement *in situ*, et de façon dynamique, les modifications de la structure de la chromatine des embryons reconstitués au cours des premières étapes du développement (28, 30, 53, 54).

D'autres indicateurs de la reprogrammation du noyau sont utilisables. Ainsi, d'après Kanka *et al.* (1996), cités par Heyman *et al.* (27), si on analyse l'évolution des synthèses d'ARN (acide ribonucléique) par incorporation de thymidine tritiée dans les embryons reconstitués, on constate que ces synthèses, très fortes dans le noyau donneur de stade morula, sont réprimées au bout d'une dizaine d'heures post-fusion pour réapparaître ensuite progressivement après 2 ou 3 jours de culture au stade 4-8 cellules.

On peut aussi rapporter l'existence d'un procédé de détection par immunocytochimie d'antigènes de surface (27). Dans l'embryon bovin, un antigène repéré par l'anticorps monoclonal TEC-03 apparaît à partir du stade 32 cellules. Lors d'un protocole de clonage embryonnaire, il est donc présent dans la morula donneuse de noyaux. En appliquant cette méthode, il est alors facile de démontrer, qu'après transplantation nucléaire, cet antigène disparaît pour ne réapparaître dans les embryons clonés qu'au moment de la compaction, c'est-à-dire au même stade qu'au cours du développement normal.

Dans certains cas, cette reprogrammation peut toutefois être incomplète et conduire à des perturbations de certaines régulations qui sont susceptibles de justifier le développement non-optimal des embryons reconstitués (27).

3. Mécanismes responsables du remodelage et de la reprogrammation

Si le transfert de constructions géniques individuelles à des cellules hôtes est une méthodologie désormais courante pour le biologiste moléculaire, le transfert d'un génome nucléaire entier, comme c'est le cas lors de clonage par transplantation de noyaux, pose davantage de problèmes. Pourtant, les deux procédures ne sont pas conceptuellement très différentes. Dans les deux cas, l'ADN est transféré à une cellule hôte, et la réplication est stimulée. Seulement, le transfert d'un noyau entier à une cellule dont les chromosomes endogènes ont été extraits nécessite que le noyau transféré dirige la future activité mitotique. La réussite du transfert nucléaire implique donc que le cytoplasme de l'ovocyte receveur et le noyau donneur coopèrent pour diriger les divisions ultérieures (8, 49, 50, 54). Afin d'aboutir à une définition de la meilleure adéquation possible entre le cytoplasme receveur et le noyau donneur, il apparaît par conséquent important de préciser la nature même des facteurs ovocytaires rendant possible la reprogrammation du noyau (30).

Selon Heyman *et al.* (28), Merriam (1969) avait initialement montré que le gonflement du noyau transféré, qui est observé dans les heures qui suivent la fusion et qui constitue la première étape du remodelage nucléaire, était dû à l'entrée de protéines cytoplasmiques de régulation dans le noyau. Plus exactement, le gonflement nucléaire semble être le résultat d'un échange sélectif de protéines entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire (22, 48, 49). Ceci dit, l'étonnant pouvoir « reprogrammateur » que manifeste le cytoplasme de l'ovocyte receveur à l'égard de cellules toujours plus différenciées reste, aujourd'hui encore, peu compris. Certes, nous savons qu'il met en jeu des remaniements complexes de l'organisation des protéines qui contribuent à l'assemblage du noyau (les histones et les lamines de l'enveloppe nucléaire), et qu'il impose des états de conformation étroitement contrôlés à la molécule d'ADN, mais la cinétique de ces événements moléculaires après transplantation nucléaire est toujours méconnue (52, 54, 63).

Ces mécanismes qui ne dépendent pas directement de l'activité des gènes (régulations épigénétiques) contrôlent donc les premières étapes du développement de l'embryon. Notamment, la cinétique des relations nucléocytoplasmiques qui s'établissent à partir du stade 1 cellule va déterminer l'aptitude ultérieure de l'embryon à établir d'abord des relations fonctionnelles entre les blastomères au stade morula, puis à réaliser les premières différenciations cellulaires au stade blastocyste (49, 55). Or, il a été montré, chez la vache,

que des défauts de fonctionnement acquis dans cette période qui suit le transfert de noyau peuvent avoir des influences néfastes sur le développement fœtal tardif et périnatal (27, 42, 52, 55, 56). Là encore, l'étude plus poussée des interactions survenant après la greffe d'un noyau dans le cytoplasme d'un ovocyte receveur s'avère par conséquent nécessaire pour réduire les effets à long terme du clonage qui, en l'état, sont ceux qui limitent le développement du clonage chez les bovins (55).

➤ POINTS FORTS A RETENIR :

- Le principe du clonage par transfert nucléaire consiste à greffer des noyaux « donneurs » provenant de différentes sources cellulaires (pour l'essentiel, des blastomères isolés d'embryons à des stades préimplantatoires ou des cellules en culture) dans toute une série d'ovocytes matures appelés « receveurs », préalablement énucléés. Les œufs ainsi reconstitués possèdent tous les mêmes caractéristiques génétiques nucléaires : après transplantation dans l'utérus de femelles receveuses, et au terme de leur développement complet, ils seraient donc théoriquement capables de donner naissance à autant de jeunes de la même constitution génétique (clones) que de noyaux transférés.
- La maîtrise globale de cette biotechnologie chez les bovins nécessite non seulement de contrôler certains points critiques bien précis de la technique (obtention d'un grand nombre d'ovocytes receveurs compétents pour le transfert nucléaire, énucléation de ces ovocytes, fusion des membranes de l'ovocyte receveur et de la cellule donneuse, activation des ovocytes receveurs, culture des embryons reconstitués, variabilité des rendements), mais aussi de répondre à certaines difficultés d'ordre biologique (comprendre comment s'effectue la reprogrammation des noyaux transférés, maîtriser la synchronisation des cycles cellulaires des cellules donneuse et receveuse et mieux connaître les événements fondamentaux impliqués lors de la différenciation cellulaire).
- Il en résulte que, depuis les débuts du clonage par transplantation de noyaux chez les mammifères (Willadsen, 1986) jusqu'aux succès plus récents du clonage somatique, l'évolution de cette biotechnologie a été à la fois le résultat d'améliorations techniques (maturation *in vitro* des ovocytes, micromanipulations, culture *in vitro* des embryons reconstitués) et d'études fondamentales.
- A partir d'un embryon bovin donneur de noyaux au stade morula, il est aujourd'hui possible de produire *in vitro* un clone de six à huit blastocystes en moyenne. Après transplantation de ces blastocystes clonés dans l'utérus de femelles receveuses, le taux de développement à terme, c'est-à-dire aboutissant à la naissance d'un veau vivant, est généralement de 30%. On en déduit que lors de clonage à partir de noyaux embryonnaires non cultivés (clonage embryonnaire), en moyenne 10% des embryons reconstitués sont capables de se développer à terme.
- Chez les bovins toujours, l'efficacité globale de la procédure est bien plus faible encore lorsqu'on utilise des cellules en culture comme cellules donneuses de noyaux (clonage somatique), avec des taux de naissances cette fois compris entre 0,3 et 2%.

II. NOUVELLES DONNES EN MATIERE DE CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS

A. LES NOUVELLES SOURCES DE NOYAUX DONNEURS

Lors d'une procédure de clonage embryonnaire menée dans l'espèce bovine, un des problèmes posé par l'utilisation de jeunes embryons comme source de noyaux donneurs est que le nombre de développements à terme qui peuvent être obtenus à partir d'un seul embryon est limité, non seulement par le nombre restreint de cellules de cet embryon, mais aussi par la faible efficacité de la technique de transfert nucléaire (6, 42, 47).

Les efforts pour affiner la méthode de transfert de noyaux se sont traduits par des améliorations significatives mais insuffisantes de la technique et, à ce jour, la taille des clones issus d'embryons donneurs de stade précoce reste peu importante (en moyenne, deux veaux nés par embryon donneur utilisé pour le clonage), ce qui constitue un frein certain aux diverses applications possibles du clonage des bovins, notamment en recherche ou en sélection (13, 41).

Si le clonage a tout d'abord été pratiqué chez les espèces de rente avec des embryons à des stades préimplantatoires, l'essor de cette technique semble donc passer par l'utilisation de nouvelles sources de noyaux donneurs, plus abondantes (cellules germinales, cellules souches embryonnaires, cellules somatiques), voire aussi par l'utilisation du reclonage.

1. Le reclonage

1.1. Principe

Le nombre de noyaux totipotents contenus dans un embryon donneur bovin de stade morula est limité (de l'ordre d'une soixantaine) et ne permet pas d'obtenir des clones de grande taille en une seule génération de transplantation de noyaux (27, 28, 29).

L'un des moyens d'augmenter le nombre de noyaux génétiquement identiques disponibles consiste à recycler une partie des embryons issus d'une première génération de transplantation nucléaire, c'est-à-dire à les utiliser à leur tour comme donneurs de noyaux pour effectuer un clonage de deuxième (ou de troisième) génération, au lieu de les transplanter dans une receveuse (27, 28, 30, 31, 42, 44, 48, 51, 52, 53).

De cette manière, même de faibles taux d'efficacité seraient suffisants pour accroître considérablement la taille des clones engendrés. Par exemple, avec une efficacité globale de 20%, un embryon donneur de 32 cellules fournirait, après transfert nucléaire, six embryons identiques qui pourraient à nouveau servir de sources de noyaux donneurs et conduire ainsi à 36 embryons identiques. S'il était possible de répéter plusieurs fois ce schéma, un nombre illimité d'embryons pourrait être théoriquement produit (57).

1.2. Quelques résultats

Tout comme pour le clonage embryonnaire, les premières expériences de reclonage ont eu lieu chez les amphibiens, Orr *et al.* (1986), cités par Heyman *et al.* (29), ayant montré que le recyclage d'embryons clonés comme source de noyaux pour la greffe en plusieurs générations était possible chez ces animaux.

Des résultats ont ensuite été recensés chez les bovins où des embryons clonés ont également pu être recyclés. Ainsi, Bondioli *et al.* (1990), cités par plusieurs auteurs (28, 29, 31, 41, 54), ont fait naître quelques veaux en utilisant des morulae issues de transplantation nucléaire comme donneurs de noyaux en deuxième génération de clonage. De même, plusieurs auteurs (16, 27, 31, 42) rapportent les travaux d'Ectors *et al.* (1995) et ceux de Le Bourhis *et al.* (1996) qui ont réussi à obtenir des veaux à partir d'embryons clonés en deuxième génération, avec un rendement voisin de celui relevé en première génération (tableau 7).

Tableau 7 : Rendement du reclonage des embryons bovins (27)

	Première génération	Deuxième génération
Développement <i>in vitro</i> (pourcentage de blastocystes formés par rapport au nombre d'embryons reconstitués)	30,6	27,7
Développement <i>in vivo</i> (pourcentage de gestations à J90 par rapport au nombre de femelles transplantées)	36,3	28,5

1.3. Potentialités de développement associées au reclonage

1.3.1. Développement *in vitro* des embryons recyclés

D'après Heyman *et al.* (28), les travaux de Stice *et al.* (1991) indiquent que le recyclage des embryons clonés s'accompagne, chez les bovins, d'une baisse progressive de l'efficacité du développement *in vitro*. Cependant, pour Stice et Keefer (1993), cités par plusieurs auteurs (27, 31, 41), cette diminution des rendements ne semble pas survenir avant la troisième génération de transfert de noyaux. Des blastocystes auraient même été produits, avec une efficacité satisfaisante, après six cycles consécutifs de clonage (31).

D'autre part, selon Heyman *et al.* (31), Takano *et al.* (1996) ont montré que les embryons bovins produits en première génération de transplantation de noyaux présentent une grande variabilité dans l'aptitude au recyclage : ainsi, après plusieurs cycles de reclonage, une morula peut fort bien conduire à l'obtention de 43 blastocystes clonés, alors qu'une autre n'en fournira que cinq. Même si les causes en sont encore mal connues, cette variabilité constitue un obstacle important aux éventuelles utilisations pratiques du reclonage embryonnaire.

1.3.2. Développement à terme des embryons recyclés

En plus de leurs observations relatives au développement *in vitro* des embryons issus de reclonage, Stice et Keefer (1993), cités par (27, 31, 41), ont également souligné qu'une forte réduction de la viabilité des blastocystes ainsi obtenus est observée après transfert de ceux-ci à des receveuses : en effet, le taux de vèlages après transplantation d'embryons issus de troisième génération de transfert nucléaire ne dépasse pas 3%, alors que, dans les mêmes conditions, ce taux est en moyenne de 30% après transplantation d'embryons issus de première génération de transfert nucléaire.

Jusqu'à aujourd'hui, aucun veau n'est né après transplantation dans des femelles receveuses d'embryons issus de quatrième génération de clonage (31). Pourtant, selon Heyman *et al.* (31), Takano *et al.* (1996) ont démontré que des blastocystes de cinquième génération sont capables d'initier des gestations qui, toutefois, ne vont pas jusqu'à leur terme. Pour expliquer les pertes embryonnaires résultantes, Takano *et al.* (1996) suggèrent que l'incidence des anomalies chromosomiques serait augmentée avec la répétition des cycles de clonage et des périodes de culture *in vitro*.

1.3.3. Espoirs raisonnables

En recyclant un ou deux embryons de stade morula issus d'un premier clonage, le pouvoir multiplicateur *in vitro* de l'embryon donneur initial passe de six blastocystes en une seule génération à 14,3 +/- 3,6 blastocystes en deux générations (41). Compte tenu de ces données, le reclonage ouvre des perspectives intéressantes pour obtenir, avec une bonne probabilité (environ 60%), des clones de deux à cinq veaux à partir d'un embryon donné, le record déclaré étant un clone de 11 veaux obtenu en reclonage (27, 42, 51, 52).

2. Les cellules germinales primordiales

Chez les bovins, hormis le recyclage des embryons clonés, une autre source potentielle de noyaux génétiquement identiques disponibles en grand nombre pour la production de clones est constituée par les cellules germinales primordiales (ou PGC, pour primordial germ cells) (27, 29, 31, 45, 47).

2.1. Caractéristiques

Les PGC sont des cellules diploïdes, précurseurs des gamètes, qui se multiplient par mitose dans les gonades fœtales, et dont les noyaux sont porteurs de la même information génétique. On en dénombre jusqu'à plusieurs dizaines de milliers dans la gonade d'un fœtus bovin mâle de 150 jours (27, 29, 31, 45). Tous ces critères en font une bonne source potentielle de noyaux donneurs, à condition, bien entendu, qu'elles aient conservé leur totipotence nucléaire (45).

D'un point de vue embryologique (45), les PGC bovines migrent depuis le mésoderme jusque dans les gonades indifférenciées, qu'elles atteignent vers le 35^{ème} jour post-fécondation. Là, dans les gonades indifférenciées, les PGC poursuivent leur multiplication par mitose. Dans l'ovaire fœtal, la multiplication mitotique cesse quand débute la méiose (entre les 65^{ème} et 80^{ème} jours post-fécondation). Parallèlement au démarrage de la méiose chez la femelle, l'activité mitotique des PGC mâles décroît durant cette même période.

D'un point de vue morphologique (18, 45), lorsque les PGC bovines sont isolées de gonades fœtales âgées de 48 jours, elles sont caractérisées par une taille relativement

importante (12 à 15 µm de diamètre), une surface cellulaire sans aspérités, un gros noyau contenant deux à trois nucléoles, ainsi qu'un cytoplasme peu abondant mais capable de se déformer pour constituer des pseudopodes. A ce stade de développement fœtal, il n'y a aucune différence morphologique entre les PGC mâles et femelles. Toutefois, contrairement aux PGC femelles, les PGC mâles présentent la particularité de ne subir aucune différenciation morphologique entre les 48^{ème} et 185^{ème} jours post-fécondation.

2.2. Quelques études

Là encore, les premières expériences de clonage par transfert de noyaux utilisant des PGC comme cellules donneuses se sont déroulées chez les amphibiens : d'après Delhaise *et al.* (18), Smith *et al.* (1965) ont ainsi démontré, chez la grenouille *Rana pipiens*, que des noyaux de cellules germinales greffés dans des ovocytes énucléés étaient capables de produire des têtards normaux. Toujours selon Delhaise *et al.* (18), en réalisant des travaux similaires sur des salamandres, Lesimple *et al.* (1987) obtiennent même quelques adultes depuis des embryons reconstitués.

Chez les mammifères, les premières expérimentations en la matière ont eu lieu chez la souris. De fait, Tsunoda *et al.* (1989), cités par plusieurs auteurs (18, 45, 67), ont montré que des ovocytes énucléés recevant des PGC mâles étaient capables de se développer jusqu'au stade blastocyste, mais qu'en aucun cas ils ne fournissaient des souriceaux vivants, bien que des sites d'implantation utérine aient pu être observés. Par ailleurs, comme le signalent plusieurs auteurs (18, 29), des résultats ont également été obtenus de cette façon chez le lapin par Moens *et al.* (1995). Ces derniers ont en effet réussi à reprogrammer des noyaux de PGC prélevées sur des fœtus mâles jusqu'au stade blastocyste. Toutefois, après transplantation des embryons ainsi reconstitués dans des receveuses, aucune gestation n'a été initiée.

Chez les bovins, principalement trois études méritent d'être rapportées :

Etude 1 (18)

Dans cette expérience, Delhaise *et al.* réalisent la transplantation de noyaux de gonies (autre nom des PGC), collectées sur des fœtus bovins mâles âgés de 175 jours, dans des ovocytes énucléés. Les embryons reconstitués atteignant le stade morula compactée ou blastocyste après une période de culture *in vitro* de 7 jours sont alors, soit fixés pour un comptage cellulaire (expérience 1), soit transplantés dans des receveuses (expérience 2). Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau 8.

Au total, 68 (expérience 1) et 47 (expérience 2) fusions ovocyte-gonie sont obtenues. Au 3^{ème} jour de culture *in vitro*, respectivement 87% et 90% des embryons ainsi reconstitués se sont segmentés, tandis que seulement 12% et 38% de ces embryons clivés atteignent le stade 8 cellules. Au jour 7, trois blastocystes (4%) ainsi qu'une morula compactée (2%) et deux autres blastocystes (4%) sont recueillis.

Les trois blastocystes obtenus dans l'expérience 1 sont fixés pour une numération cellulaire qui s'avère tout à fait normale, la composition cellulaire de ces blastocystes étant, selon Delhaise *et al.*, tout à fait comparable à celle de blastocystes produits *in vitro* par Vansteenbrugge *et al.* (1994) ou par Trounson *et al.* (1994).

Les deux blastocystes et la morula compactée produits dans l'expérience 2 sont, quant à eux, individuellement transférés dans trois génisses receveuses synchronisées. Deux d'entre elles sont déclarées gestantes au 21^{ème} du cycle (par détermination des concentrations plasmatiques de progestérone), mais une seule le demeure au jour 35 (résultat confirmé par la

mesure de la concentration plasmatique en PAG, ou pregnancy associated protein). Finalement, cette dernière receveuse avorte vers le 42^{ème} jour de gestation.

Tableau 8 : Développement *in vitro* d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de gonies bovines mâles âgées de 175 jours post-fécondation (18)

		Jour 3 de culture		Jour 7 de culture		
		Clivage (%)	Stade 8 cellules (%)	Morulae (%)	Blastocystes (%)	Nombre de cellules
Exp. 1	68	59 (87)	8 (12)	0 (0)	3 (4)	76, 90, 135
Exp. 2	47	42 (90)	18 (38)	1 (2)	2 (4)	-

D'après Delhaise *et al.*, la proportion d'embryons reconstitués qui, dans cette étude, se développe jusqu'aux stades morula et blastocyste est basse, comparée aux rendements habituellement observés après clonage embryonnaire : 12% de morulae et blastocystes (Prather *et al.*, 1987), 25% de morulae et blastocystes (Bondioli *et al.*, 1990).

Les causes de ce développement restreint sont pour l'instant inexplicables. Cependant, ces résultats indiquent d'ores et déjà que les noyaux de gonies peuvent être partiellement reprogrammés après transplantation nucléaire, en ce sens qu'ils sont capables de se développer *in vitro* jusqu'aux stades morula et blastocyste et d'initier des gestations après transfert à des receveuses. Ils ne permettent par contre pas de conclure sur l'éventuelle totipotence nucléaire des gonies, aucun développement à terme n'ayant été obtenu.

Etude 2 (45)

Moens *et al.* utilisent ici le transfert de noyaux pour étudier la reprogrammation nucléaire de PGC bovines prélevées à deux stades différents du développement fœtal. Des gonies mâles et femelles âgées de 48 jours post-fécondation (caractérisées par une activité mitotique intense), ainsi que des gonies mâles âgées de 105 à 185 jours post-fécondation (activité mitotique réduite) sont donc recueillies sur plusieurs fœtus, puis fusionnées avec des ovocytes receveurs énucléés. Les embryons reconstitués sont cultivés *in vitro* et ceux qui parviennent au stade morula compactée ou blastocyste sont transplantés dans des génisses receveuses synchronisées. Les résultats de cette étude sont exposés dans les tableaux 9, 10, 11 et 12.

Nous nous apercevons, à la lecture du tableau 9, que sur 511 embryons reconstitués avec des gonies âgées de 48 jours (309 gonies mâles et 202 gonies femelles), 247 (48,3%) commencent à se diviser (stade 2 à 4 cellules), et respectivement 14 (2,7%) et 8 (1,6%) d'entre eux atteignent les stades morula compactée et blastocyste. Aucune différence n'est observée dans le développement *in vitro* des embryons reconstitués à partir de gonies de sexes différents.

Tableau 9 : Développement *in vitro* d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de gonies bovines âgées de 48 jours post-fécondation (45)

Cellules germinales		Stades embryonnaires			
Sexe	Age post-fécondation (jours)	Embryons reconstitués	2 à 4 cellules (%)	Morulae (%)	Blastocystes (%)
mâle	48	309	157 (50,8)	9 (2,9)	5 (1,6)
femelle	48	202	90 (44,5)	5 (2,5)	3 (1,5)
Total		511	247 (48,3)	14 (2,7)	8 (1,6)

Au sein d'une même colonne, les pourcentages ne sont pas significativement différents (test χ^2 , $P > 0,05$).

Les embryons de stades morula compactée et blastocyste obtenus à partir de gonies collectées sur un même fœtus sont alors tous transférés dans une même receveuse. Au total, les 14 embryons ainsi produits sont transplantés chez six receveuses. Le tableau 10 montre que sur ces six receveuses, une seule (B88) est présumée gestante aux 21^{ème} et 30^{ème} jours de gestation par mesure, respectivement, de la progestéronémie et de la concentration plasmatique en PAG. Toutefois, une échographie réalisée au jour 35 révèle la présence de liquide intra-utérin en grande quantité. La génisse B88 est alors abattue, et un embryon dégénéré associé à un trophoctoderme étendu en sont extraits. Aucun signe morphologique d'implantation n'est décelé, en dépit de la présence d'un corps jaune bien développé. L'embryon a d'autre part été génétiquement confirmé comme étant un mâle, conformément au sexe de la gonie donneuse de noyau.

Tableau 10 : Développement *in vivo* d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de gonies bovines âgées de 48 jours post-fécondation (45)

Embryons transplantés	Génisses receveuses				Résultats
	Numéro d'identification	Proges 21	PAG 30	Echo 35	Développement <i>in vivo</i>
1 blastocyste + 2 morulae (M)	B88	+	+	+	1 (dégénéré)
1 blastocyste + 1 morula (M)	B91	-	-	-	-
1 blastocyste + 1 morula (M)	B105	-	-	-	-
2 blastocystes + 1 morula (F)	B111	-	-	-	-
2 blastocystes (F)	B112	-	-	-	-
1 blastocyste + 1 morula (M)	B113	-	-	-	-
Total : 9 (M) + 5 (F)	6	1	1	1	1 (dégénéré)

M : mâle ; F : femelle ; Proges 21 : concentration plasmatique de progestérone mesurée 21 jours après la transplantation ; PAG 30 : concentration plasmatique de PAG mesurée 30 jours après la transplantation ; Echo : examen échographique réalisé 35 jours après la transplantation.

Le tableau 11 présente les résultats de la transplantation de noyaux de gonies mâles bovines, âgées de 105 à 185 jours, dans des ovocytes receveurs énucléés. Sur 380 embryons reconstitués, 274 (72,1%) commencent à se diviser, et respectivement 8 (2,1%) et 7 (1,8%) d'entre eux atteignent les stades morula compactée et blastocyste. Aucune différence n'est observée dans les taux de clivage (stade 2 à 4 cellules) des embryons reconstitués à partir de gonies d'âges différents. Par contre trop peu de morulae et de blastocystes ont été obtenus pour se prononcer statistiquement sur les étapes ultérieures du développement *in vitro*.

Tableau 11 : Développement *in vitro* d’embryons reconstitués par transfert nucléaire de gonies bovines âgées de 105 à 185 jours post-fécondation (45)

Cellules germinales		Stades embryonnaires				
Sexe	Age post-fécondation (jours)	Embryons reconstitués	2 à 4 cellules (%) ^a	Morulae (%)	Blastocystes (%)	Nombre de cellules

Tableau 12 : Développement *in vivo* d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de gonies bovines âgées de 48 jours post-fécondation (45)

Embryons transplantés	Génisses receveuses				Résultats
	Numéro d'identification	Proges 21	PAG 35	Echo 35	Développement <i>in vivo</i>
1 blastocyste (M)	009	+			
1 blastocyste (M)	2878	-			
1 blastocyste (M)	2179	-			
1 morula (M)	7719	+			
Total : 4 (M)	4	2			

Etude 3 (Lavoir *et al.*, 1997)

D'après Heyman *et al.* (31), Lavoir *et al.* (1997) ont, eux aussi, réussi à initier quelques gestations à partir d'embryons reconstitués par transplantation de noyaux de PGC femelles bovines dans des ovocytes receveurs énucléés, mais comme précédemment, les receveuses gravides ont avorté aux alentours du 40^{ème} jour de gestation.

Discussion

Les résultats des trois expériences précédentes suggèrent que le noyau des PGC bovines n'est pas totipotent. Toutefois, à ce stade des recherches, les raisons de l'absence de développement à terme des embryons bovins reconstitués à partir de gonies bovines demeurent inconnues.

Une explication plausible consiste à évoquer la perte d'empreintes appropriées par ces cellules (18, 45) : il est en effet possible que certaines empreintes parentales requises pour l'implantation soient déjà effacées chez les gonies de 48 jours et/ou que des empreintes fœtales soient déjà en place.

Ce développement limité pourrait également être dû à une reprogrammation nucléaire incorrecte et/ou une expression incomplète de certains gènes essentiels des PGC (18). Ces deux phénomènes pourraient être liés au fait que les gonies isolées des gonades fœtales soient déjà différenciées (45). De même, on ne peut pas totalement exclure le rôle éventuel joué par certaines anomalies chromosomiques (18).

2.3. Potentiel actuel du clonage des cellules germinales primordiales bovines

Prolongeant les travaux précédents, d'autres équipes ont à leur tour tenté de cloner des PGC bovines. Ainsi, Gene, le premier veau issu du clonage de cellules germinales, a vu le jour en 1997 (11). Plus récemment encore, Renard *et al.* (55) rapportent les recherches de Zakhartchenko *et al.* (1999) qui ont obtenu un veau après transplantation dans des receveuses d'embryons reconstitués par transfert de noyaux de PGC dans des ovocytes énucléés.

Aussi spectaculaires qu'elles puissent paraître, ces réussites doivent pourtant être ramenées à leur juste valeur. Notamment, les rendements de ces expériences sont encore très faibles comparés à ceux du clonage embryonnaire, Zakhartchenko *et al.* (1999) ayant par exemple dû reconstituer 140 embryons pour obtenir un unique veau (rendement global inférieur à 1%). D'emblée, cette faible efficacité constitue un facteur limitant à l'utilisation en routine des gonies comme source de noyaux donneurs pour le clonage par transfert nucléaire des bovins.

Par contre, le fait que des développements aient été jusqu'à leur terme démontre la totipotence, longtemps contestée, du noyau des cellules germinales primordiales bovines.

3. Les cellules souches embryonnaires

L'utilisation de cellules souches embryonnaires comme source de noyaux donneurs représente une étape de transition importante dans l'évolution du clonage embryonnaire vers le clonage somatique (13, 48).

3.1. Caractéristiques

Chez la brebis et la vache, il est démontré que les noyaux des cellules du bouton embryonnaire d'un blastocyste (ou masse cellulaire interne) sont encore totipotents (13, 27,

43, 48, 54). En effet, d'après plusieurs auteurs (27, 28, 29, 31, 53, 54, 62), des agneaux (Smith et Wilmut, 1989) et des veaux (Keefer *et al.*, 1994 ; Collas et Barnes, 1994) ont pu être produits après transfert de tels noyaux dans des ovocytes receveurs énucléés.

Toutefois, les rendements du clonage de ces cellules sont très faibles (12, 42), Keefer *et al.* (1994) ayant par exemple dû reconstituer 948 embryons pour faire naître seulement deux veaux (rendement global de 0,25%). De plus, cette source de noyaux donneurs reste relativement restreinte, car le bouton embryonnaire d'un blastocyste n'est composé, en moyenne, que d'une trentaine de cellules, soit l'équivalent en nombre d'une morula (42).

Pour remédier à ces obstacles, il serait intéressant de multiplier indéfiniment (*in vitro*) les cellules du bouton embryonnaire d'un blastocyste tout en empêchant leur différenciation. On disposerait ainsi d'une source de noyaux virtuellement illimitée pour le clonage des bovins (27, 28, 29, 42, 53, 58). De telles lignées de cellules embryonnaires sont appelées ES (embryonic stem). Lorsqu'elles sont associées aux cellules embryonnaires d'un blastocyste au sein de chimères, elles sont capables d'induire le développement d'un adulte normal et fertile, en participant à la formation de tous les tissus de l'organisme adulte, et en se transmettant notamment dans la lignée germinale : elles sont totipotentes (27, 28, 42, 53).

Selon plusieurs auteurs (10, 42, 58), Evans et Kaufman (1981), Martin (1981) et Robertson (1987) ont déjà réussi à établir des lignées de cellules ES chez la souris.

Par contre, malgré des recherches très actives chez la vache, il semble que des colonies de cellules ES bovines soient beaucoup plus difficiles à obtenir que chez la souris (27, 29, 31, 53). Pourtant, la création de telles lignées serait d'un grand intérêt dans l'espèce bovine (28, 48).

3.2. Tentatives de clonage des bovins à partir de lignées de cellules ES

Les premiers travaux relatant l'utilisation de cellules cultivées bovines comme source de noyaux donneurs dans un protocole de clonage par transfert nucléaire sont l'œuvre de Sims et First (1993). Cités par plusieurs auteurs (31, 56, 61, 63, 65), ceux-ci ont en effet obtenu quatre veaux à partir de cellules de boutons embryonnaires cultivées pendant 1 à 3 semaines.

Puisque les cellules de la masse cellulaire interne d'un blastocyste bovin sont capables de conduire à la naissance de veaux quand elles sont clonées, soit immédiatement après leur prélèvement (Keefer *et al.*, 1994 ; Collas et Barnes, 1994), soit après une courte période de culture (Sims et First, 1993 ; Itoh *et al.*, 1998), plusieurs équipes ont essayé de les multiplier *in vitro* pendant de nombreux passages successifs (une période de culture de 3 jours suivie d'une remise en culture représente un « passage »), dans le but de constituer de véritables lignées de cellules ES utilisables pour la transplantation nucléaire (42, 65). Seulement, à ce jour, les cellules ES bovines ne sont pas encore capables d'une complète différenciation jusqu'au terme après clonage (14).

Ainsi, d'après plusieurs auteurs (27, 31, 42), si Strelchenko *et al.* (1995) sont bien parvenus à reprogrammer par transfert nucléaire des noyaux de cellules présumées ES bovines jusqu'au stade blastocyste, après transplantation de ces embryons clonés chez des femelles receveuses, le développement fœtal n'est jamais allé au-delà de 50 jours de gestation.

Une autre étude réalisée par Stice *et al.* (62) est exposée ci-après :

Matériels et méthodes

Dans cette expérience, Stice *et al.* utilisent la procédure de transplantation de noyaux pour tester la capacité développementale de lignées cellulaires embryonnaires bovines dérivant d'embryons de stade morula ou blastocyste, produits *in vivo* ou *in vitro* (tableau 13). Les blastomères des morulae ou des masses cellulaires internes des blastocystes sont cultivés *in vitro* pendant plusieurs passages, le premier repiquage ayant lieu entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour de culture. Seules les cellules présentant les trois caractéristiques morphologiques suivantes sont isolées pour un passage :

- un faible ratio volume cytoplasmique/volume nucléaire,
- un noyau contenant de volumineux nucléoles,
- présence de vésicules lipidiques dans le cytoplasme.

D'autre part, seules les lignées cellulaires ayant subi moins de dix passages servent de source de noyaux donneurs pour des opérations de transplantation nucléaire. Enfin, des chimères sont créées par addition de deux blastomères issus d'embryons de stade 8 cellules à des blastomères provenant d'embryons clonés, et se trouvant également au stade 8 cellules.

Tableau 13 : Lignées cellulaires embryonnaires bovines établies depuis des embryons d'origine et de stade différents (62)

Stade de l'embryon ayant servi à l'établissement de la lignée	Source de l'embryon	Nombre de lignées cellulaires établies (pourcentage calculé par rapport au nombre total de cellules de l'embryon ayant servi à l'établissement de la lignée)*	Formation de corps embryoïdes
Morula	<i>in vitro</i>	12 (67)	oui
Morula	<i>in vivo</i>	11 (55)	oui
Blastocyste	<i>in vitro</i>	15 (47)	oui
Blastocyste	<i>in vivo</i>	27 (55)	oui

* Les pourcentages de lignées cellulaires embryonnaires bovines établies à partir d'embryons d'origine et de stade distincts ne sont pas significativement différents (test χ^2 , $P > 0,05$).

Résultats

Dans cette étude, une lignée cellulaire embryonnaire est considérée comme établie quand une population homogène de cellules peut être maintenue pendant plusieurs générations, tout en conservant les caractéristiques morphologiques évoquées précédemment. De fait, dans cette expérience, certaines lignées subissent plus de 50 passages (soit une période de culture

in vitro de plusieurs mois) sans la moindre altération de leur morphologie. Globalement, aucune différence morphologique n'est observée entre les quatre types de lignées cellulaires ainsi créées.

Par ailleurs, ces lignées cellulaires ont la propriété de former des corps embryoïdes quand les colonies deviennent surchargées *in vitro*. Ces structures sont nommées corps embryoïdes en raison de leur ressemblance à des embryons de stade blastocyste, et aussi en raison des différenciations cellulaires se produisant au sein de ces structures (cellules musculaires, sanguines...).

Les lignées cellulaires embryonnaires ainsi constituées sont donc employées comme sources de noyaux donneurs dans une procédure de clonage par transfert nucléaire (tableau 14). Les paramètres appliqués (activation effectuée 4 heures après la fusion, cellules donneuses de petite taille) ont préalablement été définis comme ceux conduisant aux taux de développement jusqu'au stade blastocyste les plus élevés. De plus, avant d'être clonées, les lignées cellulaires sont sexées par amplification par PCR (polymerase chain reaction) de séquences d'ADN spécifiques du chromosome Y.

En consultant le tableau 14, nous constatons que, sur la totalité des lignées sexées, la lignée mâle (0761) présente, après transfert de noyaux, un taux de développement jusqu'au stade blastocyste statistiquement plus faible ($P < 0,001$) que ceux obtenus avec les lignées femelles (0713 et 0734). En contrepartie, les blastocystes clonés à partir de la lignée mâle conduisent, après transfert chez des receveuses, à une proportion significativement plus élevée de gestations à 40 jours que ceux clonés à partir des lignées femelles ($P < 0,05$: 15% vs 5%). Pour autant, le développement des embryons transférés ne se poursuit pas au-delà de 55 jours de gestation, et seuls deux embryons (un mâle et un femelle) sont allés jusqu'à ce stade.

Tableau 14 : Développements *in vitro* et *in vivo* d'embryons reconstitués par transfert, dans des ovocytes énucléés et activés, de noyaux donneurs issus de lignées cellulaires embryonnaires bovines dérivant d'embryons de stade blastocyste ou morula (62)

Numéro d'ID des lignées cellulaires embryon.	Stade	Source	Sexe	Nombre d'embryons reconstitués par transfert nucléaire	Nombre de blast. (%)	Nombre de blast. transférés chez des receveuses	Nombre de gestations (%)		
							> 30 jrs*	> 40 jrs	> 50 jrs
0734	Blast.	<i>in vivo</i>	F	1047	246 ^a (23)	164	27 (16)	9 ^d (5)	1 (1)
0761	Blast.	<i>in vivo</i>	M	498	58 ^b (12)	39	8 (21)	6 ^c (15)	1 (3)
0713	Blast.	<i>in vitro</i>	F	863	314 ^c (36)	13	4 (31)	0 ^d	0
0870	Mor.	<i>in vivo</i>	-	84	34 ^c (40)	15	2 (13)	0	0
0677	Mor.	<i>in vitro</i>	-	704	250 ^c (36)	20	6 (30)	1 (5)	0

ID : identification ; embryon. : embryonnaires ; Stade : stade de l'embryon ayant permis l'établissement de la lignée ; M : mâle ; F : femelle ; Blast. : blastocyste ; Mor. : morula ; jrs : jours.

* Au sein de cette même colonne, les taux de gestation à 30 jours ne diffèrent pas.

^{a, b, c} Les taux de formation des blastocystes présentant des exposants différents au sein de cette même colonne sont significativement différents (test χ^2 , $P < 0,001$).

^{d, e} Les taux (regroupés par sexe) de gestations à 40 jours présentant des exposants différents au sein de cette même colonne sont significativement différents (test χ^2 , $P < 0,05$).

Entre les 35^{ème} et 22.3637 diffèrent pas.

EneTm(m)TjI2 0 0 4 TfI2219.988752054 brytatitivem ca). Tf0.00011 T3887.0499 Tw 12 0

Les produits (fœtus et placenta) de l'un des avortements ayant eu lieu à 85 jours sont collectés et analysés. Des séquences microsatellites d'ADN sont employées pour déterminer le taux de contribution des lignées cellulaires embryonnaires à la formation des différents tissus de cette chimère. Il en résulte que, sur l'avorton recueilli, la participation des lignées cellulaires embryonnaires à la formation de tissus comme le placenta, la peau ou les muscles, et d'organes comme le cœur, se fait pour moitié environ. Comme précédemment, le fœtus ne présente aucune anomalie, tandis qu'à ce stade de gestation, les cotylédons du tissu placentaire sont considérés comme anormalement petits et peu nombreux.

Enfin, l'analyse de biopsies d'oreilles et de prélèvements sanguins effectués sur les cinq veaux nouveau-nés semble montrer qu'il n'y a aucune contribution des lignées cellulaires embryonnaires à la formation de ces tissus.

Discussion

Ces travaux démontrent que les lignées cellulaires embryonnaires bovines sont au moins capables, après transplantation de noyaux, de diriger le développement durant l'organogenèse précoce. Les analyses utilisant des marqueurs de l'ADN révèlent que les lignées cellulaires embryonnaires participent à la formation des fœtus clonés par transfert nucléaire, ainsi qu'à la constitution des multiples types tissulaires d'un fœtus chimérique de 85 jours. Par contre, il ne paraît pas y avoir de contribution génétique de ces lignées à certains tissus (sang et peau) des veaux nouveau-nés.

Concernant les embryons clonés et les chimères, la cause exacte de l'interruption de certaines gestations n'est pas connue. Cependant, le développement déficient du placenta devrait jouer un rôle. D'après plusieurs auteurs (Melton *et al.*, 1951 ; King *et al.*, 1980), cités par Stice *et al.*, la formation des cotylédons se produit chez les bovins entre les 25^{ème} et 30^{ème} jours de gestation. Melton *et al.* (1951) ont par ailleurs montré que, jusque vers le 40^{ème} jour de gestation, l'embryon bovin est capable de survivre avec les seuls composants du milieu utérin, encore appelés « lait » utérin. Après cette période critique, des échanges fœto-maternels (nutriments, gaz) doivent nécessairement se produire via le placenta pour assurer la gestation. Dans cette étude, le moment des pertes fœtales coïncide avec le moment de la formation du placenta lors d'une gestation normale. Le fait d'observer des hémorragies des caroncules lors des gestations d'embryons clonés à partir d'embryons produits *in vitro* indique qu'il y a, certes, un début de réponse maternelle à la présence intra-utérine de ces embryons, mais souligne aussi que le placenta est structurellement déficient.

Les lignées cellulaires embryonnaires bovines de cette étude présentent des similitudes avec les lignées de cellules ES de souris établies par d'autres équipes. En effet, selon Stice *et al.*, Tsunoda et Kato (1993) ont constaté que les cellules ES de souris disposent également d'un potentiel limité lorsqu'elles sont utilisées comme source de noyaux donneurs dans une procédure de transplantation nucléaire. De fait, les embryons de souris ainsi reconstitués, au même titre que les embryons clonés à partir de lignées cellulaires embryonnaires bovines, sont capables de se développer *in vitro* jusqu'au stade blastocyste, mais comme chez les bovins, les gestations résultant du transfert de ces embryons à des receveuses s'interrompent rapidement. De la même façon, Nagy *et al.* (1993), cités par Stice *et al.*, ont montré que les cellules ES de souris ne sont pas plus aptes que les cellules embryonnaires bovines de cette expérience à diriger une formation normale des tissus placentaires.

L'emploi de lignées cellulaires embryonnaires bovines mâles et femelles comme source de noyaux donneurs pour le clonage (tableau 14) semble se traduire par des différences sexe-dépendantes. Ainsi, la lignée mâle (0761) conduit, après transfert de noyaux, à une plus

grande proportion d'embryons clonés se développant au delà de 40 jours de gestation que les lignées femelles (0713 et 0734). Chez la souris, d'après Stice *et al.*, Robertson *et al.* (1983) ont observé que les lignées ES mâles sont plus facilement obtenues et qu'elles maintiennent un caryotype plus stable que les lignées femelles. Similairement, cités par Stice *et al.*, Strelchenko *et al.* (1995) ont remarqué que les lignées cellulaires embryonnaires bovines femelles subissent de temps en temps des modifications de leur caryotype, avec, notamment, un accroissement de l'inactivation du chromosome X après 15 passages. Dans cette étude, des changements subtils dans la stabilité du génome des lignées cellulaires embryonnaires femelles expliqueraient donc peut-être les différences observées.

Enfin, le fait que les lignées cellulaires embryonnaires dérivent d'embryons de stade blastocyste ou morula ne semble avoir aucune influence.

3.3. Création de bovins transgéniques à partir de lignées de cellules ES

Chez les bovins, l'obtention de lignées totipotentes de cellules de type ES, outre la mise à disposition de noyaux identiques en grand nombre pour le clonage, serait également très utile pour la transgénèse (28). En effet, puisque chez la souris, ces cellules peuvent être aisément modifiées génétiquement *in vitro* (10, 14, 47), il serait intéressant d'effectuer de telles transformations ciblées du génome des cellules ES bovines avant de les cloner : la création de lignées de bovins transgéniques pourrait dès lors être envisagée (48, 61).

Après les différents échecs recensés chez les bovins (Strelchenko *et al.*, 1995 ; Stice *et al.*, 1996), les premiers mammifères nés par clonage d'une lignée de cellules ES sont l'œuvre de Campbell *et al.* (8). Ces derniers ont en effet cultivé *in vitro*, pendant plus de dix passages, des boutons embryonnaires de blastocystes de brebis. Des cellules prélevées au cours des différents repiquages, puis greffées dans des ovocytes énucléés, ont alors abouti, au terme d'une procédure complète de clonage par transplantation de noyaux, à la naissance d'un clone de cinq agnelles (dont les fameuses Megan et Morag, seules femelles de ce clone de cinq individus ayant réussi à atteindre l'âge adulte).

Au-delà de son intérêt biologique intrinsèque, cette expérience laisse surtout entrevoir la possibilité de manipuler les gènes des cellules ES avant de les cloner : dans cette expérience de Campbell *et al.* (1996), la période de culture *in vitro* des cellules ES avant le transfert nucléaire s'est effectivement avérée largement suffisante pour permettre la réalisation de modifications génétiques précises de ces cellules (8, 61).

Malgré les espoirs suscités par ces naissances, il faut cependant attendre 1998 pour que les premières lignées de cellules ES transgéniques soient obtenues dans l'espèce bovine. Ces recherches ont été menées par Cibelli *et al.* (14), qui sont parvenus à établir une méthode, utilisant le transfert de noyaux, pour produire de telles lignées transgéniques à partir de fibroblastes fœtaux bovins. Leur travail a été guidé par trois objectifs principaux. Il s'agissait en effet de :

- développer une procédure efficace pour créer des lignées de cellules ES bovines,
- tester *in vivo* la totipotence de ces lignées,
- mettre au point un procédé efficace pour réaliser des modifications génétiques de ces cellules.

Avant de relater cette expérience de Cibelli *et al.*, nous signalerons que celle-ci s'inscrit dans un cadre tout à fait particulier. Il y est effectivement question de la constitution de lignées de cellules ES bovines transgéniques, mais la méthode préférentiellement adoptée par les auteurs pour produire de telles lignées fait appel au clonage de cellules somatiques. Or, le

clonage somatique ne sera développé qu'ultérieurement. Il nous a pourtant semblé judicieux de faire figurer cette étude à ce niveau de notre travail, dans la mesure où c'est davantage l'établissement de lignées de cellules ES bovines transgéniques en vue de leur clonage qui nous intéresse, plutôt que la façon dont ces lignées sont obtenues. Cette précision confirme en tout cas que le clonage des cellules ES constitue une étape de transition incontournable dans la progression des techniques vers le clonage somatique.

Matériels, méthodes et résultats (figure 3)

1. Production de colonies de cellules présumées ES transgéniques à partir d'embryons bovins de stade blastocyste

Des boutons embryonnaires sont mécaniquement isolés depuis des blastocystes bovins produits *in vitro*, puis cultivés sur des couches de fibroblastes fœtaux de souris qui ne se divisent plus. De cette manière, 27 colonies de cellules présumées ES sont constituées. Certaines d'entre elles présentent la propriété de survivre sur ce milieu de culture *in vitro* pendant plus de 12 mois sans aucune différenciation. Les cellules de ces lignées sont caractérisées par un rapport noyau/cytoplasme élevé, une densité élevée en granules lipidiques cytoplasmiques, et de plus, elles n'expriment pas la cytokératine et la vimentine (marqueurs de la différenciation cellulaire).

50 à 100 cellules sont ensuite prélevées sur chacune des colonies de type ES ainsi établies, puis repiquées sur des couches cellulaires fraîches. L'introduction d'un gène étranger (cytomégalovirus- β -galactosidase-néomycine ; CMV- β -Geo) est alors réalisée par micro-injection individuelle d'ADN dans chacun des noyaux des cellules en culture de trois de ces lignées. Environ 500 à 1000 cellules peuvent être micro-injectées en 1 heure. 24 à 48 heures après la micro-injection, un marqueur positif de sélection (G418) est ajouté aux milieux de culture à raison de 150 μ g/mL. Au bout de 3 semaines de repiquages successifs et de sélection par le marqueur positif, les colonies effectivement transgéniques sont identifiées par amplification par PCR du gène β -galactosidase. Au total, 3753, 3508 et 3502 cellules micro-injectées ont respectivement permis d'obtenir seulement 5, 3 et 0 colonies ayant incorporé de façon stable le gène au sein de leur génome.

2. Production de colonies de cellules présumées ES transgéniques à partir de cellules somatiques

La méthode précédente ne permet pas de produire un grand nombre de lignées de cellules présumées ES transgéniques. Cibelli *et al.* ont donc développé une toute autre approche qui consiste à faire pénétrer par électrofusion le gène CMV- β -Geo dans des fibroblastes fœtaux bovins. Ces fibroblastes sont alors cultivés *in vitro* pendant 3 semaines en présence d'un marqueur positif de sélection (G418) à raison de 400 μ g/mL, puis sélectionnés sur la présence effective du transgène au sein de leur génome par amplification par PCR de la séquence codant pour le gène de la β -galactosidase. Les fibroblastes transgéniques sont ensuite fusionnés, par transfert nucléaire, avec des ovocytes receveurs énucléés, et les embryons reconstitués sont classiquement cultivés *in vitro* jusqu'au stade blastocyste. Les boutons embryonnaires de ces blastocystes sont finalement mécaniquement isolés, puis cultivés comme précédemment sur des couches de fibroblastes fœtaux de souris afin de produire des colonies de cellules transgéniques présumées ES.

En pratiquant de la sorte, les auteurs ont reconstitué 330 embryons par transplantation nucléaire de fibroblastes bovins en phase de division active. Après une période de culture *in*

vitro de 7,5 jours, ces 330 embryons reconstitués ont fourni 37 (11%) blastocystes, et des lignées de cellules présumées ES ont été établies à partir de 22 (59%) d'entre eux. Sur ces 22 lignées cellulaires, 21 se sont avérées positives pour le transgène après amplification par PCR du fragment β -galactosidase : la colonie négative provenait très probablement d'un fibroblaste néomycine-résistant qui aurait perdu le transgène au cours des divisions successives.

Les cellules transgéniques présumées ES obtenues par cette méthode présentent des caractères morphologiques ainsi que des marqueurs cytoplasmiques identiques à ceux de véritables cellules ES. Par ailleurs, les colonies constituées à partir de ces cellules sont capables de subir des passages en culture pendant plusieurs mois sans entamer aucune différenciation.

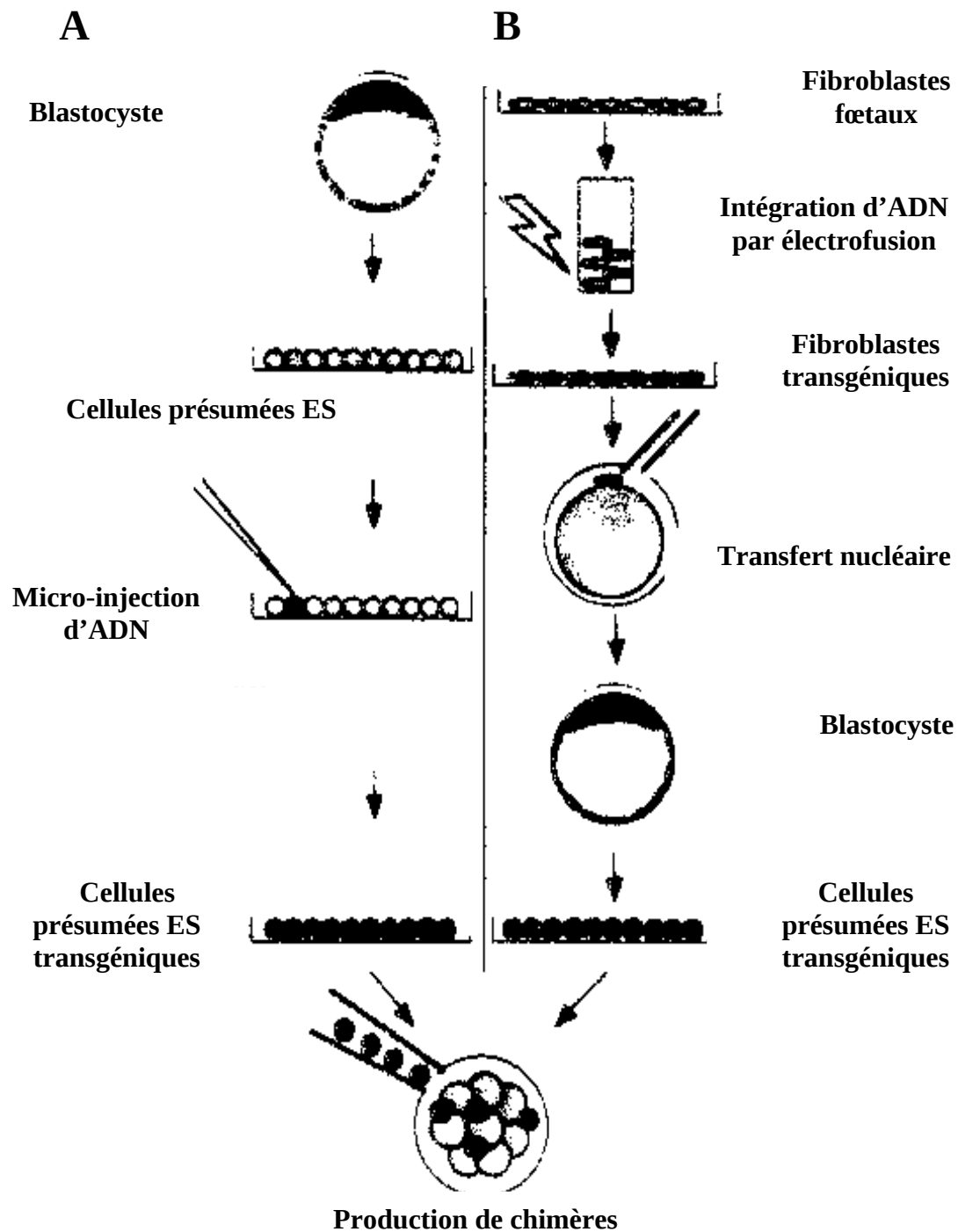


Figure 3 : Production de cellules présumées ES transgéniques bovines par micro-injection d'ADN (A) ou par transfert nucléaire de cellules somatiques (B) (14)



3. Production de veaux chimériques

Afin d'évaluer *in vivo* la totipotence de ces cellules transgéniques présumées ES dérivant d'embryons ou de fibroblastes, 8 à 10 cellules de chaque lignée sont introduites après 10 (cellules ES obtenues à partir d'embryons) ou 3 passages (cellules ES obtenues à partir de fibroblastes) dans des embryons produits *in vitro* et âgés de 3 jours. Ces embryons sont alors cultivés *in vitro* jusqu'au stade blastocyste (jour 7,5), puis transplantés chez des receveuses synchronisées. Respectivement cinq (cellules ES dérivant d'embryons) et sept veaux (cellules ES dérivant de fibroblastes), tous phénotypiquement normaux, naissent de ces manipulations (tableau 15).

Tableau 15 : Production de veaux chimériques à partir de cellules présumées ES transgéniques dérivant, soit d'embryons préimplantatoires, soit du transfert nucléaire de cellules somatiques (14)

Nombre d'embryons injectés	Nombre de blastocystes produits (%)	Nombre de blastocystes transférés	Nombre de veaux nés	Nombre de veaux transgéniques
----------------------------	-------------------------------------	-----------------------------------	---------------------	-------------------------------

Le premier objectif de cette étude était d'établir de véritables lignées de cellules ES bovines. Puisque les cellules d'une telle lignée sont issues de la masse cellulaire interne d'un embryon de stade blastocyste, elles doivent en retenir les caractéristiques morphologiques (rapport noyau/cytoplasme élevé, densité élevée du cytoplasme en granules lipidiques) et fonctionnelles (aucune expression de la vimentine et de la cytokératine, aucun signe de différenciation cellulaire même après de nombreux passages), ce qui est le cas ici.

Ensuite, après introduction dans un embryon de stade préimplantatoire, les lignées de cellules présumées ES créées dans cette expérience sont capables de coloniser aussi bien l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme que la lignée germinale à mesure que l'embryon hôte se développe et se différencie : elles sont donc totipotentes.

Ces résultats indiquent enfin que, bien qu'il soit possible d'effectuer directement par micro-injection des modifications génétiques des cellules ES bovines, des inconvénients portant sur le nombre relativement restreint de cellules pouvant être transformées, voire sur la lente croissance *in vitro* de ces cellules, limitent considérablement l'utilité de cette approche. Ceci constitue une différence majeure avec les cellules ES de souris : en effet, hormis le fait qu'il faille toujours prendre soin à éviter leur différenciation, les cellules ES de souris ont une croissance rapide en culture, et peuvent, avec une grande efficacité, intégrer au sein de leur génome des transgènes de taille plus importante que les cellules ES bovines (10).

Pour pallier ces obstacles, Cibelli *et al.* ont mis au point une méthode alternative pour réaliser des transformations génétiques ciblées des cellules ES bovines : ils modifient génétiquement des fibroblastes, puis utilisent ces cellules somatiques transgéniques pour la production, par transfert nucléaire, d'embryons d'où seront issues les lignées de cellules transgéniques présumées ES.

Les fibroblastes ont cet avantage sur les cellules ES d'être facilement transformables génétiquement et d'avoir une croissance rapide. Par ce procédé, l'obtention *in vitro* de cellules ES bovines génétiquement modifiées se trouve donc grandement simplifiée, et des applications aussi importantes que les thérapies par transplantation cellulaire de différentes maladies humaines peuvent dès lors être raisonnablement envisagées.

4. Les cellules somatiques

En supposant qu'il soit possible de les reprogrammer par transplantation nucléaire, l'utilisation de cellules déjà différenciées, prélevées sur un tissu, permettrait de disposer d'une source de noyaux très abondante pour le clonage des bovins. Ces cellules sont celles qui composent la plus grande partie d'un organisme fœtal ou adulte. Une simple biopsie de quelques millimètres carrés suffit alors pour constituer, après mise en culture, un stock de plusieurs milliers de cellules. En les utilisant comme source de noyaux donneurs dans une procédure de transfert nucléaire, on lèverait donc la limite imposée par le faible nombre de blastomères de chaque embryon lors de clonage embryonnaire (51, 52).

Ces cellules sont appelées cellules somatiques pour les distinguer des cellules germinales qui sont à l'origine des gamètes. L'opération de clonage correspondante est alors dénommée clonage somatique (51, 52).

4.1. Historique du clonage somatique

4.1.1. Travaux chez les amphibiens

Chez les amphibiens, le clonage par transplantation de noyaux de plusieurs types cellulaires somatiques différenciés dans des ovocytes ou des embryons énucléés a montré que la différenciation ne conduit pas forcément à un état nucléaire irréversible. D'après

Vignon *et al.* (65), DiBerardino (1980) rapporte effectivement que le transfert de noyaux issus de différents tissus (musculaires ou nerveux) de larves ou d'adultes autorise au moins un développement jusqu'au stade post-neurula. Des développements jusqu'aux stades suivants (têtards capables de se nourrir) sont également recensés, mais à des taux très faibles : d'après plusieurs auteurs (7, 12, 34, 42, 50), l'utilisation de noyaux de cellules épithéliales intestinales (Gurdon, 1962) ou de kératinocytes (Gurdon *et al.*, 1975) n'a permis d'obtenir au mieux, et seulement de façon occasionnelle (moins de 5% des embryons reconstitués), que des larves d'apparence normale, mortes avant de s'être transformées en adultes fertiles. Seules quelques expérimentations (Gurdon et Uehlinger, 1966 ; Muggleton-Harris et Pezzella, 1972 ; Kobel *et al.*, 1973), relatées par différents auteurs (50, 65), suggèrent que des adultes fertiles ont ainsi été produits, mais, soit il n'était pas certain que les animaux obtenus provenaient bien des noyaux transplantés, soit l'état de différenciation des cellules donneuses n'avait pas été confirmé par l'utilisation de marqueurs génétiques.

En tout cas, sur la base de ces travaux pionniers réalisés chez les amphibiens, la plupart des scientifiques se montraient initialement extrêmement sceptiques quant à d'éventuels succès du clonage somatique chez les mammifères (7, 43).

4.1.2. Les débuts du clonage somatique chez les mammifères

Selon Moens *et al.* (45), des blastocystes ont été produits dans différentes espèces de mammifères par transplantation nucléaire de cellules somatiques différenciées aussi diversifiées que des cellules de la granulosa (Collas et Barnes, 1994 ; Lavoie, communication personnelle), des fibroblastes fœtaux (Collas et Barnes, 1994) ou des thymocytes (Kono *et al.*, 1993). Seulement, les tentatives pour obtenir des fœtus normaux après transfert de ces embryons reconstitués chez des receveuses ont systématiquement échoué. Ceci amène à penser que, même si le noyau de plusieurs types de cellules somatiques différenciées peut être reprogrammé par transfert nucléaire, il apparaît en contrepartie incapable de contrôler le développement péri- et post-implantation des embryons clonés : la totipotence de telles cellules reste donc à démontrer.

4.1.3. La percée : Dolly

De nombreux auteurs (4, 6, 7, 11, 31, 42, 47, 50, 65) rapportent les travaux de Wilmut *et al.* (1997) ayant abouti, au cours de l'été 1996, à la naissance de la très médiatisée brebis Dolly. Par conséquent, il nous a paru utile d'exposer à notre tour les résultats de cette expérience, puisque ce succès procure le premier exemple de développement d'un mammifère depuis une cellule prélevée sur un tissu différencié adulte, et en ce sens, il est historique.

Ce travail de Wilmut *et al.* ne doit pas être considéré isolément. Avant Dolly, ces chercheurs écossais du Roslin Institute Midlothian d'Edimbourg avaient déjà fait naître Megan et Morag (8), et de nouvelles avancées étaient alors pressenties. Notamment, pour créer Dolly, ils reprennent une innovation technique mise en œuvre pour la première fois à l'occasion de leurs recherches ayant mené à Megan et Morag. Celle-ci consiste à placer pendant 5 jours, et avant la transplantation nucléaire, les cellules donneuses dans un milieu fortement appauvri en sérum. Cette diète rigoureuse, véritable traitement drastique (on n'est pas loin de l'état de mort cellulaire), a pour effet d'aboutir à un arrêt à peu près complet du cycle cellulaire (stade G0). Les cellules donneuses se trouvent alors dans une phase de quiescence qui, a priori, rendrait le noyau plus facilement accessible aux facteurs de reprogrammation ovocytaires, et permettrait un meilleur ajustement avec l'état interphasique du cytoplasme receveur.

Dans leur expérience ayant conduit à Dolly, Wilmut *et al.* ont en fait cherché à comparer l'aptitude au développement d'embryons reconstitués par transfert, dans des ovocytes receveurs, de noyaux donneurs provenant de trois types de cellules cultivées :

- des noyaux issus de cellules embryonnaires de type ES (semblables à celles utilisés pour obtenir les naissances de Megan et Morag) issues d'un embryon de 9 jours,
- des noyaux de cellules fœtales de type fibroblaste, isolées à 26 jours de gestation,
- des cellules d'épithélium de glande mammaire, prélevées sur une brebis de race Finn Dorset âgée de six ans.

Dans les trois cas, après transplantation des blastocystes clonés dans l'utérus de brebis porteuses, ils obtiennent des agneaux : quatre avec les noyaux embryonnaires, trois avec les noyaux fœtaux, et un à partir des noyaux adultes. Il leur a fallu pour cela reconstituer en tout plus de 800 embryons (834), dont près de 300 (277) avec les noyaux adultes.

Née le 05 juillet 1996 au terme d'une gestation de durée quasi-normale (5 mois), avec un poids quasi-normal (un peu plus de 6 kg), Dolly n'a jamais présenté aucun signe apparent d'une quelconque anomalie.

Se focalisant sur Dolly, les médias n'ont pas assez souligné l'autre résultat important de l'équipe écossaise, à savoir la production de trois agneaux à partir de fibroblastes d'un fœtus âgé de 26 jours. A lui seul, ce résultat aurait pu faire sensation. En effet, à ce stade de développement, un fœtus ovin est déjà un animal complètement différencié, avec la tête et les membres, le système nerveux, et tous les autres organes. A partir de là, il est désormais évident qu'un mammifère peut être fabriqué à partir de toute cellule somatique d'un organisme fœtal ou adulte, sans autre emprunt à une cellule sexuelle que le cytoplasme d'un ovocyte.

Autour de cette réussite, une polémique ne va pourtant pas tarder pas à voir le jour. En effet, certains contestent le fait que Dolly dérive réellement d'une cellule différenciée, dans la mesure où la brebis sur laquelle les cellules épithéliales mammaires ont été recueillies était gestante. En conséquence, il y avait possibilité de circulation de cellules souches fœtales indifférenciées dans le sang de cette brebis, et il ne pouvait donc pas être exclu de façon certaine que le tissu mammaire de la brebis donneuse n'ait pas été contaminé par ces cellules souches indifférenciées et que Dolly soit en fait issue d'une de ces cellules. Les mêmes remarques pouvaient être étendues aux agneaux obtenus à partir des tissus fœtaux, puisque les prélèvements avaient été effectués à un stade de développement où les cellules germinales sont encore en migration. Il faudra pratiquement attendre deux années et les travaux de Ashworth *et al.* (1998) et ceux de Signer *et al.* (1998), rapportés par Burny (4), pour que soit apportée, par différentes techniques de biologie moléculaire, la preuve irréfutable de l'origine somatique de Dolly et des trois agneaux clonés à partir de cellules fœtales.

Néanmoins, ces résultats de Wilmut *et al.* (1997) démontrent que des noyaux de cellules différenciées sont capables d'être reprogrammés, après introduction dans un ovocyte receveur, pour aboutir à la naissance de jeunes viables, ce qui représente un événement scientifique.

4.2. Les succès du clonage somatique dans l'espèce bovine

L'expérience précédente de Wilmut *et al.* (1997) appelle toutefois une confirmation de la capacité de reprogrammation des cellules somatiques différenciées des différentes espèces de mammifères, spécialement dans l'espèce bovine. Deux études ont particulièrement retenu notre attention :

Etude 1 (13)

Dans cette expérimentation de Cibelli *et al.*, des fibroblastes fœtaux bovins se divisant activement, et transformés génétiquement avec un gène marqueur (CMV- β -Geo), sont fusionnés, après sélection d'une lignée clonale, avec des ovocytes receveurs énucléés.

Contrairement aux travaux de Wilmut *et al.* (1997), les cellules donneuses ici utilisées ne sont pas quiescentes, mais se trouvent en phase de division active. Une majorité d'entre elles (56%) se situent par ailleurs en phase G1 du cycle cellulaire.

Les fibroblastes sont isolés d'un fœtus mâle âgé de 55 jours, cultivés *in vitro*, et génétiquement modifiés avant d'être sélectionnés sur l'intégration effective du transgène. Au total, 276 embryons sont reconstitués par transplantation nucléaire, et 33 blastocystes (12%) sont obtenus après une semaine de culture. 28 de ces blastocystes sont transférés chez 11 receveuses synchronisées. Six (55%) de ces vaches sont diagnostiquées gestantes par échographie réalisée 40 jours après le transfert nucléaire, et cinq (45%) le demeurent au 60^{ème} jour de gestation. Aucune gestation multiple n'a été initiée. Une vache avorte au 249^{ème} jour de gestation : son placenta présente une hydrallantoïde, un hydramnios, et des placentomes de taille augmentée. L'autopsie montre que le fœtus a une taille excessive (54 kg à 8 mois de gestation), des lobes pulmonaires étendus, et un ventricule cardiaque droit dilaté. Les quatre autres veaux se développent jusqu'à leur terme, et naissent après 277, 286, 287 et 289 jours de gestation. L'un de ces quatre veaux décède 5 jours après sa naissance d'une hypertension pulmonaire ayant conduit à une perfusion pulmonaire insuffisante. En concordance avec cette pathologie, l'animal présente un *ductus arteriosus*, un ventricule droit dilaté, une artère pulmonaire plus importante que l'aorte, ainsi que des vaisseaux ombilicaux trois fois plus gros que la normale. Le placenta associé à ce veau révèle également quelques anomalies comme une hydrallantoïde et des placentomes de taille anormalement importante. Les trois autres veaux sont phénotypiquement normaux, et aucune anomalie de placentation n'est constatée.

Les cinq veaux sont confirmés transgéniques par amplification par PCR d'un fragment du gène marqueur. De plus, après analyse par Southern blot des fragments d'ADN amplifiés, le site d'intégration du transgène s'avère être le même pour chacun de ces veaux, indiquant qu'ils dérivent tous de la même lignée clonale de fibroblastes.

Ces résultats démontrent, d'une part, qu'une population de cellules différenciées se divisant activement peut, après transplantation nucléaire, conduire à des développements à terme, même si les auteurs de cette étude n'ont pas su exactement déterminer quelle sous-population (G1, S, G2, M) a été à l'origine de ces développements. D'autre part, il apparaît, contrairement à ce qui se passe chez les ovins, que la quiescence induite par privation de sérum ne semble pas forcément nécessaire chez les bovins.

Etude 2 (65)

Matériels et méthodes

Dans cette étude, Vignon *et al.* utilisent deux sources différentes de noyaux donneurs :

- des cellules provenant d'un jeune veau femelle âgé de 2 semaines, prélevées par biopsie cutanée au niveau de l'oreille (cellules « adultes »),
- des cellules provenant de biopsies de peau et de muscle pratiquées sur des fœtus bovins âgés de 50 à 80 jours. Deux de ces fœtus sont transgéniques (gène marqueur de la luciférase de luciole).

Suite au prélèvement, les biopsies sont rincées plusieurs fois dans du PBS, puis mises en culture dans des boîtes de Pétri. Après 1 semaine, la biopsie est retirée de la boîte de culture, et les cellules ayant adhéré et proliféré sont trypsinées, puis réensemencées dans d'autres boîtes de culture dans les mêmes conditions. Tous les 3 jours (temps nécessaire pour un développement à confluence), les cellules sont alors dissociées par trypsination, puis remises en culture au tiers. Le reste des cellules est, soit congelé pour des analyses ultérieures, soit utilisé pour des caractérisations immunocytochimiques. A l'issue d'une période de culture *in vitro* de 2 semaines, jusqu'à 10 millions de cellules peuvent ainsi être obtenues. Dans cette expérience-ci, les cellules ont été maintenues en culture pendant 2 à 8 semaines (3 à 12 passages) avant d'être ensuite fusionnées individuellement avec des ovocytes matures énucléés.

Après le transfert nucléaire, les embryons reconstitués sont alors cultivés *in vitro* pendant 7 jours, et ceux qui atteignent le stade blastocyste sont transplantés chez des génisses receveuses synchronisées à raison d'un ou deux embryons par femelle. Après le transfert embryonnaire, les receveuses sont surveillées de façon biquotidienne afin de détecter d'éventuels retours en œstrus, et au 21^{ème} jour de gestation, les taux de progestérone plasmatique sont déterminés. Des échographies sont pratiquées aux 35^{ème}, 60^{ème} et 90^{ème} jours de gestation. Les femelles confirmées gestantes sont soigneusement suivies médicalement jusqu'à la mise-bas.

Par ailleurs, avant la procédure de transfert de noyaux, certaines cellules sont placées dans un état quiescent (G0) par privation en sérum du milieu de culture pendant 36 à 48 heures, tandis que d'autres sont utilisées tel quel (phase de prolifération cellulaire active).

Résultats

1. Caractérisation des cellules cultivées

Les cellules isolées des cultures de biopsies de peau et de muscle présentent, lorsqu'elles sont en phase de prolifération active, des cycles cellulaires similaires, mettant en moyenne 20 à 24 heures pour se diviser. A confluence, la morphologie bipolaire des cellules musculaires ressemble à celle de fibroblastes. Quand ces cellules sont cultivées pendant des périodes prolongées, elles sont capables de fusionner pour former des fibrilles musculaires. Un tel comportement n'est pas observé avec les cellules de peau, caractérisées par une morphologie moins fusiforme, plus hétérogène, et plus souvent multipolaire que les cellules musculaires.

En tout cas, pour éviter l'apparition de tels types cellulaires (qui entraîneraient la formation d'embryons polyploïdes après transfert nucléaire), les repiquages sont systématiquement effectués avant que les cellules cutanées et musculaires ne parviennent à confluence.

La caractérisation immunocytochimique (tableau 16) des cellules donneuses ici employées fait appel à des marqueurs cellulaires qui sont en fait des anticorps spécifiques des filaments cytoplasmiques ou nucléaires décrits ci-après :

- la vimentine, à la fois exprimée dans les cellules satellites (cellules impliquées dans la croissance et la réparation des fibres musculaires) des muscles adultes, les myoblastes des tissus fœtaux et les fibroblastes,
- la cytokératine 8/18, exprimée dans les cellules épithéliales,
- les lamines A/C, exprimées dans les cellules somatiques différenciées.

Tableau 16 : Caractérisation immunocytochimique des cellules donneuses (65)

Origine des cellules	Marqueurs		
	Vimentine	Cytokératine 8/18	Lamines A/C
Muscle	+	-	+
Peau	+	+/-	+

L'analyse des résultats du tableau 16 montre que les noyaux des cellules musculaires et cutanées sont bien marqués avec les anticorps anti-lamines A/C, confirmant que ces cellules sont clairement différenciées. Selon Vignon *et al.*, le fait que ces cellules soient rendues fortement fluorescentes par les anticorps anti-vimentine indique également que ces cellules provenant de biopsies de muscle et de peau adoptent en culture une morphologie très proche de celle des fibroblastes. Enfin, une faible proportion (5-10%) des cellules de peau est marquée par les anticorps anti-cytokératine 8/18, démontrant qu'un petit nombre de ces cellules cutanées cultivées présente une morphologie épithéliale, ce qui n'est pas constaté pour les cellules musculaires. Ceci dit, les auteurs signalent que, dans les conditions de l'expérience, ces cellules cutanées à allure épithéliale restent relativement dispersées au sein des cultures, et qu'en conséquence, elles ne sont pas aptes à évoluer selon de véritables couches épithéliales.

2. Développement *in vitro* des embryons reconstitués par transfert nucléaire (tableau 17 et 18)

La source des cellules somatiques ne semble pas affecter le taux de fusion moyen des cellules donneuses avec des ovocytes receveurs énucléés (63% pour des cellules d'origine musculaire et 60% pour des cellules issues de la peau). Pourtant, des variations importantes des taux de fusion sont enregistrées entre les différents lots de cellules dérivant de biopsies musculaires (54,0 à 74,2%) et cutanées (48,2 à 65,9%).

Le taux moyen de segmentation à 24 heures post-fusion est de 50% pour tous les types de cellules donneuses de noyaux avec, cependant, des variations plus importantes pour les embryons reconstruits avec des cellules musculaires (21,5 à 65,5%) par rapport à ceux reconstitués avec des cellules de peau (42,8 à 70,9%). Aucune corrélation évidente n'a pu être

établie entre le taux de clivage à 24 heures post-fusion et la capacité ultérieure des embryons à se différencier en blastocystes : à titre d'exemple, les embryons reconstitués à partir des cellules donneuses du fœtus BMF 102 présentent le taux moyen de segmentation à 24 heures le plus élevé (65,5%), mais forment des blastocystes avec une faible efficacité (3,0%), tandis que les embryons clonés à partir des cellules donneuses du fœtus BMF 2142 présentent un taux moyen de clivage légèrement plus bas (53,4%), mais en revanche, conduisent à trois fois plus de blastocystes (9,1%).

Après 7 jours de coculture, un taux significativement plus élevé de blastocystes est obtenu à partir des embryons issus du transfert nucléaire de cellules fœtales de peau par rapport à ceux dérivant de cellules fœtales musculaires ou de cellules adultes (respectivement 8,3%, 4,1% et 2,9%). Il apparaît également plus facile de produire au moins un blastocyste dans chaque expérience impliquant des cellules fœtales de peau (80% des expériences fournissent au moins un blastocyste) que dans celles impliquant des cellules adultes (25% seulement).

Parallèlement, a été comparée l'aptitude des noyaux de cellules quiescentes ou prolifératives à être reprogrammés après transplantation nucléaire (tableau 18). Il semble que l'utilisation de cellules donneuses en phase de multiplication (50 à 60% des cellules sont à un moment donné en phase S) ou en phase de quiescence (phase G0) n'affecte pas le développement des embryons reconstitués jusqu'au stade blastocyste. En effet, quel que soit le stade du cycle cellulaire de la cellule donneuse (G0 ou S), des taux identiques de formation des blastocystes sont relevés : 4% pour les cellules fœtales musculaires en phase G0, et 5,4% pour celles se trouvant en phase S. La même observation est faite pour les cellules fœtales de peau.

Tableau 17 : Développement *in vitro* d'embryons reconstitués par transfert nucléaire de trois types différents de cellules somatiques bovines (65)

Origine des cellules	Référence de la souche cultivée (nombre de passages)	Nombre d'embryons		Nombre de morulae (% d'embryons reconstitués)	Nombre de blastocystes (% d'embryons reconstitués)
		reconstitués	segmentés (%)		
Muscle fœtal (50-80 jours de gestation)	BMF 102 (3 à 5)	264	173 (65,5)	14 (5,3)	8 (3,0)
	BMF 2142 (5 à 7)	88	47 (53,4)	9 (10,2)	8 (9,1)
	BMF 205 (3 à 6)	130	28 (21,5)	5 (3,8)	3 (2,3)
	BMF 237 (5 à 9)	176	80 (45,4)	9 (5,1)	8 (4,5)
	Total	658	328 (49,8)	37 (5,6)	27 (4,1) ^a
	BSF 102 (9 à 12)	138	75 (54,3)	17 (12,3)	16 (11,6)
	BSF 205 (5 à 8)	77	33 (42,8)	4 (5,2)	3 (3,8)
Peau fœtale (50-80 jours de gestation)	BSF 236 (3)	31	22 (70,9)	4 (12,9)	4 (12,9)
	BSF 237 (5)	55	26 (47,2)	3 (5,4)	2 (3,6)
	Total	301	156 (51,8)	28 (9,3)	25 (8,3) ^b
	OV 7711 (6 à 8)	382	180 (47,1)	19 (4,9)	11 (2,9) ^a
Peau de veau (âgé de 2 semaines)					

^{a, b} Les taux de formation des blastocystes présentant des exposants différents au sein de cette même colonne sont significativement différents (test χ^2 , $P < 0,01$).

Tableau 18 : Nombre de gestations initiées après transfert nucléaire de cellules somatiques bovines se trouvant en phase de quiescence (G0) ou en phase de multiplication (S) (65)

Type de cellules (nombre d'expériences)	Etat de la cellule donneuse au moment du transfert nucléaire	Nombre de blastocystes		Nombre de gestations initiées (jour 35)
		produits à partir des embryons reconstitués (%)	transférés chez des receveuses	
Muscle fœtal (50-80 jours de gestation) (6)	quiescent	3/74 (4,0)	3	0
	multiplication	4/74 (5,4)	4	2
Peau fœtale (50-80 jours de gestation) (9)	quiescent	5/222 (2,2)	5	1
	multiplication	8/191 (4,1)	8	2

3. Développement *in vivo* (tableau 19)

61 blastocystes développés *in vitro* sont transplantés chez 35 génisses receveuses. Des échographies réalisées au 35^{ème} jour de gestation permettent de diagnostiquer l'établissement de neuf (26%) gestations. Deux fœtus (un de chaque groupe, musculaire et cutané) sont perdus avant le 60^{ème} jour de gestation. Une autre receveuse portant des jumeaux avorte aux alentours du 234^{ème} jour de gestation : un des fœtus était hydropique et de grande taille, mais l'autre était parfaitement normal. Finalement, sur les six gestations restantes, quatre veaux sont obtenus : une femelle Limousine (Marguerite) de 48 kg issue d'une cellule fœtale musculaire, un mâle de type croisé Holstein (Narcisse) de 45 kg provenant également d'une cellule fœtale musculaire, un autre mâle (Lucifer) de 53 kg provenant d'une cellule de peau fœtale transgénique, et un dernier veau (Dermine) né de la transplantation du noyau d'une cellule de peau « adulte ».

L'analyse de l'ADN de ces veaux par des séquences microsatellites atteste que ceux-ci dérivent bien des cellules somatiques utilisées lors du transfert de noyaux.

Il est à remarquer que des gestations ont pu être initiées (jour 35) après transfert à des receveuses d'embryons reconstitués à partir de cellules donneuses se trouvant en phase de quiescence (G0) ou de prolifération active (S) (tableau 18). Parmi les naissances recensées, Marguerite, Narcisse et Dermine ont été produits à partir de cellules quiescentes, tandis que Lucifer a pour origine une cellule en phase de prolifération active. Ces résultats semblent indiquer que l'aptitude au développement d'embryons reconstitués à partir de cellules somatiques en phase de quiescence ou en phase de multiplication ne diffère pas.

Tableau 19 : Développement *in vivo*, après transfert chez des receveuses, de blastocystes produits par transplantation nucléaire de différents types de cellules somatiques bovines (65)

Origine des cellules	Nombre de blastocystes transplantés	Nombre de receveuses		Nombre de fœtus confirmés vivants par échographie		
		Total	Gestantes à 21 jours (%)	jour 35	jour 60	> jour 90
Muscle fœtal	27	14	9 (64,2)	5	4	4
Peau fœtale	25	15	6 (40,0)	3	2	2
Peau de veau	29	6	2 (33,3)	1	1	1

Discussion

Par ce travail, Vignon *et al.* démontrent à leur tour que des noyaux de cellules somatiques différenciées bovines peuvent être complètement reprogrammés par transfert nucléaire.

L'autre intérêt de cette étude réside dans la comparaison du potentiel de développement des embryons clonés à partir de cellules donneuses quiescentes (phase G0) ou prolifératives (phase de croissance S). La quiescence provoquerait des modifications de la structure chromatinienne des noyaux des cellules donneuses, facilitant la reprogrammation de leurs gènes par des ovocytes receveurs. Pourtant, les auteurs n'observent ici aucune différence significative dans les développements *in vitro* et *in vivo* des embryons reconstitués par transfert de noyaux de cellules quiescentes ou prolifératives dans des ovocytes matures énucléés. Comme cela a déjà été évoqué (13), ceci indique que, lors de clonage, l'induction d'un état de quiescence des cellules somatiques bovines n'est pas indispensable.

4.3. Espoirs

Les succès précédents (13, 65) concernent essentiellement la reprogrammation complète par transplantation nucléaire de cellules fœtales différenciées bovines. Toutefois, sur la base de ces réussites, l'extension de la technique de clonage somatique à des cellules donneuses prélevées sur des animaux jeunes et adultes a depuis été réalisée chez les bovins.

De façon assez spectaculaire, Kato *et al.* (1998), cités par plusieurs auteurs (55, 56), obtiennent ainsi un clone de huit veaux après transplantation de noyaux de cellules somatiques recueillies sur un même adulte. En France, des cellules de peau isolées d'une biopsie d'oreille d'un veau de 15 jours, cultivées *in vitro*, puis utilisées comme source de noyaux donneurs, conduisent à la naissance d'un veau unique (56). Plus récemment encore, plusieurs auteurs (2, 55) rapportent les travaux de Wells *et al.* (1999) qui produisent également des veaux clonés par transfert nucléaire de cellules adultes de la granulosa.

Contrairement au clonage embryonnaire, la possibilité d'engendrer des animaux viables par transfert de noyaux de cellules somatiques bovines, qui peuvent être maintenues en culture, présente un grand nombre d'avantages qui incluent (6, 47, 50, 65) :

- l'obtention d'un grand nombre d'animaux identiques sur une longue période, les cellules cultivées pouvant être congelées et stockées,
- la potentialité, avant la transplantation nucléaire, de sélectionner des populations de cellules ayant un génotype ou un phénotype requis et/ou, surtout, de modifier génétiquement les noyaux au cours de la période de culture, avec en toile de fond l'application à la transgénèse des bovins.

Le gros inconvénient du clonage somatique des bovins réside dans le faible rendement de cette technique, l'efficacité globale étant généralement comprise entre 0,3 et 2% (13, 42, 51, 52, 55, 56, 65). Malgré tout, compte tenu du nombre élevé de noyaux somatiques de même génotype (plusieurs milliers) qui peuvent être utilisés comme source de noyaux donneurs, même après une courte période de culture, on considère que le rendement (nombre de veaux nés/nombre d'embryons reconstitués) de 10% actuellement recensé avec les noyaux embryonnaires suffirait pour que chaque génotype puisse être employé avec le potentiel de multiplication désiré (16).

B. CONGELATION DES EMBRYONS CLONES

Dans l'espèce bovine, la congélation des embryons clonés n'est encore pas complètement maîtrisée, les embryons produits *in vitro* restant beaucoup plus sensibles à la cryoconservation que ceux produits *in vivo* (27). Pourtant, la congélation des embryons clonés offrirait des perspectives intéressantes.

D'une part, certains embryons clonés pourraient être congelés pour, nous l'avons vu, servir à leur tour de réserve de cellules pour des cycles supplémentaires de transplantation de noyaux (47). A titre d'exemple, Heyman *et al.* (31) relatent les travaux de Peura *et al.* (1998) qui, en combinant plusieurs générations de transfert nucléaire ainsi qu'une technique de congélation par vitrification (selon la méthode décrite en 1997 par Vajta *et al.*), parviennent à produire plus de 50 embryons bovins clonés en trois cycles de transfert de noyaux. Avec un procédé comparable, Lewis *et al.* (44) réussissent même à faire naître un veau à partir d'un deuxième cycle de clonage. Ceci dit, jusqu'à aujourd'hui, trop peu de veaux sont nés après transplantation d'embryons recyclés plusieurs fois et vitrifiés pour conclure sur l'efficacité de cette association (31).

D'autre part, associée au transfert embryonnaire, la cryoconservation des embryons clonés permettrait d'accroître le potentiel des techniques de multiplication des embryons dans l'élevage bovin (44). Ceci est d'autant plus vrai que la mise au point récente d'une méthode de réhydratation directe des embryons clonés congelés à l'intérieur des paillettes autorise, avec une relative simplicité, l'implantation directe de ceux-ci dans l'utérus de femelles receveuses, sans diminution importante de leur capacité développementale (3).

C. CLONAGE ET SEXAGE

Selon l'objectif retenu pour l'utilisation ultérieure des clones de bovins (schémas de sélection, modèles animaux pour la recherche...), il est très important de pouvoir produire au choix, soit un clone de mâles, soit un clone de femelles (29, 41). En pratique courante, l'une des difficultés du sexage, lors de transfert embryonnaire, réside dans la biopsie de cellules. Il convient en effet d'effectuer cette biopsie avant la transplantation, sans altérer la viabilité de l'embryon. De plus, le nombre de cellules prélevées n'est pas maîtrisé (27).

En revanche, il est très facile d'employer la technologie du sexage au cours d'une opération de clonage embryonnaire, puisqu'il est possible d'isoler une cellule au moment de la dissociation de l'embryon donneur. Cette cellule est alors placée dans un tampon de lyse, puis l'ADN de son noyau est amplifié par PCR en présence d'amorces qui vont délimiter une séquence spécifique du chromosome Y. La révélation se fait par électrophorèse sur gel d'agarose, après coloration au bromure d'éthidium. La lecture en fonction du nombre de bandes (deux bandes = mâle ; une bande = femelle) permet d'identifier le sexe (27, 47).

Cette approche présente plusieurs intérêts. D'une part, il a été montré (tableau 20) qu'une seule cellule suffit à déterminer le sexe avec la même efficacité qu'après une biopsie de cinq ou dix cellules lors de transfert embryonnaire : on peut donc réserver un maximum de cellules de l'embryon donneur pour la transplantation nucléaire (27, 29). Ensuite, cette méthode ne nécessite pas de biopsie supplémentaire, car on profite de la dissociation de l'embryon donneur pour prélever une seule cellule (29, 41, 47). Enfin, la période de culture *in vitro* de 7 jours de l'embryon reconstitué laisse largement le temps d'effectuer le diagnostic du sexe (qui dure à peu près 3 heures) avant la transplantation chez une receveuse, et dès que le résultat du sexage est connu, on peut donc décider de ne transférer que les clones de blastocystes issus d'embryons donneurs correspondant au sexe désiré (27, 29, 41).

En associant ces deux technologies du clonage et du sexage, l'INRA a réussi à faire naître, en 1994, deux premiers clones de quatre veaux mâles pour des besoins expérimentaux (tableau 21) (27, 29, 41).

Bientôt, le diagnostic réalisé à partir d'une seule cellule embryonnaire ne devrait pas se limiter au sexage. Il devrait être également possible de repérer un certain nombre d'anomalies telles que le BLAD (bovine leucocytes adhesion deficiency), et par conséquent, d'éliminer les embryons porteurs pour ne cloner que les embryons sains au génotype caractérisé (29, 41).

Mais, compte-tenu de l'importance croissante du clonage somatique, qui devient largement plus pratiqué que le clonage embryonnaire, il convient toutefois de relativiser ce qui précède. En effet, le diagnostic du sexe ne constitue un problème qu'en cas de clonage embryonnaire. Lors de clonage somatique, le diagnostic du sexe ne sert, par définition, à rien. Pour le diagnostic de maladies telles que le BLAD, la question peut par contre se poser en cas de clonage somatique, mais il « suffit » alors de tester l'adulte à cloner.

Tableau 20 : Efficacité de la détermination du sexe de l'embryon donneur selon le nombre de cellules prélevées (29)

Nombre de cellules prélevées	Nombre d'embryons utilisés	Nombre d'embryons sexés	Efficacité
1	10	9/10	90%
2	17	15/17	88%
3	12	10/12	83%
>5	12	11/12	92%
Total	51	45/51	88%

Tableau 21 : Résultat des transplantations de blastocystes clonés issus de cinq embryons mâles (27, 29, 41)

Série de transfert	Nombre d'embryons	Nombre de receveuses	Nombre de gestations	Nombre de vêlages	Veaux nés vivants
1	3	3	1/3	1/3	1 mâle
2	4	4	0/4	0/4	-
3	13	7	4/7*	3/7	4 mâles
4	7	4	3/4	3/4	4 mâles
5	3	2	1/2	0/2	-
Total des 5 séries	30	20	9/20 (45%)	7/20 (35%)	9/30 (30%)

*Un avortement à 5 mois de gestation (2 fœtus mâles)

➤ POINTS FORTS A RETENIR :

- Lors d'une procédure de clonage embryonnaire menée dans l'espèce bovine, le nombre de développements à terme qui peuvent être obtenus à partir d'un seul embryon est limité (par le nombre restreint de cellules de cet embryon, et aussi par la faible efficacité de la technique de transfert nucléaire). A ce jour donc, la taille des clones issus d'embryons donneurs de stade précoce reste peu importante (en moyenne, deux veaux nés par embryon donneur utilisé pour le clonage) : ceci constitue un frein certain aux diverses applications du clonage des bovins, notamment en recherche ou en sélection.
- L'essor du clonage par transfert nucléaire chez les bovins semble donc passer par l'utilisation de nouvelles sources de noyaux donneurs, plus abondantes (cellules germinales primordiales, cellules souches embryonnaires, cellules somatiques), voire aussi par l'utilisation du reclonage.
- Le principe du reclonage consiste à recycler une partie des embryons issus d'une première génération de transfert nucléaire, c'est-à-dire à les recycler à leur tour comme donneurs de noyaux pour effectuer un clonage de deuxième (ou de troisième) génération, au lieu de les transplanter dans une receveuse. Le reclonage ouvre des perspectives intéressantes pour obtenir, avec une bonne probabilité (environ 60%), des clones de deux à cinq veaux à partir d'un embryon donné.
- Peu de veaux sont nés suite au clonage de cellules germinales primordiales bovines : de plus, les rendements associés étaient très faibles (inférieurs à 1%) comparés à ceux du clonage embryonnaire. D'emblée, cette faible efficacité constitue un facteur limitant à l'utilisation en routine des cellules germinales primordiales comme source de noyaux donneurs pour le clonage par transfert nucléaire des bovins.
- Si des veaux sont nés suite au transfert de noyaux de cellules souches embryonnaires bovines dans des ovocytes receveurs énucléés (avec, cependant, des rendements globaux inférieurs à 1%), les lignées cellulaires non différenciées obtenues par multiplication *in vitro* de ces cellules ne sont, quant à elles, pas capables, après transplantation nucléaire, de diriger le développement au delà de l'organogenèse précoce.
- Les cellules somatiques sont celles qui composent la plus grande partie d'un organisme fœtal ou adulte. Une simple biopsie de quelques millimètres carrés suffit alors pour constituer, après mise en culture, un stock de plusieurs milliers de cellules : en utilisant ces cellules comme source de noyaux donneurs dans une procédure de transfert nucléaire, on lève donc la limite imposée par le faible nombre de cellules de chaque embryon donneur lors de clonage embryonnaire. Même si l'efficacité globale du clonage somatique des bovins est faible (comprise entre 0,3 et 2%), cette approche permet, contrairement au clonage embryonnaire, d'obtenir un grand nombre d'individus identiques sur une longue période (les cellules cultivées pouvant être congelées et stockées) et, surtout, de modifier génétiquement les noyaux au cours de la période de culture avec, en toile de fond, l'application à la transgénèse des bovins.

III. RENDEMENTS ET POTENTIALITES DE DEVELOPPEMENT DU CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS

A. EFFICACITE GLOBALE DU CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS

1. Clonage embryonnaire chez les bovins : revue non exhaustive

Tableau 22 : Efficacité du clonage embryonnaire chez les bovins (12, 16, 28, 53, 54)

Embryons donneurs	4-16 cellules	16-64 cellules	8-64 cellules	16-32 cellules	16-70 cellules	32-64 cellules
Référence	Prather <i>et al.</i> (1987)	Bondioli <i>et al.</i> (1990)	Willadsen <i>et al.</i> (1991)	(1)	(12)	Heyman et Renard (1996)
Nombre d'embryons reconstitués	185	1123	n.d.	840	641	152
Nombre de blastocystes obtenus (%)	23 (12)	280 (25)	n.d.	161 (19,1)	152 (23,7)	47 (30,9)
Nombre d'embryons transplantés	n.d.	n.d.	n.d.	125	59	45
Nombre de jeunes nés (%)	2 (n.d.)	92 (n.d.) 8 clones	101 (n.d.) 4 clones	27 (21,6)	9 (15,2)	15 (33,3)
Rendement*	n.d.	n.d.	n.d.	4,1%	3,6%	10,0%

* Rendement = (% de blastocystes obtenus) x (% de jeunes nés)

Depuis la naissance du premier veau produit par transfert de noyaux embryonnaires (Prather *et al.*, 1987), des progrès considérables ont été réalisés sur le plan

technique (maturation *in vitro* des ovocytes, culture *in vitro* des embryons reconstitués et micromanipulations) et sur le plan fondamental (étude des interactions noyau/cytoplasme), permettant d'accroître, au cours des dernières années, l'efficacité du clonage embryonnaire par transfert nucléaire (42). Aujourd'hui, en moyenne 10% des embryons reconstitués à partir de noyaux embryonnaires peuvent donner naissance à un veau (16, 51, 52, tableau 22).

2. Clonage somatique chez les bovins : revue non exhaustive

Tableau 23 : Efficacité du clonage somatique chez les bovins (13, 16, 40, 55, 56, 65)

Source de noyaux (cellules cultivées)	Fibroblastes fœtaux		Cellules fœtales de muscles	Cellules fœtales de peau	Cellules adultes de peau		Cellules du cumulus et de l'épithélium de l'oviducte	Cellules de la granulosa
Référence	(13)	(40)	(65)	(65)	(65)	(56)	Kato <i>et al.</i> (1998)	Wells <i>et al.</i> (1999)
Nombre d'embryons reconstitués	276	1896	658	301	382	175	141	552
Nombre de blastocystes obtenus (%)	33 (12)	87 (4,6)	27 (4,1)	25 (8,3)	11 (2,9)	13 (7,4)	38 (26,9)	152 (27,5)
Nombre d'embryons transplantés	28	79	27	25	9	6	10	100
Nombre de jeunes nés (%)	4 (14,3)	6 (7,6)	2 (7,4)	1 (4,0)	1 (11,1)	1 (16,6)	8 (80,0)	10 (10,0)
Rendement*	1,4%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,6%	5,7%	1,8%

* Rendement = (Nombre de jeunes nés) / (nombre d'embryons reconstitués)

Au vu du tableau 23, il ressort que les taux de naissances obtenus avec des cellules somatiques cultivées sont encore très faibles : 0,3 à 1,4% avec les cellules fœtales, et à peine

plus avec les cellules adultes (0,3 à 1,8%). Néanmoins, il apparaît que des rendements élevés peuvent être parfois atteints puisque, selon plusieurs auteurs (55, 56), Kato *et al.* (1998) ont réussi à faire naître huit veaux après transfert chez des receveuses de seulement dix blastocystes de même génotype. Ce résultat montre que le clonage somatique pourrait, dans certaines conditions, être d'une grande efficacité.

B. DEVELOPPEMENT IN VITRO DES EMBRYONS BOVINS CLONES

1. Développement in vitro des embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux embryonnaires

1.1. Efficacité moyenne

Chez les bovins, dans l'état actuel des techniques employées pour la transplantation nucléaire à partir d'embryons frais âgés de 5 à 6 jours et de cytoplasmes préparés à partir d'ovocytes maturés *in vitro*, on peut considérer qu'en moyenne 75% des embryons reconstitués par électrofusion sont capables de reprendre leur segmentation (29). Après 7 jours de coculture, 10 à 40% des embryons reconstitués sont capables de se développer jusqu'au stade blastocyste compatible avec le transfert dans l'utérus d'une femelle receveuse (27, 28, 29, 41, 47, 53, 58). Malgré les efforts consentis pour mettre au point des conditions de culture *in vitro* optimales, les taux moyens de développement jusqu'au stade blastocyste plafonnent entre 30 et 40% (35).

D'après plusieurs auteurs (29, 41), une étude réalisée par Heyman *et al.* (1994) révèle que l'aptitude au développement des embryons bovins issus de greffe nucléaire est du même ordre que celle d'embryons témoins produits par fécondation *in vitro* (tableau 24).

D'autre part, le stade de développement de l'embryon donneur ne semble pas influencer l'efficacité moyenne du développement *in vitro*, puisque la proportion de blastocystes formés n'est pas significativement différente, que la morula donneuse se trouve dans son cinquième cycle (16-32 cellules) ou dans son sixième cycle (33-64 cellules) de division (12), même si, pour d'autres auteurs (75, 76 ; voir plus loin), il apparaît souhaitable d'être plus nuancé. Si l'embryon donneur est lui-même produit *in vitro*, le taux de développement des embryons reconstitués n'est pas davantage affecté (41).

On retiendra enfin que la mortalité des embryons clonés augmente rapidement avec le temps de culture (53, 54).

Tableau 24 : Développement *in vitro* d'embryons bovins clonés à partir de différentes sources de noyaux embryonnaires : comparaison avec le développement d'embryons témoins issus de fécondation *in vitro* (29, 41)

Embryon donneur	Nombre d'embryons reconstitués	Fusion (%)	Clivage (%)	Blastocystes (%)
<i>In vivo</i> frais	621	497/621 (80,0)	375/497 (75,4)	150/497 (30,2) ^a
<i>In vitro</i>	214	181/214 (84,5)	128/181 (70,7)	41/181 (22,6) ^b
<i>In vivo</i> refroidi	236	189/236 (80,0)	142/189 (75,1)	48/189 (25,4) ^b
<i>In vivo</i> congelé	208	154/208 (74,0)	100/154 (64,9)	11/154 (7,1) ^c
Témoin FIV	inséminés 704	fécondés 657/704	clivés 589/657	222/657 (33,8) ^d

^{a,b,c} Test χ^2 par colonne : les taux de formation des blastocystes présentant des exposants différents au sein de cette même colonne sont significativement différents (a vs b,d : non significatif ; a vs c : P < 0,005 ; b vs c : P < 0,005 ; b vs d : P < 0,05).

1.2. Qualité morphologique des blastocystes clonés

Les blastocystes bovins développés *in vitro* après transfert de noyaux présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que les embryons issus de fécondation *in vitro*. En effet, après analyse par comptage cellulaire et évaluation morphologique utilisant la microscopie électronique, il s'avère qu'ils sont constitués d'un nombre semblable de cellules à l'âge de 7 jours (respectivement $82,86 \pm 5,35$ cellules et $88,89 \pm 7,53$ cellules par embryon pour les embryons clonés et ceux obtenus par FIV) (27, 28, 29). Ils ne sont pas non plus différents des embryons FIV en termes de cinétique de développement ou de degré de différenciation : il faut alors avoir recours à l'ultrastructure pour déceler éventuellement quelques signes de dégénérescence dans les cellules de la masse cellulaire interne des blastocystes clonés, susceptibles, d'ailleurs, d'expliquer leur plus faible viabilité après transplantation chez des receveuses (27, 28, 29).

2. Développement *in vitro* des embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux somatiques

2.1. Efficacité moyenne

Les taux de fusion obtenus après clonage de cellules somatiques bovines sont comparables à ceux recensés lors de clonage embryonnaire, et de plus, ils ne semblent pas affectés par la source de cellules somatiques (42).

Dans certaines conditions expérimentales actuellement en cours de définition, il apparaît que la greffe de noyaux de cellules somatiques bovines cultivées dans des ovocytes receveurs peut conduire à un taux de formation élevé des blastocystes (plus de 30% à partir de cellules fœtales), ce qui révèle un important pouvoir de reprogrammation de l'activité des gènes par le cytoplasme de l'ovocyte (16, 52). Récemment, l'évolution la plus marquée concerne le taux de blastocystes formés à partir de cellules somatiques bovines prélevées sur des animaux « adultes », et non plus seulement sur des fœtus. Ce taux devient proche de celui qui est obtenu lors de fécondation *in vitro* (tableau 25), alors qu'il était encore très faible dans les publications rapportant les premiers succès du clonage somatique chez les bovins (55).

Tableau 25 : Développement *in vitro* d'embryons bovins clonés à partir de différentes sources de noyaux de cellules somatiques cultivées (55)

Etat des cellules (référence)	Nombre d'embryons reconstitués	Nombre d'embryons atteignant le stade	
		morula (%)	blastocyste (%)
Quiescent			
• (Kato <i>et al.</i> , 1998)	552	383 (69,4)	152 (27,5)
• (Wells <i>et al.</i> , 1999)	141	60 (48,0)	38 (26,9)
En prolifération (60 à 70% de confluence)			
• (13)	276		33 (11,9)

2.2. Qualité morphologique des blastocystes clonés

D'après Renard *et al.* (55), Zakhartchenko *et al.* (1999) ont montré que, chez les bovins, les blastocystes reconstitués par transfert de noyaux somatiques présentent un nombre de cellules identique à celui des embryons produits par fécondation *in vitro*, tant pour le bouton embryonnaire que pour le trophoblaste.

3. Facteurs de variation du rendement *in vitro*

3.1. Variabilité du développement *in vitro* des embryons reconstitués

Chez les bovins, à partir d'un embryon donneur de stade morula, il est, en moyenne, aujourd'hui possible de produire *in vitro* un clone de $6,18 \pm 3,52$ blastocystes aptes à être transférés (27, 41, 47). Toutefois, ceci recouvre une grande variabilité selon les séries d'embryons donneurs. Ainsi, si un tiers des morulae ne génèrent pas plus de deux blastocystes après transfert nucléaire, à l'opposé, près de 10% des embryons donneurs sont capables d'engendrer chacun au moins une dizaine de blastocystes (12, 27, 29, 47). Il faudrait pouvoir « repérer » ces embryons donneurs à fort potentiel, car ce sont eux qui permettront de produire des clones de veaux de taille raisonnable, utilisables à des fins de sélection (12, 27, 41).

Cette variabilité du développement *in vitro* est en quelque sorte illustrée par la figure 4 qui présente, à l'occasion de travaux réalisés par Heyman *et al.* (données non publiées), la distribution du nombre de blastocystes transplantés chez des receveuses par embryon donneur au stade morula (40 à 60 cellules environ). Il est à noter que, dans cette expérience, une partie des blastocystes clonés a servi pour un deuxième cycle de transplantation nucléaire (reclonage), justifiant certains résultats comme par exemple l'obtention de plus de 30 blastocystes à partir d'un seul embryon donneur.

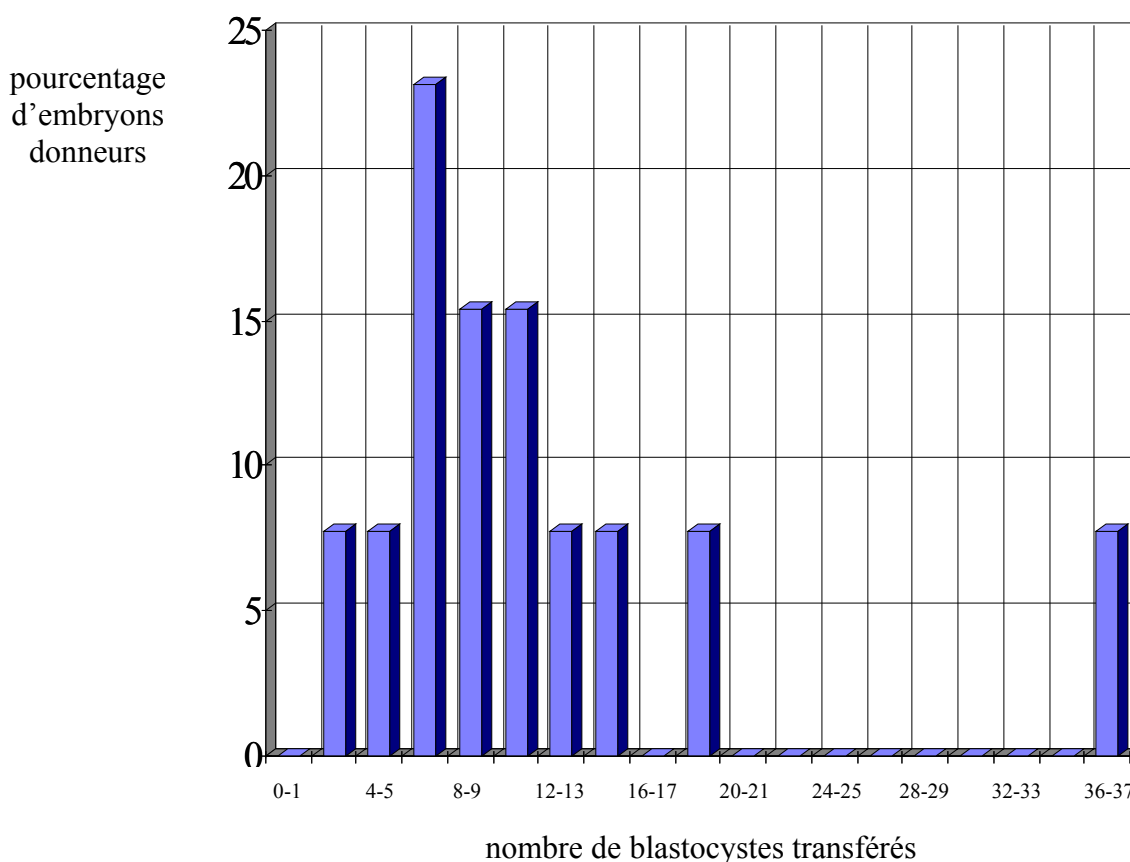


Figure 4 : Variabilité du nombre de blastocystes clonés transférés chez des receveuses selon l'embryon donneur de noyaux (d'après Heyman *et al.*, données non publiées) (16)

3.2. Influence du cycle cellulaire sur le rendement du clonage

3.2.1. Rappels sur le cycle cellulaire

3.2.1.1. Le cycle mitotique (Métézeau *et al.* (1994) et Etienne (1998), d'après Fréret (22))

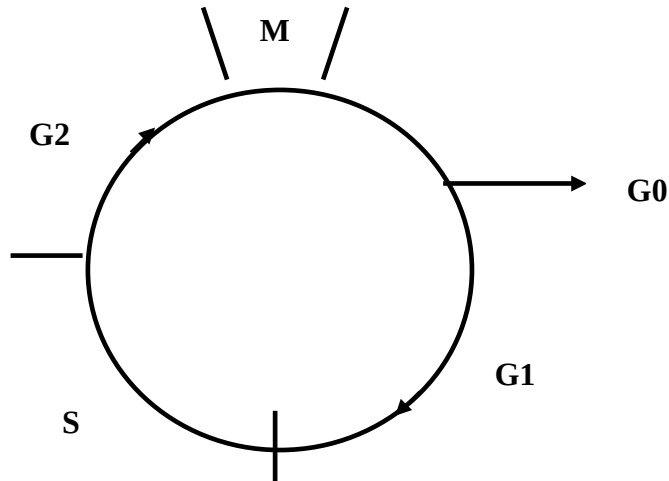


Figure 5 : Les phases du cycle cellulaire (22, 47)

Chez les eucaryotes, la synthèse d'ADN s'effectue en un instant précis du cycle de la cellule. Le cycle cellulaire est la période comprise entre deux divisions cellulaires et est constitué de quatre phases : G1, S, G2 et M (figure 5). L'intervalle de temps entre deux mitoses (phase M) est appelé interphase. Les phases G1 et G2 sont des périodes de repos : G1 avant la synthèse d'ADN (phase S), G2 avant la mitose.

Le cycle mitotique se déroule de la façon suivante :

- en G1 : la cellule est en croissance (synthèse protéique) et diploïde ($2n$), elle se prépare à la réplication.
- en S : la cellule réplique son ADN.
- en G2 : elle est donc tétraploïde ($4n$) et se prépare à la division.
- en M : la mitose (succession d'événements aboutissant à la division cellulaire) se produit et aboutit à la formation de deux cellules filles diploïdes.

La durée du cycle varie selon les types cellulaires et est d'environ 10 à 30 heures chez les mammifères. La mitose dure moins d'une heure et est partagée en quatre phases :

- prophase : condensation des chromosomes, formation du fuseau.
- métaphase : alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique.
- anaphase : séparation des chromatides.
- télophase : reformation de l'enveloppe nucléaire et division cellulaire (cytodiérèse).

3.2.1.2. L'état de quiescence (Métézeau *et al.* (1994) et Campbell (1999), d'après Fréret (22))

La phase G0 (figure 5) correspond à l'état de quiescence : dans certaines conditions, les cellules quittent le cycle cellulaire pendant la phase G1 et cessent de se diviser jusqu'à ce que des conditions plus favorables stimulent leur rentrée dans le cycle. Le métabolisme des cellules quiescentes est réduit au minimum nécessaire à la viabilité cellulaire.

In vivo, l'arrêt en G0 est impliqué lors de la phase terminale de différenciation de nombreux types cellulaires (neurones, kératinocytes suprabasaux...). L'arrêt en G0 peut être induit chez les cellules en culture par certaines conditions expérimentales comme la privation en sérum. En effet, la cellule soumise au stress de la privation en sérum programme son arrêt de croissance et entre en quiescence. Dans certaines populations cellulaires (les fibroblastes notamment), la quiescence est réversible, et la multiplication cellulaire peut reprendre après remise en présence de sérum. Ceci peut être exploité afin de synchroniser les cycles des cellules.

3.2.1.3. Les protéines de régulation du cycle cellulaire (Etienne (1998), d'après Fréret (22))

Deux sortes de protéines vont jouer un rôle important :

- les CDK (cycline dependent kinases) : ces kinases ne sont actives qu'associées à des cyclines. Elles phosphorylent certains résidus sérine et thréonine.
- les cyclines : ces protéines s'associent à différentes CDK pendant les phases successives du cycle cellulaire pour former des complexes enzymatiques actifs (le profil de synthèse/destruction des cyclines est dépendant du cycle cellulaire, d'où leur nom).

La transition entre les différentes phases du cycle nécessite l'activation successive de plusieurs CDK qui sont contrôlées par leur association temporaire avec des cyclines (54). Par exemple, le passage G2/M est sous la dépendance du complexe cycline B/CDK1, appelé MPF pour mitosis/meiosis/maturation-promoting factor. Cette activité particulière est retrouvée de façon universelle dans toutes les cellules mitotiques et méiotiques : elle atteint son maximum en métaphase puis chute. Elle provoque l'entrée en mitose ou en méiose, la condensation des chromosomes, la mise en place du fuseau, et la rupture de l'enveloppe nucléaire.

3.2.1.4. La méiose et la maturation ovocytaire (Campbell *et al.* (1996), d'après Fréret (22))

La méiose est une succession de deux divisions cellulaires sans phase S intermédiaire ni reformation de l'enveloppe nucléaire après la première division. Pendant la maturation de l'ovocyte, après une phase S préméiotique puis l'entrée en méiose, l'ovocyte de la plupart des mammifères est bloqué dans le follicule primordial en prophase de la première division méiotique (prophase I). La reprise de la méiose n'a lieu, en général, qu'à l'ovulation, puis un deuxième blocage survient en métaphase II. Le cytoplasme ovocytaire présente alors une forte activité MPF (elle est en effet maximale en métaphase I et II). Ce blocage ne sera levé que par la fécondation ou une activation parthénogénétique, entraînant la chute rapide de l'activité MPF. La seconde division se termine alors et le second globule polaire est expulsé ; les chromatines mâle et femelle se décondensent et deux pronoyaux se forment. Peu après,

l'ADN est répliqué dans les pronoyaux puis la mitose se produit entraînant le clivage du zygote en deux blastomères.

3.2.2. Effets du MPF sur le noyau transféré : interactions nucléocytoplasmiques

Chez les bovins, l'utilisation comme cytoplasmes receveurs d'ovocytes en métaphase II (MII) énucléés est devenue la méthode de choix : elle a permis la naissance des premiers veaux clonés (Prather *et al.*, 1987). Selon Fulka *et al.* (1996) et Campbell (1999), cités par Fréret (22), trois types de cytoplasmes receveurs peuvent être disponibles :

- des ovocytes en MII activés : la chromatine subit une exposition transitoire à l'activité MPF qui chute.
- des ovocytes en MII dont l'activation est différée (après le transfert) : l'activité MPF reste élevée et la chromatine y est exposée plus longtemps.
- des ovocytes en MII pré-activés (avant le transfert) : l'activité MPF est faible.

D'après Fréret (22), Collas et Robl (1991) ont montré que tous les noyaux transférés dans un cytoplasme à forte activité MPF subissent la destruction de l'enveloppe nucléaire (ou NEBD, pour nuclear envelope break down) et une condensation prématurée de la chromatine (ou PCC, pour premature chromosome condensation) rapidement après le transfert. Le degré de la PCC varie selon le niveau de l'activité MPF et la durée de l'exposition. Il y a ensuite décondensation de la chromatine, reformation de l'enveloppe nucléaire, et gonflement du noyau 4 à 6 heures après fusion. Au contraire, les noyaux introduits dans un cytoplasme sans activité MPF ne subissent ni NEBD, ni PCC.

Les effets directs de la NEBD et de la PCC sur la chromatine du noyau donneur dépendent de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve ce noyau. La chromatine des noyaux en G1 et en G2 se condense pour former des chromosomes allongés respectivement à une et deux chromatides. Dans ce cas, les chromosomes ne semblent pas endommagés. D'après Collas *et al.* (1992), cités par plusieurs auteurs (13, 22, 31, 63), la chromatine des noyaux en phase S prend au contraire une apparence « pulvérisée » typique, avec des régions plus ou moins condensées et des fragments dispersés, et présente de nombreux défauts de l'ADN. En outre, les embryons reconstitués avec des noyaux en phase S présentent des anomalies de l'appareil mitotique (notamment du fuseau) pendant le premier cycle cellulaire. Cela entraîne la formation d'embryons avec des anomalies chromosomiques sévères (probablement des pertes de chromatine) pouvant avoir des effets non seulement à court terme (le zygote est capable d'achever son premier cycle cellulaire et de se cliver), mais aussi à long terme sur la survie embryonnaire.

Une autre source d'anomalie lors du remodelage du noyau est représenté par la réplication anormale de l'ADN. Pendant un cycle cellulaire, l'ADN doit être répliqué une fois et une seule avant la mitose pour le maintien de la ploïdie, le maintien de l'enveloppe nucléaire semblant crucial dans ce contrôle. Il est généralement admis que les noyaux transférés dans un cytoplasme à forte activité MPF subissent la NEBD : or, après la reformation du noyau, la réplication intégrale de l'ADN se produit inévitablement, et ce, quelle que soit la phase du cycle dans laquelle ces noyaux se trouvaient initialement (48, 49). D'après Campbell *et al.* (1993), cités par plusieurs auteurs (22, 31), il en résulte une aneuploïdie des noyaux qui n'étaient pas en G1 lors du transfert, car leur ADN est répliqué une seconde fois. Cette aneuploïdie est bien évidemment préjudiciable au développement des embryons reconstitués. A l'inverse, si les noyaux sont transférés après la chute de l'activité MPF, l'intégrité de la membrane nucléaire est maintenue : la réplication débute dans les noyaux en

phase G1, se poursuit dans ceux en phase S, mais n'a pas lieu dans ceux en phase G2 (22, 48, 49).

3.2.3. Maintien de la diploïdie dans les embryons reconstitués et effets sur le développement *in vitro* des embryons reconstitués

Afin de maintenir la diploïdie et l'intégrité du génome de l'embryon reconstitué, deux protocoles peuvent être utilisés dans le but de coordonner les cycles du noyau donneur et de l'ovocyte receveur :

- quand les cytoplasmes receveurs sont des ovocytes en MII, seuls des noyaux diploïdes en phase G1 devraient être transférés (22, 55).
- quand les cytoplasmes receveurs ont été activés pour faire chuter l'activité MPF, tous les noyaux peuvent être transférés, qu'ils soient en phase G1, S ou G2 (22, 55). De tels cytoplasmes sont qualifiés par Campbell *et al.* (1993, cités par 8, 22, 31, 75) de « receveurs universels ».

D'après Stice *et al.* (1994), cités par plusieurs auteurs (22, 31), ces deux techniques ont permis une augmentation du taux de développement jusqu'au stade blastocyste des embryons bovins reconstitués. Cependant, dans le premier cas, une méthode de synchronisation des cellules donneuses est nécessaire (63). Des inhibiteurs du cytosquelette doivent donc être utilisés pour arrêter le cycle cellulaire à un moment donné. Ainsi, Techakumphu *et al.* (1993), cités par plusieurs auteurs (12, 31, 75), ont utilisé le nocodazole (inhibiteur de la mitose, qui empêche l'assemblage des microtubules et donc la formation du fuseau) chez les bovins pour synchroniser, de façon réversible, des blastomères en phase G1. Seulement, un tel traitement s'est avéré toxique pour l'embryon, et le développement ultérieur des embryons reconstitués par transplantation nucléaire s'est trouvé altéré.

3.2.4. Quiescence des cellules donneuses de noyaux et effets sur le développement *in vitro* des embryons reconstitués

Pour la transplantation de noyaux, il est intéressant d'avoir à disposition des populations cellulaires pouvant être maintenues en culture : cela facilite la synchronisation des noyaux donneurs dans le but d'optimiser la coordination noyau-ovocyte (22).

Ainsi, en 1996, des agneaux sont nés suite au transfert dans des ovocytes énucléés de cellules provenant d'un embryon de 9 jours, préalablement cultivées puis induites en phase G0 de quiescence (8). Le clonage de cellules cultivées et quiescentes a ensuite été étendu à des cellules dérivées de fœtus et d'animaux adultes. D'après plusieurs auteurs (13, 22, 50, 67), cela a notamment abouti à des naissances dans les espèces ovine (Wilmut *et al.*, 1997 ; Schnieke *et al.*, 1997) et bovine (Kato *et al.*, 1998 ; Wells *et al.*, 1999 ; Zakhartchenko *et al.*, 1999). Ces naissances obtenues à partir de cellules quiescentes ont mis en jeu des modalités d'activation très différentes, l'ovocyte étant activé avant la fusion (8), au moment de la fusion (Wilmut *et al.*, 1997), ou après la fusion (Kato *et al.*, 1998 ; Wells *et al.*, 1999 ; Zakhartchenko *et al.*, 1999) (22).

Malgré ces réussites, deux théories s'affrontent actuellement sur l'intérêt de l'induction de la quiescence avant le transfert de noyaux de cellules somatiques dans des ovocytes énucléés (71). L'induction de la quiescence modifie la structure de la chromatine (décondensation, diminution de la transcription et de la traduction), rendant le noyau plus accessible aux facteurs de reprogrammation de l'ovocyte, et permettant un meilleur ajustement avec l'état interphasique du cytoplasme receveur (22, 50). De plus, lors de transfert nucléaire, l'embryon

reconstitué passe par une phase de silence transcriptionnel : il semble donc judicieux que le noyau soit déjà transcriptionnellement inactif lors du transfert (22). Cependant, le fait que les noyaux donneurs soient en phase G0 n'est pas une condition suffisante pour le développement à terme des embryons reconstitués, Fréret (22) relatant par exemple des échecs suite au clonage de cellules épithéliales mammaires quiescentes bovines (Zakhartchenko *et al.*, 1999). D'ailleurs, même si leurs travaux prêtent à controverse (71), Cibelli *et al.* (13) considèrent, à l'inverse, que la quiescence induite par privation de sérum n'est pas un traitement indispensable : pour ces derniers, les cellules ne doivent pas avoir cessé de se diviser mais doivent plutôt se trouver en phase de prolifération active, ce qui correspond à un état relativement indifférencié et compatible avec les divisions cellulaires rapides du développement embryonnaire précoce. Chez les bovins, l'utilisation pour la transplantation nucléaire de cellules somatiques non quiescentes (phase G1) a même conduit à des taux de développement similaires à ceux recensés avec des cellules quiescentes (13, 65).

Chez les bovins, à quel moment optimal du cycle cellulaire (s'il existe) faut-il donc utiliser une cellule donneuse pour que son noyau soit correctement reprogrammé par un environnement cytoplasmique étranger ? La cellule donneuse doit-elle se trouver en phase G0 ou en phase G1 pour être transférée dans un ovocyte se trouvant au stade métaphase II ? Une des difficultés pour faire la part des choses dans ces résultats est liée à l'emploi de populations de cellules hétérogènes, dans lesquelles les proportions de cellules dans chaque phase du cycle sont méconnues. Or, les techniques actuellement disponibles ne permettent pas de déterminer avant transfert la phase du cycle dans laquelle se trouve le noyau donneur (22, 30).

3.3. Qualités intrinsèques des cellules donneuses bovines

3.3.1. Influence du stade de développement de l'embryon donneur lors de clonage embryonnaire

Dans un jeune embryon, tous les noyaux sont formés par réplication mitotique d'un seul génome diploïde, et sont donc génétiquement identiques. Mais, en cas de clonage embryonnaire, plusieurs éléments doivent être pris en compte pour choisir le stade de développement de l'embryon source de noyaux. Notamment, le degré d'indifférenciation des cellules est primordial (28). Chez les mammifères, pour Ziomek et Johnson (1982), cités par Heyman *et al.* (28), la première différenciation morphologique des cellules de l'embryon se produit à la compaction lorsque les cellules externes deviennent polarisées, forment le trophoctoderme, et perdent leur potentiel à constituer des tissus de l'embryon proprement dit. Ceci pourrait expliquer en partie les différences de viabilité des noyaux transplantés issus d'une même morula compacte de bovin par exemple (28).

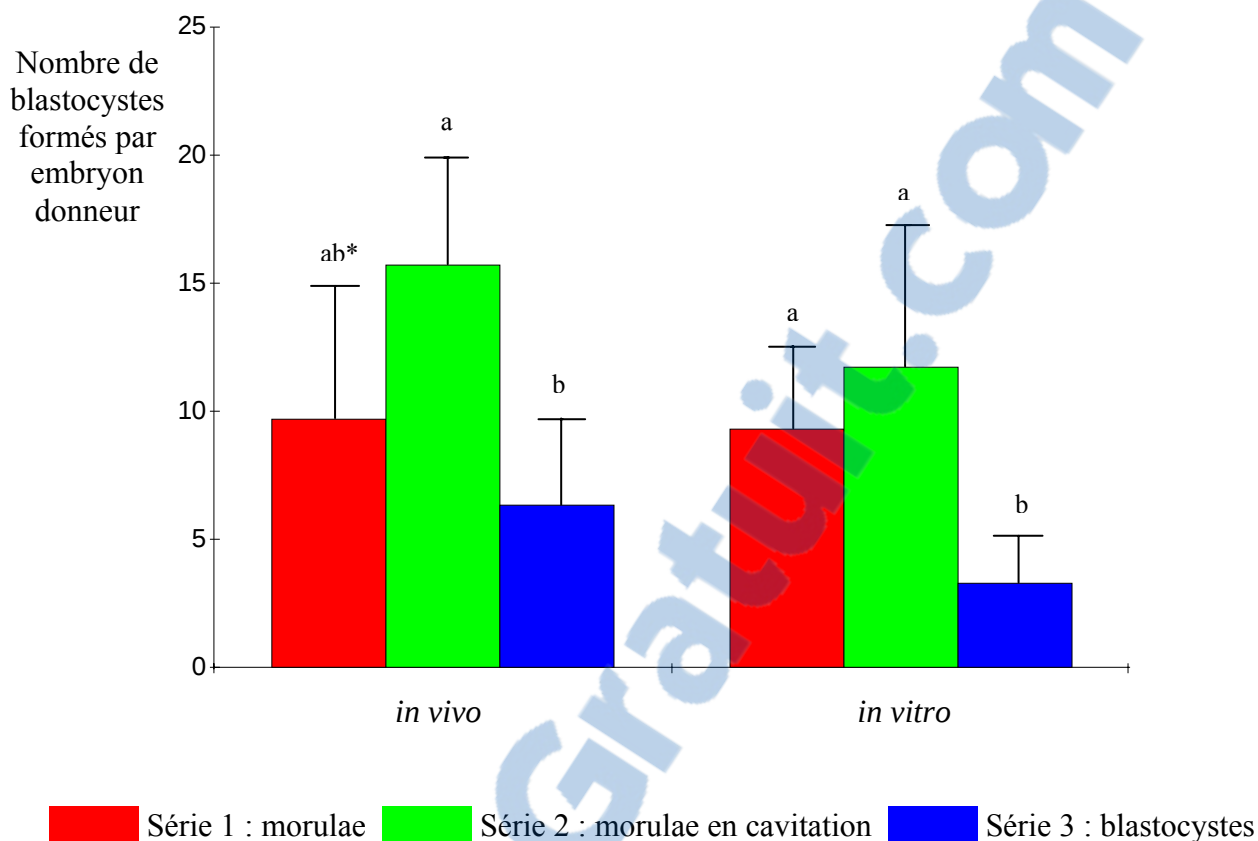
Chez les bovins, afin de déterminer le stade de développement des embryons donneurs qui conduit, après transfert de noyaux, au nombre le plus élevé d'animaux clonés par embryon donneur, Zakhartchenko *et al.* (76) ont comparé les efficacités respectives du clonage lorsque les cellules donneuses proviennent de morulae, de morulae en phase de cavitation, ou encore de la masse cellulaire interne de blastocystes. Cette comparaison a été effectuée à la fois à partir d'embryons donneurs produits *in vivo* et *in vitro*. Les résultats de cette étude de Zakhartchenko *et al.* sont retranscrits dans les tableaux 26, 27 et 28.

Tableau 26 : Efficacité d'une procédure de transfert nucléaire utilisant des embryons donneurs bovins de différents stades produits *in vivo* (76)

Embryon donneur (nombre)	Morula (6)	Morula en phase de cavitation (3)	Masse cellulaire interne de blastocyste (4)	Total (13)
Groupe Nombre de cellules (distribution)	1 49,8 ± 6,1 (40-60)	2 72,7 ± 4,1 (68-78)	3 39,8 ± 9,7 (24-49)	
Nombre d'embryons reconstitués	241	148	145	534
Nombre d'embryons fusionnés (%)	218 (91) ^a	130 (88) ^{a,b}	117 (81) ^b	465 (87)
Nombre d'embryons se segmentant (%)	194 (89) ^a	100 (77) ^{b,c}	83 (71) ^c	377 (81)
Nombre de morulae (%)	20 (9) ^a	8 (6) ^a	9 (8) ^a	37 (8)
Nombre de blastocystes (%)	59 (27) ^{a,b}	47 (36) ^a	25 (21) ^b	129 (28)
Nombre de blastocystes transplantés (%)	33 (16)	27 (21)	15 (13)	75 (16)

^{a-c} Au sein d'une même rangée, les pourcentages présentant des exposants différents diffèrent significativement (Test χ^2 , $P < 0,05$).

Dans cette expérience, Zakhartchenko *et al.* ont d'abord étudié l'influence du stade de développement d'embryons donneurs bovins produits *in vivo* sur le développement jusqu'au stade blastocyste d'embryons reconstitués par transplantation nucléaire. Il ressort de cette analyse (tableau 26) que les embryons donneurs se trouvant au stade morula en phase de cavitation conduisent, après clonage, à un taux de blastocystes légèrement supérieur à celui obtenu avec des embryons donneurs de stade morula (36% vs 27%), bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative. Par contre, bien que des blastocystes aient été obtenus en utilisant comme source de noyaux donneurs des cellules de la masse cellulaire interne, le rendement de la procédure de transplantation de noyaux s'est avéré significativement plus faible qu'avec les embryons donneurs de stade morula en phase de cavitation. Enfin, en termes de nombre de blastocystes produits par embryon donneur, c'est l'utilisation de morulae donneuses en phase de cavitation qui a conduit aux meilleurs résultats (figure 6).



* Au sein d'un même groupe (*in vivo*, *in vitro*) les moyennes signalées par des exposants différents sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Figure 6 : Efficacité, chez les bovins, du transfert nucléaire (blastocystes formés par embryon donneur, moyennes et écarts-type) en fonction du mode de production (*in vivo*, *in vitro*) et du stade de développement des embryons donneurs (morula, morula en cavitation, blastocyste) (76)

Des résultats similaires ont été recensés avec des embryons donneurs produits *in vitro* (tableau 27). En effet, l'efficacité du transfert nucléaire s'est révélée statistiquement identique lorsque des embryons donneurs de stade morula ou morula en phase de cavitation ont été employés, même si, en termes de nombre de blastocystes produits par embryon donneur, ce sont les morulae donneuses en phase de cavitation qui ont conduit aux meilleurs résultats (figure 6). Par ailleurs, il a également été constaté que l'aptitude au développement des embryons reconstitués à partir de tels embryons donneurs était significativement supérieure à celle des embryons reconstitués à partir de cellules de la masse cellulaire interne de blastocystes.

Tableau 27 : Efficacité d'une procédure de transfert nucléaire utilisant des embryons donneurs bovins de différents stades produits *in vitro* (76)

Embryon donneur (nombre)	Morula (12)	Morula en phase de cavitation (6)	Masse cellulaire interne de blastocyste (6)	Total (24)
Groupe Nombre de cellules (distribution)	1 48,9 ± 9,5 (32-62)	2 74,7 ± 5,3 (68-81)	3 35,3 ± 3,4 (30-38)	
Nombre d'embryons reconstitués	389	268	173	830
Nombre d'embryons fusionnés (%)	344 (88)	239 (89)	139 (80)	722 (86)
Nombre d'embryons se segmentant (%)	277 (81) ^a	201 (84) ^a	92 (66) ^b	570 (79)
Nombre de morulae (%)	31 (9) ^a	32 (13) ^a	3 (2) ^b	66 (9)
Nombre de blastocystes (%)	111 (32) ^a	69 (29) ^a	21 (15) ^b	201 (28)
Nombre de blastocystes transplantés (%)	65 (19) ^a	30 (13) ^{a,b}	11 (8) ^b	106 (15)

* OBCs, complexes (cellules) ovocyte-blastomère.

^{a-b} Au sein d'une même rangée, les pourcentages présentant des exposants distincts diffèrent significativement (Test χ^2 , P < 0,05).

Après transfert chez des receveuses de blastocystes clonés dérivant d'embryons donneurs produits *in vivo*, entre 33 et 46% des receveuses sont diagnostiquées gestantes au 21^{ème} jour de gestation, par mesure de la progestéronémie (tableau 28). Au 45^{ème} jour de gestation, la réalisation de palpations transrectales montre que ces taux ont chuté à 7-14%. Par la suite, une des femelles gestantes avorte, tandis que deux autres sont abattues suite à des pathologies diverses. Au total, six veaux sont obtenus (trois depuis des morulae et trois depuis des morulae en phase de cavitation), mais deux d'entre eux décèdent à la naissance, et un troisième meurt peu de temps après.

La transplantation chez des receveuses de blastocystes clonés dérivant d'embryons donneurs produits *in vitro* s'est, quant à elle, traduite par des taux de gestation à 45 jours compris entre 0 et 50%. Par la suite, deux femelles gestantes avortent au cours du 4^{ème} mois de gestation. Finalement, un clone de deux veaux femelles parfaitement normaux et dérivant de la même morula donneuse est ainsi obtenu.

Tableau 28 : Développement d'embryons bovins clonés après transfert chez des receveuses (76)

Source de noyaux donneurs	<i>In vivo</i>			<i>In vitro</i>		
Stade de développement*	M	MC	B	M	MC	B
Nombre d'embryons transférés	67	45	12	16	17	7
Nombre de receveuses	40	41	7	10	4	3
Nombre de tests positifs à la progestérone au jour 21 (%)	15/32 (46)	17/41 (41)	2/6 (33)	n.d.	n.d.	n.d.
Nombre de receveuses gestantes au jour 45 (%)	4 (10)	3 (7) ^b	1 (14)	2 (20)	2 (50) ^b	0
Nombre de receveuses gestantes au jour 90 (%)	4 (10)	3 (7)	1 (14)	2 (20)	2 (50)	
Nombre d'avortements (%)	1 (25) ^d	1 (33)	1 (100) ^c	0	2 (100)	
Nombre de veaux nés (%) ^a	3 (4)	3 (7)		2 (13)		

* M : morula ; MC : morula en phase de cavitation ; B : blastocyste ; n.d. : non déterminé.

^a Pourcentage calculé sur le nombre d'embryons transférés.

^b Une receveuse avait des jumeaux.

^c Une receveuse a été abattue au cours du 7^{ème} mois de gestation pour cause d'hydrallantoïde.

^d Une receveuse a été abattue au cours du 6^{ème} mois de gestation pour cause de maladie.

En conclusion, bien que les morulae donneuses en phase de cavitation semblent représenter le stade de développement le plus adapté à un développement *in vitro* satisfaisant après transfert de noyaux, concernant le développement *in vivo*, les taux de gestations et de naissances apparaissent, au contraire, les plus élevés après transfert chez des femelles receveuses de blastocystes clonés dérivant de morulae donneuses produites *in vivo* ou *in vitro*. Même si ces différences ne sont pas significatives, cette expérience de Zakhartchenko *et al.* (1996) montre néanmoins qu'il semble exister une influence du stade de développement des embryons donneurs sur l'efficacité du transfert nucléaire lors de clonage embryonnaire.

3.3.2. Influence de l'âge, du nombre, et de la taille des cellules d'un embryon donneur sur l'efficacité de la procédure de clonage embryonnaire

Zakhartchenko *et al.* (75) ont réalisé une étude que nous exposons ci-après : leurs travaux visaient à définir les critères de sélection des blastomères d'un embryon donneur autorisant une efficacité maximale de la procédure de clonage par transfert de noyaux chez les bovins. D'autres auteurs les ont toutefois précédés dans cette démarche. D'après Zakhartchenko

et al. (75), Bondioli *et al.* (1990) et Marek *et al.* (1990) se sont ainsi focalisés sur l'influence de l'âge de l'embryon donneur bovin, démontrant que des morulae de 6 jours (composées d'environ 48 cellules) représentaient des donneurs de meilleure qualité que des morulae âgées de 5 jours (28 cellules) et 5,5 jours (31 cellules).

3.3.2.1. Influence de l'âge et du nombre de cellules de l'embryon donneur sur le développement des embryons reconstitués par transfert nucléaire

Afin d'évaluer ces influences, Zakhartchenko *et al.* (35) ont partagé les embryons donneurs bovins dont ils disposaient en quatre groupes :

- le groupe (A), constitué de morulae de 6 jours (25 à 34 cellules),
- le groupe (B), constitué de morulae de 6 jours (40 à 55 cellules),
- le groupe (C), constitué de morulae de 6 jours (60 à 81 cellules),
- le groupe (D), constitué de morulae de 7 jours (50 à 83 cellules).

Après transplantation nucléaire, les résultats du développement *in vitro* des embryons reconstitués à partir de ces embryons donneurs sont présentés dans le tableau 29.

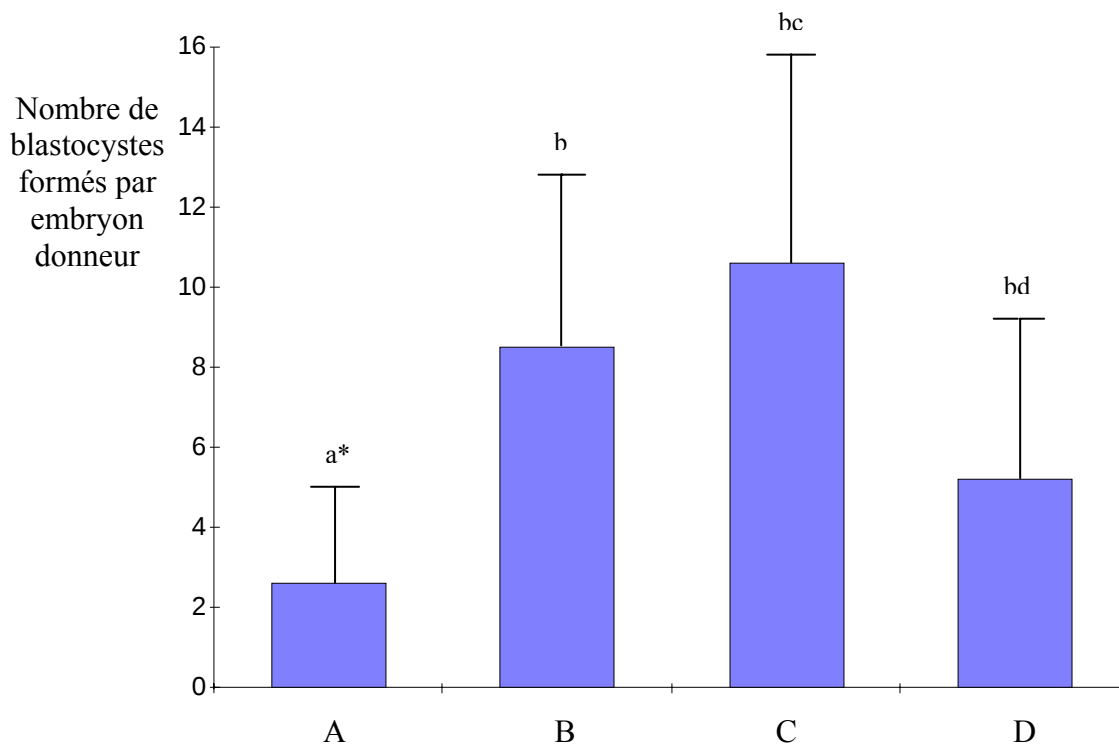
Tableau 29 : Influence, chez les bovins, de l'âge et du nombre de cellules de l'embryon donneur sur le développement des embryons reconstitués par transfert nucléaire (75)

Groupe	A	B	C	D
Age des embryons donneurs (jours)	6	6	6	7
Nombre de blastomères par embryon donneur (moyenne ± écartype)	25-34 (31,3 ± 4,6)	40-55 (47,0 ± 5,9)	60-81 (68,4 ± 8,7)	50-83 (64,8 ± 12,2)
Nombre d'embryons donneurs	6	7	7	8
Nombre de fusions tentées	118	233	265	271
Nombre de fusions réussies (%)	89 (75) ^a	192 (82) ^{a,b}	234 (88) ^b	226 (83) ^{a,b}
Nombre d'embryons se segmentant (%)*	61 (69) ^a	168 (86) ^b	190 (81) ^b	187 (83) ^b
Nombre de morulae et de blastocystes (%)*	20 (23)	74 (39) ^{b,c}	101 (43) ^b	73 (32) ^{a,c}
Nombre de blastocystes (%)*	15 (17) ^a	59 (31) ^b	74 (32) ^b	42 (19) ^a

^{a, b, c} Au sein d'une même rangée, les pourcentages présentant des exposants différents diffèrent significativement (Test χ^2 , $P < 0,05$).

* Les taux sont calculés sur la base du nombre de fusions réussies.

Nous pouvons constater que le taux de fusions obtenu avec les blastomères du groupe C est supérieur à ceux obtenus avec les blastomères des autres groupes, mais seuls les résultats des groupes C et A sont significativement différents ($P < 0,05$). D'autre part, les embryons reconstitués à partir des blastomères du groupe A ont un taux de segmentation significativement inférieur à ceux des embryons reconstitués à partir des blastomères des autres groupes. Enfin, les noyaux provenant de morulae de 6 jours, composées d'un nombre intermédiaire (groupe B) ou élevé de cellules (groupe C), semblent significativement plus aptes à assurer un développement des embryons reconstitués jusqu'au stade blastocyste que les noyaux provenant de morulae de 7 jours (groupe D) ou que ceux provenant de morulae de 6 jours comportant un petit nombre de blastomères (groupe A). Conformément à ces observations, l'efficacité moyenne de la procédure de transplantation de noyaux (nombre de blastocystes obtenus par embryon donneur) s'avère significativement supérieure ($P < 0,05$) lorsque les blastomères des groupes B et C sont utilisés comme cellules donneuses (figure 7).



A : morula de 6 jours, 25-34 blastomères
 B : morula de 6 jours, 40-55 blastomères
 C : morula de 6 jours, 60-81 blastomères
 D : morula de 7 jours, 50-83 blastomères

* Les moyennes signalées par des exposants différents diffèrent significativement ($P < 0,05$).

Figure 7 : Efficacité, chez les bovins, du transfert nucléaire (blastocystes formés par embryon donneur, moyennes et écarts-type) en fonction de l'âge et du nombre de cellules des embryons donneurs (75)

Selon Zakhartchenko *et al.*, ces données sont compatibles avec le fait que des embryons composés d'un nombre élevé de cellules contiendraient davantage de blastomères se trouvant dans une phase du cycle cellulaire adaptée au transfert nucléaire que des embryons composés d'un faible nombre de cellules. Concernant les morulae de 7 jours, bien que ces dernières présentent une composition cellulaire comparable à celle des morulae de 6 jours ayant un nombre élevé de blastomères, leur utilisation pour le transfert de noyaux s'avère significativement moins efficace. Or, puisque les morulae de 7 jours dérivent de chacun des groupes des morulae de 6 jours, et puisque le nombre de cellules des morulae de 6 jours représente un indicateur de la compétence de leurs blastomères pour la transplantation nucléaire, une efficacité intermédiaire des blastomères provenant des morulae de 7 jours était attendue.

3.3.2.2. Influence de la taille des blastomères de l'embryon donneur sur le développement des embryons reconstitués par transfert nucléaire

Zakhartchenko *et al.* (35) ont évalué l'influence de la taille des blastomères de l'embryon donneur sur l'efficacité du clonage embryonnaire en utilisant des morulae donneuses bovines, toutes âgées de 6 jours, mais composées d'un nombre moyen (40-55 cellules) ou élevé (60-81 cellules) de blastomères. Les morulae constituées d'un nombre moyen de cellules ($n = 6$) contiennent respectivement $40,9 \pm 8,5\%$ et $59,1 \pm 6,4\%$ de blastomères de grande (35 à 42 μm de diamètre) et de petite taille (24 à 32 μm de diamètre). Dans les morulae constituées d'un nombre élevé de cellules ($n = 6$), le pourcentage de blastomères de petite taille (30 à 34 μm de diamètre) s'élève à $69,1 \pm 4,9\%$.

Après transplantation nucléaire, nous observons (tableau 30) que les proportions de fusions réussies et d'embryons se segmentant ne sont affectées ni par le nombre, ni par la taille des blastomères. Pourtant, pour chaque groupe d'embryons donneurs, le transfert de noyaux de blastomères de petite taille dans des ovocytes énucléés a conduit à des taux de développement jusqu'au stade blastocyste significativement plus élevés qu'après transfert de noyaux de blastomères de taille supérieure ($P < 0,05$). D'autre part, pour une même taille des blastomères, les noyaux provenant d'embryons composés d'un nombre élevé de cellules sont significativement plus efficaces pour le transfert nucléaire que ceux provenant d'embryons composés d'un nombre intermédiaire de cellules ($P < 0,05$). En ne considérant comme source de noyaux donneurs que les embryons constitués d'un nombre intermédiaire de cellules, le nombre de blastocystes formés après clonage est de $2,0 \pm 1,4$ blastocystes par embryon donneur lorsque les cellules donneuses sont des blastomères de grande taille. Ce taux s'élève à $6,3 \pm 3,0$ blastocystes formés par embryon donneur lorsque les cellules donneuses sont cette fois des blastomères de petite taille. Ces taux, ramenés à l'utilisation d'embryons constitués d'un nombre élevé de cellules, sont supérieurs, avec $2,8 \pm 1,9$ et $10,0 \pm 4,2$ blastocystes formés par embryon donneur lorsque sont respectivement considérés les blastomères de grande et de petite taille (figure 8).

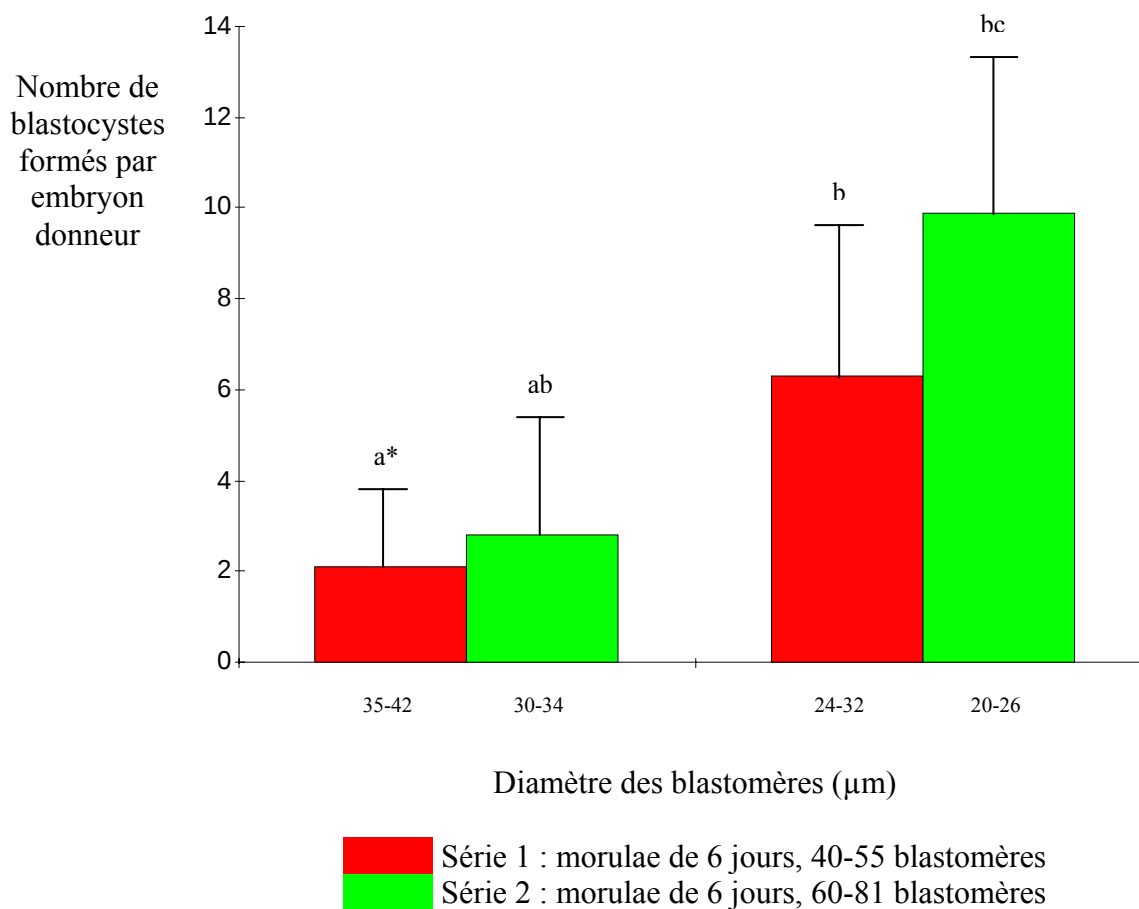
Après transfert chez 11 receveuses synchronisées de 15 blastocystes et de quatre morulae, tous obtenus à partir d'embryons donneurs de 6 jours composés d'un nombre élevé de cellules, trois veaux sont nés, dont un clone de deux veaux femelles issus du même embryon donneur.

Tableau 30 : Influence, chez les bovins, de la taille des blastomères d'un embryon donneur de 6 jours, composé d'un nombre moyen ou élevé de cellules, sur le développement des embryons reconstitués par transfert nucléaire (75)

Groupe	A	B	C	D
Nombre de cellules des morulae donneuses	40-55	40-55	60-81	60-81
Diamètre des blastomères (µm)	35-42 (38,8 ± 2,5)	24-32 (27,7 ± 4,0)	30-34 (32,1 ± 2,1)	20-26 (23,7 ± 2,3)
Nombre de fusions tentées	86	158	78	162
Nombre de fusions réussies (%)	71 (84)	138 (87)	68 (87)	145 (90)
Nombre d'embryons se segmentant (%)*	58 (81)	121 (88)	54 (79)	123 (85)
Nombre de morulae et de blastocystes (%)*	15 (21) ^a	56 (41) ^b	24 (35) ^b	79 (55) ^c
Nombre de blastocystes (%)*	12 (15) ^a	38 (28) ^b	17 (25) ^b	60 (41) ^c

^{a, b, c} Au sein d'une même rangée, les pourcentages présentant des exposants différents diffèrent significativement ($P < 0,05$).

* Les taux sont calculés sur la base du nombre de fusions réussies.



* Les moyennes signalées par des exposants distincts diffèrent significativement ($P < 0,05$).

Figure 8 : Efficacité, chez les bovins, du transfert nucléaire (blastocystes formés par embryon donneur, moyennes et écarts-type) en fonction de la taille des blastomères des embryons donneurs (morulae de 6 jours composées d'un nombre intermédiaire ou élevé de cellules) (75)

Il est désormais admis que la taille des blastomères décroît à mesure que les embryons se segmentent. En conséquence, les blastomères de petite taille apparaissent comme le résultat d'un nombre de divisions supérieur à celui qui aboutit aux blastomères de grande taille, reflétant en quelque sorte une aptitude au développement plus importante : il est donc intuitivement logique que les blastomères de petite taille conduisent, après transfert de noyaux, à un taux de blastocystes clonés significativement plus élevé que les blastomères de grande taille. Par ailleurs, pendant la préparation des cellules donneuses, Zakhartchenko *et al.* ont observé que les blastomères de grande taille étaient principalement situés en périphérie des embryons (constituant les cellules « souches » du trophoctoderme), tandis que la plupart des blastomères de petite taille étaient localisés au centre de ces embryons. Or, d'après Zakhartchenko *et al.*, si Ziomek *et al.* (1994) ont signalé que la toute première polarisation des cellules d'un embryon bovin survenait au stade 16-32 cellules, Navara et First (1992) ont, quant à eux, montré que les blastomères externes des embryons compactés bovins étaient moins capables que les blastomères internes d'assurer le développement d'embryons reconstitués par transplantation nucléaire. Le fait que les blastomères de petite

taille soient de meilleurs donneurs que les blastomères de grande taille pourrait donc s'expliquer par la présence d'une plus grande proportion de cellules totipotentes au sein d'une telle population.

En résumé, Zakhartchenko *et al.* (1995) ont ici appréhendé les influences respectives de l'âge, du nombre et de la taille des blastomères sur les rendements globaux d'une procédure de clonage par transplantation de noyaux menée chez les bovins. Au-delà des résultats de cette expérience, la connaissance systématique de ces paramètres pourrait s'avérer très utile dans le cadre d'une évaluation de la qualité des embryons donneurs : la technique de clonage embryonnaire des bovins y gagnerait certainement en efficacité.

3.3.3. Influence de l'état de différenciation cellulaire des cellules donneuses

3.3.3.1. Rappels sur la différenciation cellulaire (Alberts *et al.* (1995), d'après Fréret (22))

La différenciation cellulaire est le processus au cours duquel la cellule, engagée dans une voie de développement (détermination cellulaire), exprime un phénotype spécialisé. Le terme de différenciation terminale implique que la cellule ait perdu la capacité de se diviser.

Au cours du développement embryonnaire, de nombreux types cellulaires différenciés sont engendrés à partir de l'ovocyte fécondé. Le génome de ces cellules différenciées reste le même, c'est le profil d'expression des gènes qui change et qui correspond à des fonctions cellulaires différentes (47, 65). La diversité des types cellulaires est due aux diverses influences auxquelles les cellules ont été exposées au cours du développement embryonnaire et fœtal.

Détermination et différenciation cellulaires reflètent l'expression de gènes de contrôle. L'existence d'une mémoire cellulaire, cytoplasmique ou nucléaire, permet aux cellules d'être déterminées pour un rôle particulier bien avant qu'elles ne se différencient de façon visible.

3.3.3.2. Variation des résultats du clonage en fonction du type cellulaire

Les travaux entrepris à l'INRA de Jouy-en-Josas dans l'espèce bovine ont montré que le développement jusqu'au stade blastocyste d'embryons reconstitués à partir du transfert de noyaux de cellules somatiques cultivées était significativement meilleur ($P < 0,01$) pour les embryons clonés à partir de cellules de peau fœtale (8,3% de blastocystes obtenus, par rapport au nombre d'embryons reconstitués) que pour ceux clonés à partir de cellules de muscle fœtal (4,1% de blastocystes obtenus) (65). Cela pourrait être expliqué par une plus grande différenciation des cellules de muscle en culture, dont une partie pourrait se trouver en différenciation terminale (31).

D'autre part, après transfert nucléaire, les cellules fœtales bovines apparaissent significativement plus aptes ($P < 0,01$) à se développer jusqu'au stade blastocyste que les cellules bovines issues de peau « adulte » (8,3% de blastocystes avec les cellules de peau fœtale contre 2,9% de blastocystes avec les cellules de peau d'un veau âgé de 2 semaines) (65).

Par contre, le clonage par transplantation nucléaire de cellules bovines de peau « adulte » en culture a conduit à une nette augmentation du taux de formation de blastocystes lorsque des cellules en culture primaire étaient utilisées (jusqu'à 30% de blastocystes), même sans synchronisation préalable, en comparaison avec des lignées cultivées à long terme (8 à 15% de blastocystes) (65). Ces cultures primaires d'explants de peau contiennent plusieurs types cellulaires, alors qu'au fur et à mesure que la culture se prolonge, les fibroblastes prennent le

dessus. Il se pourrait qu'un des types cellulaires de ces cultures primaires soit peut-être plus enclin à la reprogrammation nucléaire, par un cycle cellulaire plus adapté, ou par un état de différenciation plus favorable. Il se pourrait également que certains types cellulaires (comme les cellules neuronales par exemple) de ces cultures primaires ne puissent peut-être pas être reprogrammés (67). Le degré de différenciation des cellules pourrait donc constituer une explication à la variation des résultats entre les types cellulaires utilisés pour la transplantation de noyaux (63).

3.4. Qualités intrinsèques des ovocytes receveurs bovins

3.4.1. Influence de l'âge de l'ovocyte receveur

Barnes *et al.* (1) ont réalisé une étude visant à déterminer la viabilité des ovocytes bovins maturés *in vitro* en matière de clonage par transfert nucléaire. Ils ont notamment évalué l'influence de l'âge de l'ovocyte sur son aptitude à être activé et aussi sur le développement des embryons reconstitués par transfert de noyaux.

Les auteurs ont ainsi montré que la capacité des ovocytes maturés *in vitro* à être activés (attestée par la formation des pronucléi) augmentait avec l'âge de ces derniers puisque, dans leur expérience, alors que des stimulations électriques ont été pratiquées 26, 28, 30 et 32 heures après le début de la maturation *in vitro*, les taux d'activation les plus élevés ont été obtenus pour des électrostimulations effectuées 30 et 32 heures après le début de la maturation (figure 9). Selon plusieurs auteurs (1, 41, 53), ceci corrobore les résultats obtenus auparavant par d'autres équipes (Ware *et al.*, 1989 ; Ozil, 1990 ; Chesné *et al.*, 1992). Cette acquisition d'une certaine compétence pour l'activation est encore mal comprise, mais il est fort probable que des changements moléculaires (comme la chute spontanée du taux de MPF) interviendraient à la fois dans le cytoplasme et la membrane ovocytaire au cours du vieillissement (53, 57).

Par contre, Barnes *et al.* ont observé que la culture des ovocytes bovins maturés *in vitro* au-delà du temps requis pour l'acquisition d'une compétence particulière pour l'activation n'améliorait pas significativement ($P < 0,05$) l'aptitude de ces derniers à assurer un développement satisfaisant des embryons reconstitués par transfert nucléaire. Il semble toutefois qu'il y ait une tendance ($P = 0,079$) des ovocytes bovins maturés *in vitro* à donner de meilleurs résultats en matière de clonage embryonnaire lorsque ces derniers sont cultivés pendant une période supplémentaire de 19 heures après l'étape de sélection basée sur la présence effective d'un globule polaire (qui intervient 22 à 24 heures après le début de la maturation) : en effet, dans l'étude de Barnes *et al.*, 12% des ovocytes sélectionnés sur la présence d'un globule polaire et cultivés pendant une période supplémentaire de 19 heures après cette sélection ont fourni, après transplantation nucléaire et culture *in vitro* des embryons reconstitués, des embryons de stades morula et blastocyste contre 7% pour ceux cultivés pendant 3 à 5 heures après cette sélection. D'après plusieurs auteurs (1, 28), d'autres équipes avaient constaté cette tendance des ovocytes plus âgés à conduire à des résultats améliorés en matière de clonage (Prather *et al.*, 1987 ; Willadsen, 1989 ; Sims *et al.*, 1991).

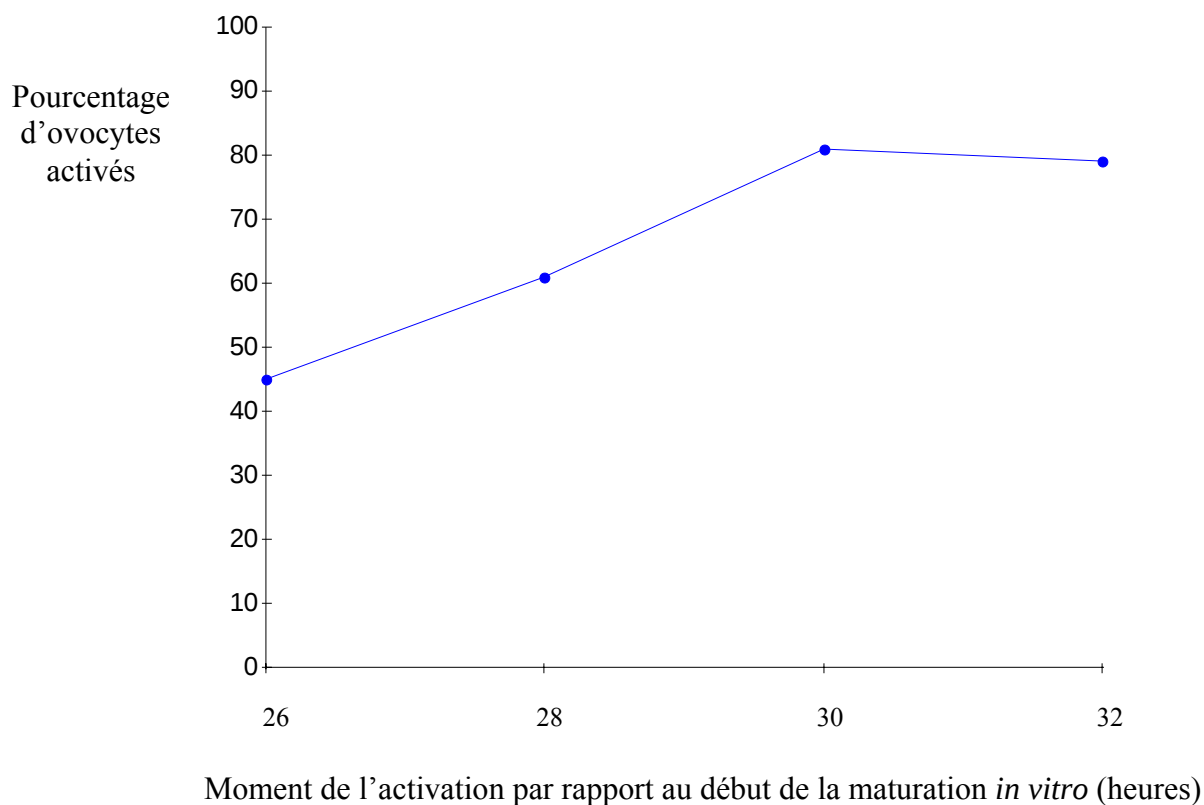


Figure 9 : Aptitude des ovocytes bovins maturés *in vitro* à être activés (38, 39, 32 et 34 ovocytes ont été respectivement activés à 26, 28, 30 et 32 heures après le début de la maturation *in vitro*) (1)

3.4.2. Critères morphologiques de sélection des ovocytes maturés *in vitro* pour le clonage par transfert nucléaire

Pour Barnes *et al.* (1), la sélection des ovocytes receveurs sur la présence effective, 24 heures après le début de la maturation *in vitro*, d'un globule polaire clairement visible améliore le développement des embryons reconstitués. Ainsi, ils ont montré dans leur expérimentation que 25% des ovocytes possédant un globule polaire étaient capables, après transplantation de noyaux, de se développer jusqu'aux stades morula et blastocyste contre seulement 10% pour ceux qui en étaient dépourvus.

Similairement, les auteurs ont observé que les ovocytes dérivant de follicules de 6 à 8 mm de diamètre conduisaient, après transfert nucléaire, à un taux de développement des embryons reconstitués jusqu'aux stades morula et blastocyste significativement supérieur à celui obtenu avec les ovocytes issus de follicules de 1 à 5 mm de diamètre (tableau 31). Par la suite, une autre équipe a démontré que des ovocytes bovins prélevés sur des follicules de petite taille (0,5 à 2 mm) conduisaient, après fécondation *in vitro* ou activation parthénogénétique, à des taux de formation des blastocystes significativement moins élevés que ceux atteints à partir d'ovocytes recueillis sur des follicules de grande taille (5 à 8 mm) (73). La réalisation d'expériences de transplantation nucléaire croisée a amené ces auteurs à considérer que la faible aptitude au développement des ovocytes issus de follicules de petite taille était due à une incompétence simultanée du noyau et du cytoplasme ovocytaire (73). Ces données

suggèrent que des événements critiques requis pour le développement embryonnaire prennent place dans l'ovocyte durant les étapes finales de la folliculogénèse (1).

Tableau 31 : Influence de la taille des follicules sur le développement d'embryons bovins reconstitués par transfert nucléaire (1)

Diamètre des follicules (mm)	Nombre de morulae et de blastocystes produits/nombre d'embryons reconstitués (pourcentage moyen $\pm$ écart-type)
1-5	17/121 (14 $\pm$ 4) ^a
6-8	39/125 (31 $\pm$ 4) ^b

^{a,b} Les taux de formation de morulae et de blastocystes présentant des exposants différents au sein de cette même colonne sont significativement différents (analyse de la variance, $P < 0,05$).

3.5. Conditions de culture *in vitro* des ovocytes et des embryons reconstitués

3.5.1. Influence des conditions de la maturation *in vitro* des ovocytes sur le développement des embryons reconstitués par transfert nucléaire (35)

Une fois sélectionnés sur certains critères physiques (présence d'un globule polaire, taille du follicule d'origine), les ovocytes maturés *in vitro* (dans un milieu TCM-199 supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal, 45 $\mu\text{g/mL}$ de FSH bovine, 1 $\mu\text{g/mL}$ d'œstradiol, 0,2 mmol/L de pyruvate et 1% de pénicilline et de streptomycine) se révèlent être exactement équivalents aux ovocytes maturés *in vivo* en matière de transfert de noyaux, aucune différence n'ayant pu être statistiquement décelée concernant l'efficacité des différentes étapes de la procédure de clonage (fusion des cellules donneuse et receveuse, production *in vitro* d'embryons viables, nombre de gestations initiées et de veaux nés, tableau 32) (1).

Tableau 32 : Développement d'embryons clonés à partir d'ovocytes bovins maturés *in vitro* ou *in vivo* (1)

Ovocytes	Nombre de fusions réussies/nombre de fusions tentées (%)	Nombre de morulae et de blastocystes produits /nombre d'embryons reconstitués (%)	Nombre de gestations initiées/nombre d'embryons transférés (%)	Nombre de veaux nés/nombre d'embryons transférés (%)
maturés <i>in vitro</i>	840/961 (87)	161/906 (18)	33/125 (26)	27/125 (22)
maturés <i>in vivo</i>	884/1074 (82)	161/1008 (16)	33/135 (24)	24/135 (18)

Au sein d'une même colonne, les pourcentages ne sont pas significativement différents (Test χ^2 , $P > 0,05$).

Il est désormais admis que le développement d'un embryon bovin reconstitué par transplantation de noyaux est fortement influencé par les événements de la maturation ovocytaire. En particulier, les modifications du cytoplasme des ovocytes qui se produisent durant la maturation *in vitro* apparaissent essentielles pour la suite du développement embryonnaire. Notamment, il apparaît que le cytoplasme de l'ovocyte devrait jouer un rôle crucial dans l'assemblage correct de la machinerie métabolique qui permettra de produire l'énergie nécessaire à la réalisation des fonctions cellulaires pendant la maturation, puis ensuite, pendant les segmentations de l'embryon reconstitué jusqu'au stade blastocyste. Ainsi, une meilleure compréhension des caractéristiques structurales, fonctionnelles et métaboliques des ovocytes bovins durant leur maturation *in vitro*, ainsi qu'une meilleure connaissance des conséquences des modifications de ces caractéristiques pendant cette période devrait permettre d'accroître l'efficacité de la production des embryons clonés, ne serait-ce qu'en procurant une source d'ovocytes de grande qualité pour le transfert nucléaire.

Beaucoup d'ovocytes récupérés sur des vaches de réforme à l'abattoir ne sont pas matures. Par conséquent, ils ne peuvent améliorer leur compétence pour le développement embryonnaire indépendamment des conditions de maturation *in vitro*. Les changements se produisant dans les ovocytes bovins durant cette période consistent en une maturation cytoplasmique qui met en jeu de nombreux événements moléculaires comme la synthèse et la phosphorylation de protéines impliquées dans l'achèvement de la méiose et la formation du pronucléus. En plus de ces événements moléculaires, une part importante du cytoplasme ovocytaire serait impliquée dans développement et l'activation des voies métaboliques utiles à la maturation. A ce sujet, les mitochondries joueraient un rôle important. Il a en effet été montré que la distribution cytoplasmique des mitochondries varie avec les altérations de la fonction cellulaire telles que la prolifération ou la différenciation cellulaire, ou encore avec certaines modifications métaboliques (Hackenbrock (1966, 1968), cité par 35). Les mouvements des mitochondries vers des zones nécessitant des niveaux élevés d'énergie sont certainement indispensables pour les ovocytes se trouvant à des moments critiques du cycle cellulaire. Mais, dans l'ovocyte bovin, on ne sait pourtant encore pas si la répartition des

mitochondries affecte le métabolisme énergétique et la capacité des ovocytes à atteindre un état de compétence pour le développement.

Il semble que les conditions de culture *in vitro* influencent la distribution et l'activité des mitochondries et qu'elles sont peut-être aussi à l'origine de différences dans le développement des embryons. Afin d'envisager cette possibilité, Krisher et Bavister (35) ont cherché à étudier la maturation des ovocytes bovins dans plusieurs milieux de culture. Utilisant la microscopie photonique, ils ont notamment décrit des différences dans la distribution des mitochondries des ovocytes bovins selon que ces derniers étaient placés dans un milieu standard de maturation (A), ou dans un milieu chimiquement défini (contenant du glucose et du lactate) résultant en un bon (milieu B) ou un faible développement (milieu C) des embryons reconstitués par transfert de noyaux dans ces ovocytes maturés. L'étude microscopique a particulièrement montré que les mitochondries des ovocytes maturés dans les milieux A ou B étaient surtout concentrées dans le cortex du cytoplasme ovocytaire, tandis que les mitochondries des ovocytes maturés dans le milieu C présentaient régulièrement une répartition cytoplasmique homogène. Même si ces travaux ont permis de souligner l'importance de l'organisation cytoplasmique durant la maturation ovocytaire, des études supplémentaires devront toutefois être menées afin de déterminer si ces variations de l'organisation cytoplasmique sont directement liées au potentiel de développement des embryons reconstitués.

Un autre point méritant d'être analysé concerne l'examen du métabolisme de différents substrats par les ovocytes bovins. Cela devrait procurer des informations concernant les conditions appropriées de la maturation ovocytaire pour l'acquisition d'un état de compétence compatible avec le développement embryonnaire. Les connaissances concernant les besoins en substrats permettant de soutenir les fonctions cellulaires des ovocytes bovins sont traditionnellement incomplètes. Les ovocytes bovins sont connus pour achever leur méiose spontanément dans une grande variété de milieux de culture contenant du sérum, des hormones et un mélange de substrats énergétiques, voire dans des milieux carencés en tous ces éléments. Mais ce n'est pas parce qu'un ovocyte atteint le stade métaphase II qu'il a forcément le potentiel pour se développer jusqu'au stade blastocyste après transplantation nucléaire et, en ce sens, la composition du milieu de maturation est importante car elle doit fournir à l'ovocyte bovin un environnement de qualité pour le lancer sur les bases d'une initiation correcte du développement embryonnaire. A ce sujet, il a été montré que certaines combinaisons de substrats énergétiques et d'acides aminés influençaient favorablement les processus cellulaires de la maturation *in vitro* des ovocytes bovins (Eppig (1991), Rose et Bavister (1992), Rose-Hellekant et Bavister (1995), cités par 35). Pour Rose-Hellekant et Bavister (1995), une association de glucose et d'un mélange de 11 acides aminés dans le milieu de maturation des ovocytes bovins améliorerait même significativement le développement d'embryons bovins issus de fécondation *in vitro* par rapport aux résultats obtenus avec des associations de pyruvate et de glucose ou de glutamine (tableau 33).

Tableau 33 : Développement d'embryons bovins produits par fécondation *in vitro* d'ovocytes maturés dans des milieux constitués de substrats énergétiques diversifiés (35)

Traitement de maturation	Pourcentage de blastocystes formés/nombre total d'ovocytes
pyruvate + glucose	2 ^c
lactate + glucose	11 ^{ab}
pyruvate + glutamine	2 ^c
lactate + glutamine	9 ^{bc}
glucose + glutamine	13 ^{ab}
glucose + 11 AA ^d	21 ^a
TCM199 ^e	13 ^{ab}

^{a,b,c} Au sein de cette même colonne, les pourcentages présentant des exposants distincts diffèrent significativement ($P < 0,05$).

^d mélange de 11 acides aminés (McKiernan *et al.* (1995), d'après Krisher et Bavister (36)).

^e milieu de culture tissulaire 199.

L'oxydation de différents substrats énergétiques représente le schéma majeur de production d'énergie dans les ovocytes bovins (Rieger et Loskutoff (1994), cités par 35). Or, il a été avéré que l'addition d'hormone lutéinisante (LH) au milieu de maturation des ovocytes bovins se traduisait par une augmentation simultanée du niveau de glycolyse et de l'activité d'oxydation du glucose, de la glutamine, de la glycine et du pyruvate par les mitochondries (Zuelke et Brackett (1992, 1993), cités par 35). Certes, ces observations sont instructives, mais jusqu'ici, il a été impossible de déterminer si l'accroissement de l'activité métabolique des mitochondries pouvait avoir une quelconque répercussion sur le déroulement de l'embryogenèse. Et bien que la LH semble améliorer la qualité des ovocytes en stimulant leur métabolisme durant la maturation *in vitro*, d'autres facteurs épigénétiques doivent certainement intervenir dans la mesure où quelques ovocytes maturés *in vitro* se révèlent être compétents pour le développement embryonnaire en absence de toute stimulation par la LH (Saeki *et al.* (1991), cités par 35). Les travaux de Krisher et Bavister (1998) ont notamment permis de constater que les ovocytes maturés dans des milieux conduisant à une faible compétence de ces derniers pour le développement présentaient des niveaux de glycolyse plus faibles que les ovocytes maturés dans des milieux conduisant à une compétence élevée de ces derniers pour le développement. Dans l'un ou l'autre des milieux, les niveaux d'oxydation des ovocytes demeurent par contre inchangés. Pour Krisher et Bavister (1998), la réduction des niveaux de glycolyse des ovocytes refléterait en fait la diminution de l'activité de la voie métabolique des pentoses phosphate. Cette voie métabolique particulière occuperait donc un rôle central dans l'acquisition par les ovocytes bovins d'un état de compétence pour la suite du développement.

3.5.2. Influence des conditions de culture *in vitro* des embryons reconstitués par transfert nucléaire sur leur développement ultérieur (35)

Il y a encore beaucoup à apprendre sur les relations entre les embryons bovins au stade préimplantatoire et leur environnement immédiat (tractus génital femelle, milieu de culture *in*

vitro) afin d'améliorer la qualité de développement des embryons clonés. Des progrès ont cependant été effectués durant ces dernières années en focalisant les recherches sur les besoins métaboliques et nutritionnels des embryons produits *in vitro* et, de ce point de vue, il apparaît évident que les embryons diffèrent grandement de la plupart des cellules somatiques. Les embryons bovins apparaissent spécifiques par leurs préférences pour des substrats énergétiques et des acides aminés particuliers, et aussi par le fait que leur métabolisme ne repose pas sur une oxydation du glucose, au moins pendant les stades précoces du développement (Javed et Wright (1991), Rieger *et al.* (1992), Thompson *et al.* (1996), cités par 35). L'étude de leurs besoins métaboliques a notamment révélé que, durant les premières étapes de la segmentation, les embryons bovins réalisent préférentiellement l'oxydation de la glutamine et du pyruvate, la glycolyse ne devenant prépondérante qu'après le stade morula (Rieger *et al.* (1992, 1992), cités par 35).

Compte tenu de ces données, la composition des milieux de culture *in vitro* des embryons bovins reconstitués par transplantation nucléaire doit être établie avec soin : il a en effet été démontré que les conditions de culture *in vitro* sont susceptibles d'affecter l'aptitude d'un embryon à métaboliser les substrats énergétiques, et donc sa capacité à se développer normalement (Rieger *et al.* (1995), Barnett et Bavister (1996), cités par 35).

C. DEVELOPPEMENT IN VIVO DES EMBRYONS BOVINS CLONES

1. Efficacité moyenne

1.1. Développement *in vivo* des embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux embryonnaires

Chez les bovins, une proportion non négligeable des blastocystes clonés à partir de blastomères n'est pas capable, après implantation dans l'utérus de receveuses, de se développer à terme. En effet, le transfert de ces embryons est régulièrement suivi de pertes embryonnaires et fœtales sensiblement plus importantes qu'après transplantation d'embryons normaux obtenus *in vivo*, ou d'embryons produits par fécondation *in vitro* (27, 28, 29, 41, 53, 54).

Ainsi, dans une étude de Heyman *et al.* (1995), rapportée par Le Bourhis et Heyman (41), le suivi de gestation après transfert de tels embryons bovins clonés à 104 receveuses montre que le taux de gestations initiées, estimé par le dosage de la concentration plasmatique en progestérone au 21^{ème} jour suivant le transfert embryonnaire, est de l'ordre de 60%, ce qui est proche du taux obtenu en transplantation embryonnaire classique. En revanche, les contrôles échographiques répétés et le dosage régulier de la protéine spécifique de gestation PSP 60 mettent en évidence l'existence de mortalités embryonnaires et fœtales importantes jusqu'au 5^{ème} mois de gestation, puisque le taux de vêlages à terme n'est plus que de 25,9% (tableau 34).

Actuellement, après transfert chez des receveuses, le taux moyen de développement à terme des embryons bovins issus de clonage embryonnaire est généralement de 30%, même si certaines équipes relatent des variations comprises entre 10 et 33% (28, 31, 41, 53, 54, 57, 58). Et bien que des pertes peuvent intervenir longtemps après l'implantation, c'est le plus souvent entre les 30^{ème} et 60^{ème} jours de gestation que le plus grand nombre de gestations établies est perdu (12, 28, 62).

L'origine de ces avortements est mal connue. Cependant, on peut soupçonner un défaut dans l'expression de certains gènes qui se manifeste tardivement (12, 28).

Tableau 34 : Evolution des taux de gestation après transfert à des génisses receveuses de blastocystes bovins issus de clonage embryonnaire (41)

	Nombre	%
Génisses receveuses	104	
Blastocystes transplantés	149	
Receveuses présumées gestantes	64/104	61,5
Receveuses confirmées gestantes		
• Echographie au 35 ^{ème} jour	48/104	46,1
• Echographie au 50 ^{ème} jour	43/104	41,3
• Echographie au 70 ^{ème} jour	40/104	38,4
• Echographie au 90 ^{ème} jour	32/104	30,7
Avortements tardifs	5	
Vêlages	27/104	25,9
Veaux nés vivants (rendement)	33/149	22,1

1.2. Développement *in vivo* des embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux somatiques

Les données disponibles chez les bovins montrent que, quelle que soit la stratégie utilisée pour reconstruire les embryons (cellules donneuses en quiescence ou en prolifération), environ 10% seulement des blastocystes transplantés aboutissent à une naissance. Ce taux est quatre fois plus faible que celui obtenu chez cette espèce avec des embryons issus de fécondation *in vitro*, et trois fois plus faible que celui qui résulte du transfert d'embryons reconstitués à partir de blastomères (55).

Chez les bovins, même si des pertes surviennent aux alentours du 40^{ème} jour de gestation

tardifs (pendant le dernier tiers de la gestation) (13, 42, 50, 52, 56, 65). On estime effectivement, qu'après transplantation chez des receveuses, 40 à 74% des embryons bovins clonés à partir de cellules somatiques meurent pendant les derniers mois de gestation (9 50).

se de clonage somatique ou embryonnaire, une meilleure connaissance des événem

2. Variabilité du développement *in vivo* des embryons bovins clonés

Des différences dans les taux de gestation des embryons bovins clonés existent également suivant les séries de transplantation (41). Là encore, l'expérience de Heyman *et al.* (données non publiées), relatée par Colleau *et al.* (16), nous permet d'illustrer cette variabilité (figure 10).

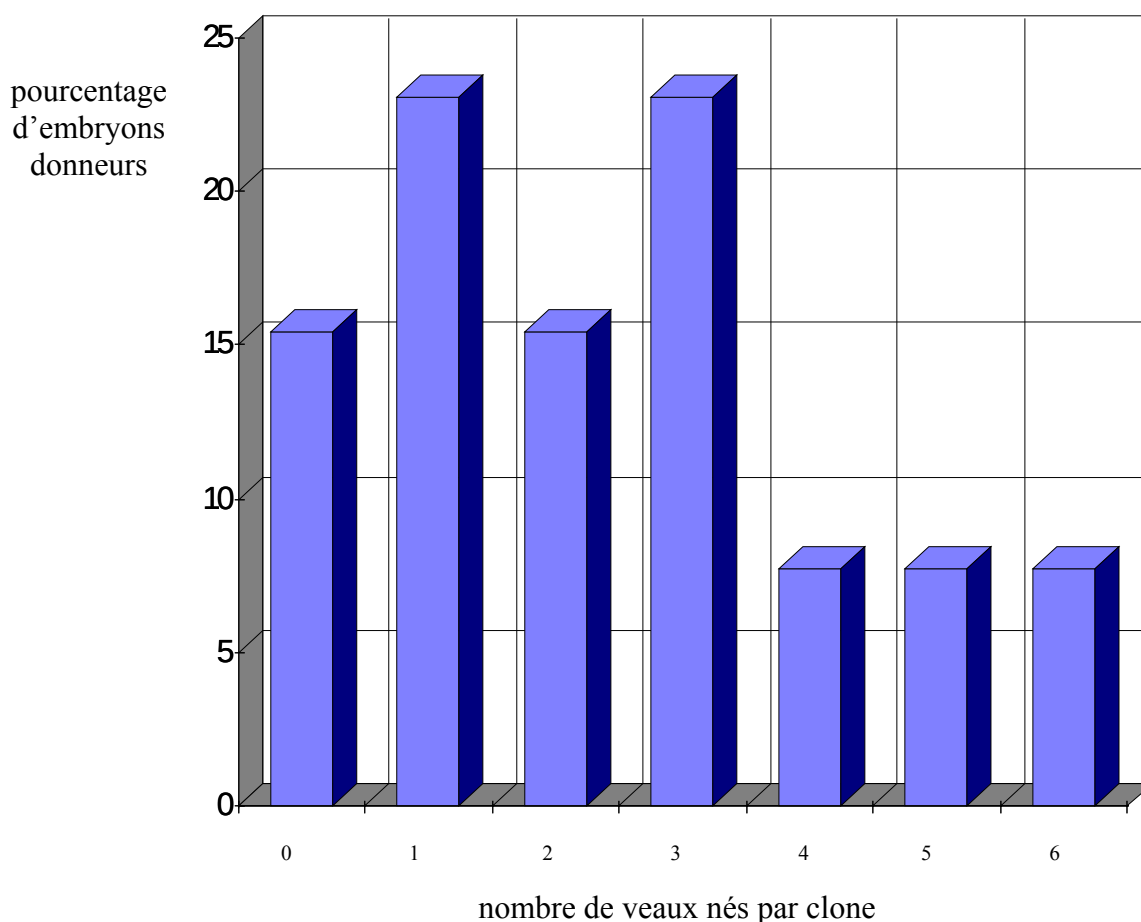


Figure 10 : Variabilité du nombre de veaux nés par clone
(d'après Heyman *et al.*, données non publiées) (16)

Cette étude de Heyman *et al.* suggère que, lors de clonage embryonnaire, les noyaux donneurs pourraient, selon leur génotype, manifester des différences d'aptitude à être correctement reprogrammés, et qu'en conséquence, les taux de multiplication après clonage diffèreraient selon la source de cellules utilisées, et aussi entre séries expérimentales. Ces différences se rencontreraient aussi avec des cultures de cellules somatiques fœtales ou adultes (16).

3. Syndrome placentaire

Les pertes embryonnaires et fœtales observées lors des gestations d'embryons bovins clonés sont régulièrement associées à la présence d'une hydrallantoïde, d'un allantochorion œdémateux, et de structures cotylédonaire anormalement développées qui traduisent l'existence de déficiences fonctionnelles du placenta (13, 32, 39, 55, 62, 63, 76). Inversement, les cotylédons sont parfois complètement absents (62).

Ces anomalies placentaires jouent certainement un rôle dans les taux élevés d'avortements constatés après transfert d'embryons bovins clonés (62).

D'après Kruip et Den Daas (1997), cités par Renard *et al.* (55), ce syndrome placentaire est aussi observé, mais à une fréquence moindre, après transplantation d'embryons produits par fécondation *in vitro*. Ainsi, il pourrait être lié aux conditions de culture utilisées, soit pour l'embryon reconstitué, soit pour les cellules donneuses (55). Il pourrait également être la conséquence d'interactions anormales entre la mère et le fœtus, ou bien encore d'un défaut de reprogrammation des gènes de la cellule donneuse (39).

➤ POINTS FORTS A RETENIR :

- Lors de clonage à partir de noyaux embryonnaires non cultivés, en moyenne 10% des embryons reconstitués sont capables de donner naissance à un veau.
- Lorsqu'on utilise des cellules en culture comme cellules donneuses de noyaux, les taux de naissances sont cette fois compris entre 0,3 et 2%.
- Dans l'état actuel des techniques employées pour la transplantation nucléaire à partir d'embryons bovins frais âgés de 5 à 6 jours, on peut considérer que 10 à 40% des embryons reconstitués sont capables de se développer jusqu'au stade blastocyste compatible avec le transfert dans l'utérus d'une femelle receveuse. Dans certaines conditions expérimentales, il apparaît que la greffe de noyaux de cellules somatiques bovines dans des ovocytes receveurs énucléés peut conduire à un taux de formation élevé des blastocystes (plus de 30% à partir de cellules fœtales).
- Les blastocystes bovins développés *in vitro* après transfert de noyaux présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que les embryons issus de fécondation *in vitro*.
- Chez les bovins, les variations constatées du rendement *in vitro* de formation des blastocystes clonés dépendent des phases du cycle cellulaire dans lesquelles se trouvent les cellules donneuse et receveuse au moment de la fusion, des qualités intrinsèques respectives (âge et taille notamment) de ces cellules, du degré de différenciation des cellules donneuses, mais aussi de la composition des milieux de culture *in vitro* des ovocytes receveurs et des embryons reconstitués.
- Actuellement, après transfert chez des receveuses, le taux moyen de développement à terme des embryons bovins issus de clonage embryonnaire est généralement de 30%. Lors de clonage somatique, environ 10% seulement des blastocystes transplantés aboutissent à une naissance.
- Lors de clonage embryonnaire chez les bovins, c'est le plus souvent entre les 30^{ème} et les 60^{ème} jours de gestation que le plus grand nombre de gestations établies est perdu. Par contre, toujours dans cette espèce, le clonage somatique est surtout caractérisé par un taux relativement élevé (40 à 74% des embryons clonés) d'avortements tardifs (pendant le dernier tiers de la gestation).
- Les pertes embryonnaires et fœtales observées lors des gestations d'embryons bovins clonés sont régulièrement associées à des anomalies de structure et de fonction du placenta (syndrome placentaire). L'origine de ce syndrome placentaire reste à préciser.

IV. NORMALITE ET IDENTITE DES BOVINS CLONES

A. CARACTERISTIQUES DES VEAUX CLONES A LA NAISSANCE

Chez les bovins, le clonage par transfert de noyaux de cellules embryonnaires ou somatiques se traduit généralement par des taux élevés de morbidité et de mortalité post-natales précoces (20, 23, 24, 27, 29, 31, 41, 47, 51, 52, 55, 72). Selon Kruip et Den Daas (1997), cités par Renard (51), le clonage à partir de noyaux embryonnaires bovins non cultivés aboutit en effet, dans 3 à 5% des cas, à la naissance de veaux de santé fragile qui présentent, par conséquent, un risque de mortalité post-natale accru. Lors de clonage somatique, ces taux sont bien supérieurs encore, puisque 30 à 40% des veaux obtenus décèdent dans les jours qui suivent leur naissance (tableau 35 ; 55).

Les observations actuellement disponibles chez les bovins décrivent un syndrome caractérisé par un poids élevé du veau à la naissance (syndrome dit du « gros veau »), une croissance fœtale asynchrone associée à des déformations du squelette, des difficultés respiratoires, des anomalies cardiaques et artérielles, des problèmes rénaux, une régulation thermique anormale, un état d'hypoxie, une hyperlaxité des tendons et un réflexe de succion déficient (20, 23, 24, 27, 29, 31, 41, 46, 47, 53, 55, 56, 68, 72, 74). Le plus souvent, c'est apparemment une seule fonction de l'organisme qui est affectée, qu'il s'agisse de la fonction respiratoire, circulatoire ou immunitaire (55, 56). Parfois, une déviation significative du sex-ratio en faveur des mâles est même observée (72).

On ne connaît pas exactement les causes de ce syndrome pléiotropique, mais elles sont peut-être davantage liées aux conditions de culture *in vitro* de l'embryon reconstitué par transplantation de noyaux plutôt qu'à la technique de transfert nucléaire proprement dite, dans la mesure où ce phénomène est également rapporté pour des veaux issus de fécondation *in vitro* (24, 41, 56, 72). Ce syndrome pourrait aussi résulter de certaines déficiences du métabolisme énergétique au cours de la gestation qui handicaperaient la mise en place des régulations insulino-dépendantes au moment de la mise-bas (24, 25). Quoiqu'il en soit, de tels risques pathologiques méritent d'être analysés avec soin dans le but de développer une procédure de clonage saine, permettant de générer des veaux normaux et viables.

Tableau 35 : Fréquence et caractéristiques des principales anomalies observées chez des veaux issus de clonage somatique (55)

Référence	Nombre de cas/ nombre d'animaux	Période concernée	Principales caractéristiques
(13)	1/5	5 jours après la mise bas	anomalie cardiaque + <i>ductus arteriosus</i> + insuffisance respiratoire
Kato <i>et al.</i> (1998)	4/8	mise bas à + 5 jours	apparence normale : décès pour causes « environnementales »
Zakhartchenko <i>et al.</i> (1999)	1/2	1 jour après la mise bas	problème respiratoire
(56)	3/7	1 jour après la mise bas à + 2 mois	apparences normales mais : - aplasie thymique - hypoplasie lymphoïde + anémie - mort subite à + 24 heures

1. Quelques études

Etude 1 (72)

On retiendra tout d'abord ces travaux de Wilson *et al.* qui ont comparé, sur une durée de trois années consécutives, les poids de naissance de plus de 14000 veaux de races différentes, obtenus soit par clonage embryonnaire (pour 418 d'entre eux), soit par transplantation embryonnaire (4687), soit enfin par insémination artificielle ou monte naturelle (8925).

Résultats (tableau 36)

Les veaux clonés mâles et femelles ont respectivement un poids moyen à la naissance supérieur de 9,7 (24,2%) et 10,4 (27,8%) kg à celui des veaux mâles et femelles issus de transfert embryonnaire, ces derniers ayant eux-mêmes un poids moyen à la naissance supérieur de 3,0 kg (8%) pour les mâles et 2,6 kg (7%) pour les femelles à celui des veaux issus d'insémination ou de monte naturelle. De plus, la variabilité des poids de naissance des veaux clonés est plus grande que les variabilités des poids de naissance des veaux produits, soit par transplantation embryonnaire, soit par insémination artificielle ou monte naturelle. Ainsi, les variabilités des poids de naissance des veaux issus de transfert embryonnaire et d'insémination ou de monte naturelle sont approximativement deux à trois fois (pour les mâles) et deux à cinq fois (pour les femelles) moins élevées que la variabilité des poids de naissance des veaux clonés.

Tableau 36 : Comparaison des poids de naissance (kg) de veaux produits par transfert nucléaire, transfert embryonnaire et insémination artificielle ou monte naturelle (72)

Origine des veaux	Sexe	Nombre de veaux	Moyenne des poids de naissance (kg)	Distribution des poids de naissance (kg)
Clonage	mâle	270	49,5 ^a	24,5-81,6
Transfert embryonnaire	mâle	2466	39,9 ^b	18,1-78,0
Insémination artificielle/Monte naturelle	mâle	4745	36,8 ^c	15,4-72,6
Clonage	femelle	148	47,5 ^a	21,8-82,6
Transfert embryonnaire	femelle	2221	37,1 ^b	15,4-65,3
Insémination artificielle/Monte naturelle	femelle	4180	34,6 ^c	15,9-71,2

^{a,b,c} Les moyennes des poids de naissance présentant des exposants différents au sein de cette même colonne sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Wilson *et al.* ne s'en sont pas tenus à ces observations : ils ont également comparé les poids de naissance des veaux de chacune des catégories précédentes en considérant l'influence du facteur ascendance sur les résultats observés. Ils ont ainsi montré que les veaux clonés ont un poids moyen de naissance supérieur de 20 à 35% au poids moyen de naissance de veaux issus de transplantation embryonnaire et ayant même pères, ces derniers ayant à leur tour un poids moyen de naissance supérieur de 5% à celui de veaux issus d'insémination artificielle ou de monte naturelle et ayant également même pères. De même, lorsque les veaux sont cette fois issus des mêmes pères et mères, les veaux clonés ont un poids moyen de naissance supérieur de 20,7% (pour les mâles) à 26,5% (pour les femelles) au poids moyen de naissance des veaux issus de transfert embryonnaire, ces derniers ayant par contre un poids moyen de naissance identique à celui des veaux issus d'insémination ou de monte naturelle.

Par ailleurs, la durée moyenne des gestations des veaux clonés n'est pas statistiquement différente de celle des veaux produits par transfert embryonnaire, insémination artificielle ou monte naturelle. Enfin, la race des femelles receveuses n'influence pas le poids de naissance des veaux clonés.

Discussion

Pour Wilson *et al.*, l'interprétation de ces données suggère que l'accroissement du poids de naissance et de la variabilité de ce poids chez les veaux clonés serait attribuable à la procédure de clonage elle-même, sans qu'il soit possible de préciser davantage la (ou les) étape(s) en cause. En fait, il est impossible pour les auteurs de cette étude de séparer l'effet du transfert nucléaire lui-même de celui de la culture *in vitro* puisque ces derniers n'ont pas cherché à analyser les données provenant de veaux issus de fécondation *in vitro*.

Les travaux de Wilson *et al.* ont par ailleurs permis de constater que l'augmentation de la taille des veaux clonés était harmonieuse, puisque ceux-ci n'étaient pas excessivement gros ou œdémateux. Jamais dans cette expérience, l'apparence physique des veaux clonés, même les plus gros, n'est apparue anormale. Par contre, de façon prévisible, la taille des veaux clonés a été responsable d'une élévation de l'incidence des dystocies et des mortalités péri- et postnatales. En outre, les auteurs ont observé que les veaux clonés présentaient une fréquence plus importante d'anomalies des membres que les autres catégories de veaux.

Etude 2 (24)

Matériels et méthodes

Dans cette étude de Garry *et al.*, 40 veaux ont été produits par clonage embryonnaire. Les embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux ont été cultivés *in vivo* dans des oviductes ligaturés de brebis avant leur transfert définitif dans l'utérus de 40 receveuses (38 primipares et 2 génisses). Au moment de la mise-bas, les veaux ont tous été délivrés par césarienne, les opérateurs ayant toutefois attendu le déclenchement naturel du travail pour intervenir. La durée de la gestation, la présence de méconium, le poids de naissance, la conformation des membres, le temps nécessaire pour que chaque veau parvienne à adopter la station debout, ainsi qu'une évaluation subjective du type morphologique de chaque animal ont été scrupuleusement notifiés. L'examen des caractéristiques physiques de chaque veau a été systématiquement réalisé dans les cinq minutes suivant leur naissance, puis répété à chaque fois qu'un échantillon sanguin était prélevé.

Les veaux se voyaient ensuite offrir le colostrum de leurs mères via des biberons. Si un veau ne réussissait pas à téter pas dans les 2 heures suivant sa naissance, il recevait 2 litres de colostrum par le biais d'une intubation œsophagienne. Juste après l'extraction par césarienne, les veaux qui en avaient besoin ont reçu les soins nécessaires (ventilation, massage cardiaque, fluidothérapie intraveineuse et/ou administration d'analeptiques cardiorespiratoires). Après évaluation des veaux et analyse de leurs bilans sanguins, d'autres thérapies médicales (oxygénothérapie intranasale, fluidothérapies intraveineuses additionnelles, complémentation nutritionnelle, antibiothérapie parentérale) ont été instituées, et ce, jusqu'à ce qu'un retour à la normale soit constaté.

D'autre part, des échantillons sanguins ont été recueillis sur chaque veau vivant, soit à la veine jugulaire (5, 10, 30 et 60 minutes après la naissance), soit à l'artère brachiale (10, 30 et 60 minutes après la naissance) en vue d'analyses immédiates ou différées.

Résultats

1. Caractéristiques physiques des veaux clonés à la naissance

Parmi les 40 veaux clonés ainsi obtenus, on recense 39 mâles pour une seule femelle, répartis en 17 clones comprenant chacun entre un à six individus. La durée moyenne de gestation était de 293,2 ($\pm$ 7,7) jours. Le poids moyen des veaux à la naissance était de 48,5 ($\pm$ 10,1) kg avec un étagement de 26,4 à 67,3 kg. L'appréciation subjective de la morphologie des veaux a révélé des types corporels parfois très variables au sein d'un même clone.

Quelques anomalies affectant les membres des veaux clonés ont également été observées : ainsi, le veau le plus lourd (67,3 kg), du fait d'une sévère contracture bilatérale affectant les membres antérieurs, ne pouvait pas se tenir debout sans soutien externe. La correction de cette déformation a nécessité une ténotomie bilatérale des tendons fléchisseurs superficiels. Quatre

autres veaux provenant tous de clones différents, et pesant 34,1, 48,8, 62,7 et 65,9 kg à la naissance, présentaient des fléchissements bénins de leurs membres antérieurs, tandis que deux autres veaux issus cette fois du même clone, et pesant 45,5 et 55,9 kg à la naissance, étaient caractérisés par des hyperextensions tarsales bilatérales, relativement modérées toutefois. Toutes ces anomalies ont régressé sans traitement.

Les températures rectales des veaux clonés à la naissance étaient normales ($39,5 \pm 0,4$ °C), mais 15 d'entre eux se trouvaient en hypothermie ($< 38,3$ °C) une heure après la naissance. Enfin, dix veaux avaient évacué leur méconium à la naissance.

2. Caractéristiques comportementales des veaux clonés à la naissance

L'intervalle de temps entre la naissance et le moment où chaque veau était capable de se tenir debout sans assistance s'est avéré très variable (15 à 5760 minutes), avec une moyenne de 429,6 ($\pm 972,1$) minutes, et une valeur médiane de 120 minutes.

Dans les deux heures suivant leur naissance, neuf veaux n'ont, ni tété leur mère, ni bu le colostrum qui leur était proposé à la bouteille : le colostrum leur a donc été administré à la sonde gastrique. Après cette prise initiale de colostrum, les veaux ont été classés suivant trois modèles de comportement alimentaire. Dans la première catégorie, ont été classés six veaux qui rejoignaient facilement leurs mères et qui les tétaient normalement. La seconde catégorie regroupait la grande majorité des veaux ($n = 24$), c'est-à-dire ceux qui avaient normalement bu le premier colostrum au pis de leur mère ou à la bouteille, mais qui, suite à cette prise initiale, ont présenté un réflexe de succion faible à absent. Cependant, suite à la mise en place d'une oxygénothérapie intranasale qui a permis de corriger les faibles pressions artérielles en oxygène de ces veaux, ceux-ci ont recommencé à téter facilement leurs mères ou les bouteilles qui leur étaient proposées. La plupart de ces 24 veaux ont toutefois eu besoin d'une assistance manuelle pour se tenir debout et/ou pour trouver les trayons de leurs mères, mais au total, tous arrivaient à téter dans les 12 heures suivant leur naissance. Enfin, le troisième groupe se composait de dix veaux qui se désintéressaient complètement de la tétée et sur lesquels l'oxygénothérapie n'a eu aucun impact : ces dix veaux ont dû être alimentés par une sonde gastrique pendant une durée variant de 12 à 72 heures.

3. Caractéristiques physiologiques des veaux clonés à la naissance

Le tableau 37 rapporte quelques valeurs biochimiques sanguines intéressantes (pressions artérielles en oxygène (O_2) et dioxyde de carbone (CO_2) de veaux respirant l'air ambiant, pH sanguin, concentrations plasmatiques en bicarbonates, glucose et lactate, balance anionique) mesurées peu après la naissance de ces veaux clonés.

Tableau 37 : Pressions artérielles en O_2 et CO_2 , pH sanguin, concentrations plasmatiques en bicarbonates, glucose et lactate, et balance anionique de veaux clonés nouveau-nés (24)

Paramètres mesurés moyenne ($\pm$ écart-type) médiane (minimum - maximum) nombre de veaux prélevés	Temps (minutes) après la naissance		
	10	30	60
Pression artérielle en oxygène (mm Hg)	38,1 ($\pm$ 14,0) 34,2 (15,9 - 75,8) n = 28	42,1 ($\pm$ 10,6) 40,8 (29,1 - 60,8) n = 21	45,2 ($\pm$ 11,4) 44,2 (21,6 - 67,1) n = 21
Pression artérielle en dioxyde de carbone (mm Hg)	60,1 ($\pm$ 17,9) 59,4 (26,5 - 137,4) n = 28	51,6 ($\pm$ 6,3) 50,5 (42,4 - 61,2) n = 21	51,5 ($\pm$ 12,0) 48,2 (39,7 - 98,7) n = 21
pH	7,19 ($\pm$ 0,14) 7,22 (6,68 - 7,35) n = 28	7,27 ($\pm$ 0,07) 7,28 (7,13 - 7,40) n = 21	7,28 ($\pm$ 0,14) 7,30 (6,73 - 7,38) n = 21
Concentration plasmatique artérielle en bicarbonates (mEq/L)	22,1 ($\pm$ 4,8) 22,6 (7,4 - 29,2) n = 28	22,7 ($\pm$ 4,3) 21,7 (14,2 - 29,3) n = 21	22,9 ($\pm$ 3,9) 23,5 (11,8 - 29,0) n = 21
Concentration plasmatique veineuse en glucose (mg/dl)	66,6 ($\pm$ 33,7) 67 (24 - 144) n = 33	74,0 ($\pm$ 53,7) 54 (11 - 244) n = 29	83,6 ($\pm$ 53,1) 68 (28 - 292) n = 32
Concentration plasmatique veineuse en lactate (mg/dl)	97,0 ($\pm$ 56,4) 88,2 (31,2 - 252,0) n = 27	n.d.	80,0 ($\pm$ 49,8) 73,2 (15,1 - 220,2) n = 29
Balance anionique (mEq/L)	26,8 ($\pm$ 8,9) 25,0 (13,0 - 51,0) n = 36	n.d.	24,7 ($\pm$ 6,6) 23,6 (14,6 - 44,6) n = 21

Une variabilité considérable existe entre les veaux clonés pour certains paramètres. Par exemple, bien que la valeur moyenne de la glycémie ($66,6 \pm 33,7$ mg/dl) des veaux prélevés à 10 minutes fût normale, certains veaux se trouvaient en hypoglycémie (< 50 mg/dl) à 10 minutes (n = 14), 30 minutes (n = 11) et 1 heure (n = 8) après leur naissance. Similairement, même si la valeur moyenne de la concentration plasmatique en bicarbonates ($22,1 \pm 4,8$ mEq/L) des veaux prélevés à 10 minutes était normale, six veaux présentaient au même moment une acidose métabolique sévère (entre 7,4 et 17,4 mEq HCO_3^- /L).

Nous pouvons par ailleurs remarquer que la pression artérielle en oxygène des veaux respirant l'air ambiant est plutôt basse par rapport aux valeurs normales, mais il faut préciser que l'expérience se déroulait à 1524 mètres d'altitude, justifiant quelque peu les valeurs

rapportées ($38,1 \pm 14,0$, $42,1 \pm 10,6$ et $45,2 \pm 11,4$ mm Hg à, respectivement, 10, 30 et 60 minutes).

Les auteurs ont montré que la durée de gestation des veaux clonés était positivement corrélée à leur poids de naissance ($P < 0,05$, $R^2 = 0,149$). Par contre, ils n'ont constaté aucune corrélation entre le poids de naissance des veaux clonés et le temps nécessaire pour qu'ils se tiennent debout, ou leur température rectale, ou encore les concentrations plasmatiques en glucose et bicarbonates, ou enfin la pression artérielle en oxygène ($P > 0,05$).

4. Suivi clinique des veaux clonés

Les veaux ont été maintenus en unité de soins jusqu'à ce que soient corrigées les anomalies biochimiques et physiologiques. 34 des 40 veaux étudiés ont ainsi dû subir une véritable thérapie médicale. Les traitements pratiqués ont varié depuis une procédure complète de réanimation ($n = 4$) jusqu'à des mesures d'assistance plus spécifiques telles que le réchauffement des veaux clonés ($n = 19$), la mise en œuvre de complémentations nutritionnelles ($n = 34$), d'insufflations nasales ($n = 34$), d'antibiothérapies parentérales ($n = 11$), voire de fluidothérapies intraveineuses ($n = 9$). Dans ces conditions, la durée moyenne d'hospitalisation de chaque veau était de $2,3 \pm 3,0$ jours, 21 des 34 veaux ayant toutefois été hospitalisés durant moins d'une journée. Par la suite, 12 veaux âgés de 4 jours à 6 semaines ont à nouveau été admis dans cette unité de soins. Ils présentaient un ou plusieurs des problèmes suivants : infection ombilicale ($n = 5$), diarrhée ($n = 4$), pneumonie ($n = 5$), déformation des membres ($n = 1$), septicémie ($n = 2$), et apathie d'origine inconnue ($n = 1$).

5. Résultats des autopsies

Huit des 40 veaux clonés obtenus sont morts et une autopsie détaillée a été réalisée sur chacun d'entre eux. Le veau décédé le plus rapidement (29 heures après la naissance) présentait un goitre volumineux, une rétention de méconium, ainsi qu'une septicémie aiguë. Le veau décédé à l'âge le plus avancé (14 semaines) est mort de façon inattendue alors qu'il était en train d'être manipulé : son autopsie a révélé une broncho-pneumonie sévère à *Pasteurella*. Trois veaux sont décédés entre 7 et 18 jours d'âge d'infections bactériennes sérieuses (septicémie aiguë à *Escherichia coli*, pneumonie chronique à *Pseudomonas*, infection post-septicémie d'étiologie inconnue), apparemment contractées après la naissance. Une euthanasie a été effectuée sur un veau de 4 semaines qui souffrait d'une importante apathie chronique : l'autopsie a permis de mettre en évidence une entérite à rotavirus, un abcès ombilical, ainsi qu'une polyarthrite fibrineuse. Seuls les deux derniers veaux morts semblent n'avoir souffert d'aucune infection bactérienne : l'autopsie du premier de ces veaux, décédé brutalement à 3 semaines, a en effet identifié une torsion de la racine du mésentère comme cause de la mort, tandis que l'autopsie du deuxième veau, décédé tout autant brutalement à 9 semaines, a souligné plusieurs signes de défaillance cardiaque (effusions pleurales et péritonéales, dilatation du cœur, congestion hépatique), sans qu'aucune malformation congénitale n'ait pu être constatée.

6. Concentrations du plasma des veaux clonés en hormones et métabolites

Ces mesures ont été effectuées sur un échantillon de 21 veaux clonés durant leur première heure de vie et sont relatées dans le tableau 38.

Tableau 38 : Concentrations en hormones et métabolites d'échantillons de plasma de veaux clonés prélevés durant la première heure de vie (24).

Paramètres mesurés moyenne (± écart-type)	n	Naissance	10 minutes	30 minutes	60 minutes
Hormone de croissance (ng/ml)	21	12,3 (2,2) ^a	11,6 (2,2) ^a	11,8 (2,1) ^a	12,5 (3,2) ^a
Glucagon (pg/ml)	15	145,8 (26,9) ^a	108,7 (24,8) ^a	140,2 (34,8) ^a	110,8 (31,2) ^a
IGF-1 (ng/ml)	19	236,0 (26,2) ^{ab}	246,2 (27,2) ^a	243,5 (30,9) ^a	209,5 (23,5) ^b
Cortisol (ng/ml)	21	102,8 (7,1) ^{ab}	112,6 (5,9) ^a	112,0 (5,9) ^a	99,8 (6,4) ^b
Thyroxine (ng/ml)	19	50,1 (3,7) ^{ab}	46,8 (3,1) ^a	ND	57,1 (4,0) ^b
Triiodothyronine (ng/ml)	18	0,43 (0,08) ^a	0,53 (0,10) ^a	ND	1,97 (0,43) ^b
Insuline (μU/ml)	21	11,7 (1,2) ^a	13,3 (1,8) ^{ab}	16,1 (2,5) ^{bc}	19,5 (2,9) ^c
Glucose (mg/dl)	21	51,6 (6,5) ^a	67,7 (8,4) ^{ab}	66,9 (8,9) ^{ab}	78,6 (13,3) ^b
Acides gras libres (nmol/ml)	21	108,7 (10,4) ^a	112,7 (11,2) ^a	332,1 (64,3) ^b	664,4 (105,7) ^c

IGF-1 : insulin-like growth factor-1.

Sur une même ligne, les valeurs avec des exposants différents diffèrent significativement (Analyse de la variance, $P < 0.05$).

Dans cette étude, il apparaît que les concentrations plasmatiques en hormone de croissance et en glucagon des veaux clonés ne sont pas modifiées avec le temps (au moins pendant la première heure de vie). Ce n'est pas le cas des niveaux plasmatiques en IGF-1, cortisol, thyroxine, triiodothyronine, glucose et acides gras libres qui ne cessent d'évoluer au cours de la première heure suivant la naissance de ces veaux.

A la naissance ou 10 minutes après la naissance, les auteurs ont montré qu'aucun des paramètres analysés (exception faite du glucagon) n'était significativement corrélé au poids de naissance des veaux clonés ($P = 0,18$ à $0,97$). Par contre, la corrélation entre la concentration plasmatique en glucagon et le poids de ces veaux est pratiquement significative au moment de la naissance ($P < 0,07$, $R^2 = 0,184$), et véritablement positive 10 minutes après celle-ci ($P < 0,01$, $R^2 = 0,449$).

Discussion

Dans cette expérience, les poids de naissance entre veaux clonés se sont avérés très variables, y compris pour ceux provenant d'un même embryon. Pour Holland et Odde (1992), cités par Garry *et al.*, ce constat amène à penser que les schémas de croissance de fœtus pourtant génétiquement identiques sont très différents d'un fœtus à l'autre, certainement du fait d'influences environnementales variées.

Si sept veaux sur 40 ont présenté des anomalies affectant leurs membres, un seul de ces veaux a dû subir un traitement pour un retour à une locomotion normale. D'après Garry *et al.*, Adams (1990) souligne que de telles anomalies ne sont pas rares à la naissance, surtout lorsque des fœtus se retrouvent parfois fortement comprimés *in utero* en raison de leur grande taille.

D'un point de vue comportemental, ces veaux clonés étaient plutôt apathiques et affaiblis. Par exemple, si ces veaux étaient en moyenne capables de se tenir debout deux heures après leur naissance, ce qui est, en l'occurrence, à peine supérieur aux chiffres annoncés chez les veaux non-clonés, la plupart d'entre eux mettaient toutefois bien plus de temps à adopter cette station. Par ailleurs, la plupart de ces veaux ne étaient pas vigoureusement, même lorsque les premières doses de colostrum avaient été administrées dans les deux heures suivant leur naissance. Pour Blood et Radostits (1989), cités par Garry *et al.*, ces attitudes constituent autant de facteurs pouvant expliquer l'augmentation des taux de morbidité et de mortalité des veaux clonés à la naissance.

Les quelques mesures de paramètres cliniques réalisées sur les veaux clonés de cette expérimentation avaient pour but de fournir des informations permettant d'orienter les décisions thérapeutiques à prendre, et donc, de maximiser les chances de survie des 40 veaux obtenus. Quand des anomalies étaient avérées par la mesure de ces paramètres, des traitements individuels adaptés pouvaient alors être institués.

Le fait que tous les veaux clonés, à l'exception d'un seul, survivent au-delà de leur première semaine de vie indique clairement que les traitements mis en place correspondaient bien aux problèmes détectés, et que d'autre part, ces problèmes ne résultaient en aucun cas de défauts anatomiques. Six veaux (dont une euthanasie) sont pourtant décédés suite à des infections bactériennes ou virales, aiguës ou chroniques, probablement contractées à la naissance ou après celle-ci, et non *in utero*, puisque selon Garry *et al.*, Brewer (1990) avait auparavant montré que les infections bactériennes ou virales antérieures à la naissance se traduisaient chez le veau nouveau-né par une élévation du fibrinogène plasmatique ainsi que par un hémogramme anormal, ce qui n'est pas le cas ici.

La preuve d'un transfert d'immunoglobulines maternelles aux veaux clonés n'a pas pu être apportée dans ce travail, les mesures requises n'ayant pas été pratiquées. Cependant, Garry *et al.* rapportent les observations de plusieurs auteurs, selon lesquels, les veaux qui ne se relèvent pas facilement ou qui ont des difficultés à téter leur mère (Aldridge *et al.*, 1992), ou ceux qui souffrent d'hypoxie (Tyler et Ramsey, 1991), ou d'acidose respiratoire postnatale (Besser *et al.*, 1990), n'auraient pas bénéficié d'un transfert d'immunoglobulines satisfaisant. Dans la mesure où ces caractéristiques cliniques étaient retrouvées sur la plupart des veaux clonés de cette expérience, il est logique de penser que ces derniers avaient probablement subi un transfert plutôt faible d'immunoglobulines colostrales, les prédisposant ainsi à des taux élevés d'infections postnatales. Une meilleure connaissance du statut immunitaire de ces veaux clonés aurait certainement permis de diminuer l'incidence des infections acquises et des mortalités résultantes.

Pour Bondioli (1992), Seidel (1992) et Willadsen *et al.* (1991), cités par Garry *et al.*, plusieurs causes (dystocie, anomalies congénitales) peuvent expliquer les taux élevés de morbidité/mortalité des veaux clonés nouveau-nés. Dans cette étude, comme tous les veaux ont été extraits par césarienne, sans manipulations préalables, les opérateurs ayant en outre attendu le déclenchement naturel du travail pour intervenir, les effets négatifs d'éventuelles situations de dystocie et d'inductions artificielles de la mise-bas réalisées à des moments inopportuns pouvaient être éliminés. De plus, l'absence d'anomalies organiques dans le petit nombre d'animaux autopsiés ainsi que l'apparente normalité des veaux ayant suivi un traitement suggèrent que ces taux élevés de morbidité et de mortalité ne sont pas imputables à des malformations congénitales ou à des troubles de la maturation tissulaire.

La plupart des 40 veaux ont présenté dans la période du post-partum immédiat une faiblesse générale, de l'hypothermie, de l'hypoxie, de l'hypoglycémie, ainsi qu'une acidose métabolique. La considération globale de ces anomalies évoque une défaillance du métabolisme énergétique. Pour confirmer ceci, les auteurs ont mesuré les concentrations de certains métabolites énergétiques plasmatiques ainsi que celles de certaines hormones circulantes.

D'après Girard (1986), cité par Garry *et al.*, chez les mammifères (rat, lapin mouton, homme), la glycémie fœtale est normalement déterminée par la diffusion du glucose « maternel » au travers du placenta, ainsi que par les sécrétions en insuline du pancréas fœtal. Du fait d'adaptations rapides des sécrétions fœtales en glucagon et en insuline, le fœtus ne connaît pas de fluctuations importantes de sa glycémie. Selon Sperling (1988), cité par Garry *et al.*, les tissus fœtaux sont plus riches que ceux de l'adulte en récepteurs à insuline, mais possèdent a contrario moins de récepteurs à glucagon : de ce fait, les prélèvements de glucose par le fœtus sont favorisés, et la croissance fœtale est ainsi stimulée. Toujours d'après Sperling (1988), lorsque, à la naissance, l'approvisionnement en glucose du fœtus par le biais du cordon ombilical cesse brutalement, les concentrations fœtales plasmatiques en glucose et en insuline décroissent, tandis que celles en catécholamine et en glucagon augmentent. L'insulinémie chute et reste basse jusqu'à ce que la glycémie se stabilise, tandis que les concentrations en acides gras libres s'élèvent. Pour Sperling (1988), ces modifications hormonales entraînent la mobilisation du glucose, en même temps qu'elles stimulent la lipolyse et la cétogenèse.

Pour revenir à l'étude de Garry *et al.*, il est possible que l'environnement utérin des veaux clonés crée chez ceux-ci des schémas d'apport et d'utilisation de l'énergie différents de ceux habituellement rencontrés chez les veaux non-clonés, ce qui pourrait d'ailleurs expliquer les spécificités de la croissance fœtale des veaux clonés, ainsi que les troubles de la régulation énergétique rencontrés par ceux-ci lors de leur passage à la vie extra-utérine. Les fluctuations de certains paramètres mesurés sur les veaux clonés durant leur première heure de vie traduisent en quelque sorte les difficultés posées par l'établissement d'un équilibre énergétique chez ces animaux, mais révèlent également des déficiences dans la sensibilité des différents tissus aux hormones.

Nous pouvons par exemple constater que, 10 minutes après leur naissance, les concentrations plasmatiques en thyroxine (T4) et en triiodothyronine (T3) sont plus faibles chez les veaux clonés que chez des veaux référence. Or, comme le premier mécanisme de la thermogenèse des veaux nouveaux-nés est T3-dépendant, Fisher (1992), cité par Garry *et al.*, a montré, qu'en dépit de soins soutenus, les veaux clonés évoluaient presque inévitablement vers une hypothermie. Le rôle joué par l'hypothyroïdisme dans les particularités des veaux clonés nouveaux-nés mériterait cependant d'être clarifié. Il en va de

même des relations entre les concentrations périphériques des hormones thyroïdiennes et le modèle de développement des récepteurs hépatiques à insuline. D'après Garry *et al.*, une expérience conduite par Serman *et al.* (1983) sur des fœtus de lapins en hypothyroïdie a démontré que l'hypothyroïdisme réduisait le nombre et l'affinité pour leur substrat des récepteurs hépatiques à insuline. Parallèlement à cette observation, on peut imaginer que les faibles concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes des veaux clonés nouveaux altéreraient l'affinité des différents tissus de ces veaux pour l'insuline, entraînant par là même une augmentation immédiate des concentrations périphériques en insuline.

Contrairement à l'insuline, les concentrations plasmatiques en hormone de croissance, IGF-1, cortisol et glucagon étaient relativement stables chez les veaux clonés durant la première heure de leur vie, et n'étaient pas très différentes des concentrations relevées chez des veaux témoins au même moment de la période post-partum (10 min). Il semble par conséquent improbable que ces hormones soient impliquées dans les caractéristiques cliniques inhabituelles des veaux clonés.

En conclusion, nous retiendrons que Garry *et al.* (1996) émettent l'hypothèse, dans cette étude, que les anomalies néonatales (poids de naissance élevés, taux de morbidité/mortalité importants) des veaux clonés reposent sur des perturbations de la régulation énergétique fœto-placentaire. Ces dérèglements seraient peut-être liés aux modifications de l'environnement des embryons clonés durant les premières étapes de la procédure de clonage par transplantation nucléaire et/ou durant la période de culture *in vitro*.

Etude 3 (25)

Prolongeant les travaux précédents, Garry *et al.* ont prélevé *in utero* des échantillons sanguins sur des fœtus bovins issus d'embryons clonés (à partir de blastomères) et non clonés, et se trouvant à des stades de gestation avancés, dans le but de comparer leurs profils énergétiques et hormonaux respectifs. Ils ont ainsi cherché à vérifier que certaines aberrations métaboliques chroniques observées durant la gestation des veaux clonés pouvaient expliquer les difficultés néonatales de ces derniers.

Dans cette optique, les auteurs ont transplanté huit embryons (quatre embryons clonés et quatre embryons non clonés) dans autant de femelles receveuses. Entre les 255^{ème} et 265^{ème} jours de gestation, après anesthésie générale des receveuses, une canule a été placée dans une artère fémorale de chaque fœtus. Par ce procédé, la récupération quotidienne d'échantillons sanguins artériels a pu être effectuée sur chaque fœtus jusqu'au moment de la mise-bas qui, selon les cas, a eu lieu entre les 272^{ème} et 287^{ème} jours de gestation (la durée moyenne des gestations étant de 277,6 jours). Sept des huit receveuses ont mis au monde des veaux vivants ne présentant aucun signe (clinique ou après mise en culture d'échantillons sanguins) apparent d'infection. Un des fœtus clonés est mort-né des suites d'une infection contractée avant la mise-bas. Pour chaque fœtus, quatre prélèvements sanguins (les échantillons recueillis immédiatement après la pose de la canule ou juste avant le part ayant été exclus de l'étude) ont été utilisés pour les mesures de différents paramètres (concentrations plasmatiques en substrats énergétiques et en hormones de régulation de la croissance et du métabolisme énergétique).

L'interprétation des valeurs obtenues (tableau 39) montre que les concentrations plasmatiques moyennes en thyroxine ($94,8 \pm 29,9$ ng/ml, $P = 0,69$), en cortisol ($11,9 \pm 12,6$ ng/ml, $P = 0,38$), en hormone de croissance ($25,0 \pm 6,4$ ng/ml, $P = 0,61$), en glucagon ($102,7 \pm 79,1$ pg/ml, $P = 0,98$), ou en lactate ($3,3 \pm 1,2$ mmol/L, $P = 0,98$) ne sont

pas significativement différentes (test statistique de l'analyse de la variance) entre les groupes d'individus clonés et non clonés. Par contre, des différences significatives ($P < 0,1$), parfois très marquées, entre les deux lots d'animaux ont été constatées pour certains autres paramètres (IGF-1, IGF-2 (insulin-like growth factor-2) et la pression artérielle en oxygène).

Tableau 39 : Valeurs de quelques paramètres artériels de fœtus bovins clonés et non clonés d'âge avancé (entre 255 et 287 jours de gestation) (25)

Paramètres mesurés	Fœtus clonés (n = 3)		Fœtus témoins (n = 4)		Risque statistique P
	moyenne (± écart-type)	médiane	moyenne (± écart-type)	médiane	
Triiodothyronine (ng/ml)	0,32 (± 0,11)	0,31	0,55 (± 0,36)	0,38	0,26
Insuline (μU/ml)	3,6 (± 3,1)	2,4	7,0 (± 4,2)	7,1	0,21
IGF-1 (ng/ml)	62,6 (± 27,2)	56,2	92,3 (± 26,0)	94,0	0,09
IGF-2 (ng/ml)	150,2 (± 74,2)	138,3	233,6 (± 88,1)	240,0	0,08
Pression artérielle en oxygène (mm Hg)	17,8 (± 4,4)	19,2	23,8 (± 3,4)	24,1	0,05
Glucose (mg/dl)	21,5 (± 9,3)	19,8	24,2 (± 3,8)	24,3	0,34

Tous les veaux témoins sont apparus aptes à se déplacer et à se nourrir vigoureusement avant la fin de leur première heure de vie, et d'autre part, ils n'ont présenté aucune anomalie significative, ni dans leur équilibre acido-basique sanguin, ni dans l'oxygénation de leur sang. Le poids de naissance des veaux clonés n'était pas significativement supérieur à celui des veaux témoins ($P = 0,14$). Deux veaux clonés sont décédés entre 1 et 5 heures suivant leur naissance en dépit de soins de réanimation intensifs. Les veaux clonés souffraient tous d'acidose métabolique et respiratoire sévère, d'hypoxie et d'hypothermie. Ils présentaient par ailleurs un réflexe de succion déficient, et n'étaient pas capables de se tenir debout dans les quatre premières heures de leur vie.

Toutes ces observations sont compatibles avec l'étude précédente de Garry *et al.* (24). Là encore, les résultats de cette expérience laissent supposer que les schémas de régulation énergétique utilisés par les fœtus clonés sont différents de ceux utilisés par les fœtus non clonés. L'hypothèse selon laquelle des perturbations du métabolisme énergétique des fœtus clonés auraient des répercussions sur les caractéristiques morphologiques, physiologiques et comportementales de ceux-ci trouve donc ici un nouvel écho.

Etude 4 (32)

L'objectif de ce travail de Hill *et al.* consistait à décrire non seulement les anomalies néonatales d'un groupe de veaux clonés, mais aussi l'évolution clinique de ces animaux après instauration de traitements appropriés, et également les caractéristiques anatomiques et histologiques des fœtus et veaux clonés décédés à des moments variables de l'étude.

Matériels et méthodes

Tous les fœtus et veaux clonés de cette expérimentation ont été obtenus à partir d'une lignée génétiquement modifiée de fibroblastes prélevés sur un fœtus mâle de race Holstein. 13 embryons reconstitués par transfert nucléaire avec ces fibroblastes ont été transférés chez 12 femelles receveuses et ont conduit à la naissance de huit veaux vivants. Sur 12 receveuses, une vache a avorté à 8 mois de gestation et trois autres sont mortes entre 7 jours et 2 mois avant le terme. Les huit autres vaches ont été admises en unité d'observation et de soins intensifs jusqu'au moment de leur part. Au total, les morts de cinq fœtus, deux veaux et quatre vaches receveuses ont été rapportées à différentes périodes de la procédure expérimentale, et des autopsies ont systématiquement été réalisées sur ces animaux décédés.

Résultats

Six des huit vaches admises dans l'unité de soins présentaient une cétonurie modérée à élevée, et deux d'entre elles ont immédiatement été traitées par administration orale de 240 ml de propylène glycol. Sur ces deux vaches, une d'entre elles, la mère porteuse du veau 1, est demeurée anorexique pendant plus de 12 heures après son admission, et en sus du traitement oral, elle a donc subi une injection intraveineuse de 500 ml d'une solution de glucose, et a reçu, via une sonde gastrique, 1,8 kg de granulés de luzerne homogénéisée sur une durée de 24 heures. Les quatre autres vaches ont, par intermittence, manifesté une cétonurie peu importante jusqu'au moment du part, mais ont conservé un appétit normal, et de ce fait, n'ont pas été traitées.

Le part a été induit aux alentours du 285^{ème} jour de gestation avec 30 mg de dexaméthasone (mères porteuses des veaux 1, 2, 3 et 4) ou avec 30 mg de dexaméthasone et 25 mg de dinoprost (mères porteuses des veaux 5, 6 et 8). L'extraction des veaux clonés par voie naturelle (mères des veaux 2 et 8) ou par césarienne (mères des veaux 1, 3, 4, 5, 6 et 7) a été réalisée 26 à 32 heures après ces injections. La mère porteuse du veau 7 a spontanément commencé son travail au 280^{ème} jour de gestation sans qu'aucune prémédication n'ait été pratiquée. Lors de l'acte de césarienne, les vaches qui avaient développé une hydrallantoïde ont largement été perfusées.

1. Veau 1

Le veau 1 a été extrait de sa mère porteuse par césarienne pratiquée à 278 jours de gestation. Il pesait alors 46,8 kg. La césarienne a été compliquée par l'évacuation d'environ 150 litres de liquides (hydrallantoïde et hydramnios) lors de l'acte chirurgical. La receveuse est décédée au cours de l'intervention.

A la naissance, ce veau était caractérisé par des vaisseaux ombilicaux de grande taille qui, même ligaturés, ont continué à présenter des pulsations jusque 12 heures après la naissance. L'ombilic a été traité à l'aide d'une solution diluée de chlorhexidine toutes les 4 heures pendant 4 jours. Quatre litres d'un colostrum prélevé sur une autre vache lui ont été

immédiatement administrés via une sonde gastrique. Des signes de détresse respiratoire ont commencé à être observés 3 heures après la naissance, et les mesure des valeurs artérielles de quelques paramètres sanguins ont alors révélé un état d'hypoxie ($PO_2 = 20$ mm Hg), d'hypercapnie ($PCO_2 = 59$ mm Hg) et d'acidose ($pH = 7,07$). La réalisation de radiographies thoraciques ont indiqué que les poumons de ce veau étaient légèrement enflammés. Ces données cliniques ont amené les auteurs à placer rapidement le veau sous assistance respiratoire (administration intranasale d'oxygène dès 8 heures de vie, à raison de 10 litres par minute). D'autre part, ce veau a également reçu du bicarbonate par voie intraveineuse (274 MEq de bicarbonate dilués dans 1 litre d'eau stérile). Une thérapie antimicrobienne a, par ailleurs, été instituée dans le but de réduire les risques de septicémie ou de pneumonie. Au jour 3, une analyse par PCR des fèces de ce veau a démontré la présence de la bactérie *Salmonella*. Une échocardiographie réalisée au même moment a mis en évidence une dilatation cardiaque droite ainsi que la présence d'un *ductus arteriosus*. La mort de cet animal est intervenue le 5^{ème} jour.

L'évolution clinique de ce veau évoquait un syndrome de détresse respiratoire associant une probable déficience en surfactant, une hypertension pulmonaire, ainsi qu'une élévation de la pression veineuse systémique. Ceci a été confirmé à l'autopsie : les lobes pulmonaires n'étaient pas affaissés, mais, au contraire, étaient plutôt gros et fermes, sans toutefois présenter de dilatation des vaisseaux lymphatiques inter-lobulaires. A la coupe, le parenchyme pulmonaire était normalement coloré et parfaitement homogène. L'analyse histologique a mis en évidence une pneumonie interstitielle atypique associée à une prolifération massive de pneumocytes de type II et à la dissémination, dans les alvéoles, d'histiocytes et de macrophages.

Le foie était congestionné, présentant une couleur pâle, une surface irrégulière avec une accentuation marquée du nombre de lobules, ainsi qu'un épaississement de la capsule externe. L'histologie a permis de détecter une atrophie centro-lobulaire, l'existence en plusieurs places de collapsus lobulaires, la dégénérescence des vacuoles des hépatocytes, et une prolifération modérée des canaux biliaires.

Concernant le cœur, le ventricule droit était grossièrement dilaté, les portions droite et gauche du septum inter-ventriculaire mesurant respectivement 11 et 13 mm. L'atrium et le ventricule droits dévoilaient une couleur blanche indicative d'une fibrose élastique. La présence d'un *ductus arteriosus* dilaté a également été constatée (diamètre interne de 8 mm). Le diamètre de l'artère pulmonaire était légèrement supérieur à celui de l'aorte (11 mm vs 10 mm pour les diamètres internes).

Ces modifications cardio-vasculaires et hépatiques ont été considérées comme résultant d'une hypertension pulmonaire chronique. Aucune lésion évocatrice d'une éventuelle infection localisée ou d'une septicémie n'a été observée.

2. Veau 6

Le veau 6 a été extrait de sa mère porteuse par césarienne pratiquée à 287 jours de gestation. Il pesait alors 58,6 kg. Là encore, l'existence d'une hydrallantoïde et d'un hydramnios a pu être soulignée. Des attelles ont dû être posées sur cet animal afin de corriger une flexion bilatérale des boulets. De l'oxygène lui a été administré via une sonde intranasale à raison de 10 litres par minute pendant les 24 premières heures de sa vie, permettant, après 15 minutes de ventilation, d'amener sa pression artérielle en oxygène à 309 mm Hg. Dans les premiers jours, ce veau n'a développé aucun syndrome de détresse respiratoire. Au 6^{ème} jour de vie, une pneumonie modérée a pourtant été diagnostiquée sur la base de signes cliniques (hyperthermie, tachypnée) et radiographiques (images de pneumonie restreintes au lobe

pulmonaire crânial droit). L'instauration d'un traitement antibiotique a entraîné une amélioration rapide de la situation.

Le veau 6 est décédé à l'âge de 6 semaines suite à des symptômes de détresse respiratoire. A l'autopsie, le cœur était extrêmement dilaté. Son analyse histologique a révélé l'existence de plages hémorragiques extensives du myocarde. Par contre, aucune lésion de congestion hépatique ou d'inflammation pulmonaire n'a pu être décelée.

3. Suivi clinique des autres veaux clonés

Trois veaux viables (veaux 2, 3 et 4), qui pesaient entre 44 et 56 kg à la naissance, ont été obtenus à partir de trois mères porteuses après 285 à 288 jours de gestation. La placentation des trois vaches était normale. Les mères porteuses des veaux 2 et 3 ont délivré un colostrum de qualité. Par contre, il a été nécessaire de fournir au veau 4 un colostrum de remplacement. Deux heures après la naissance, les veaux 2 et 3 ont été considérés comme tout à fait normaux. Au jour 3, le veau 4 a dû être traité pour une pneumonie bénigne ainsi qu'une laxité modérée des tendons fléchisseurs.

Les trois autres veaux (veaux 5, 7 et 8) sont nés entre 280 et 286 jours de gestation, et pesaient entre 45 et 58,6 kg. Si les veaux 5 et 8 étaient parfaitement normaux et vigoureux, le veau 7 a, par contre, dû subir une oxygénothérapie de 24 heures dans le but de corriger l'installation progressive d'une hypoxie et d'une hypercapnie. Par ailleurs, 30 ml de surfactant pulmonaire bovin lui ont été administrés par sondage de la trachée lors de sa première heure de vie.

4. Caractéristiques pathologiques des vaches receveuses et des fœtus clonés décédés

Trois des 12 vaches receveuses sont mortes avant le terme de leur gestation, et une autre est décédée au moment de l'extraction par césarienne du veau qu'elle portait (veau 1). Les trois vaches mortes avant leur terme étaient grasses et présentaient chacune à l'autopsie une stéatose hépatique importante, indiquant que leur décès pouvait être lié à l'évolution d'une toxémie de gestation. Parmi les facteurs ayant contribué à l'établissement d'un tel dérèglement métabolique, on retiendra que deux de ces trois vaches (la mère porteuse du fœtus 2 et celle des fœtus 3 et 4) étaient atteintes d'hydrallantoïde, qu'une d'entre elles (la mère porteuse des fœtus 3 et 4) supportait une gestation double avec d'importantes hémorragies utérines, et enfin, qu'une autre d'entre elles (la mère porteuse du fœtus 5) se trouvait dans un état d'hyperthermie de cause inconnue.

La mère portant le fœtus 1 a avorté au 246^{ème} jour de gestation. L'autopsie de ce fœtus a, comme dans le cas du veau 1, montré que la surface du foie était irrégulière avec une augmentation significative du nombre de lobules, mais, surtout, elle a mis en évidence un important anasarque.

Le fœtus 2 pesait 54 kg à 248 jours de gestation quand il a été récupéré sur sa mère porteuse décédée. Le diamètre de ses vaisseaux ombilicaux était deux fois plus élevé que celui de vaisseaux normaux. Les enveloppes entourant le fœtus avaient une épaisseur supérieure à 1 cm, et étaient constituées de nombreux placentomes volumineux. A l'autopsie, les lobes pulmonaires de ce fœtus étaient œdémateux et présentaient des vaisseaux lymphatiques dilatés. A la coupe, les lobules pulmonaires étaient bien individualisés, et le parenchyme avait une couleur et une texture « viandeuses ». Le septum ventriculaire droit avait une épaisseur de 22 mm, et le gauche, une épaisseur de 15 mm. De profil, le cœur paraissait avoir un double

apex dû, en fait, à la dilatation de l'ensemble des chambres atriales et ventriculaires. Là aussi, la surface du foie était irrégulière avec un accroissement du nombre de lobules.

Les fœtus 3 et 4 ont été recueillis à 278 jours de gestation. Le fœtus 3 pesait 20,5 kg et le fœtus 4 pesait 12,1 kg. Les placentomes associés à chacun de ces fœtus étaient relativement volumineux. L'autolyse tissulaire avait engendré trop de dommages pour déceler d'éventuelles anomalies lésionnelles. Cependant, un excès de liquide pleural était rapporté pour chaque fœtus (respectivement 500 et 300 ml). Le fœtus 3 avait par ailleurs accumulé 2 litres de liquides intra-péritonéaux.

Le fœtus 5 a été récupéré à 278 jours de gestation sans aucun excès de liquide allantoïdien. Environ 30% des tissus utérins inter-cotylédonaires présentaient un œdème caractérisé par la présence d'un fluide gélatineux et jaune, ainsi que des placentomes de grande taille (4 cm d'épaisseur et 20 cm de diamètre). A l'autopsie, le myocarde du fœtus 5 était hypertrophié et dilaté. La dilatation était particulièrement marquée pour le ventricule droit. Le *ductus venosus* avait une taille deux à trois fois plus grande (15 mm de diamètre) que la taille normale. La surface hépatique était décolorée, irrégulière et plus segmentée qu'à l'accoutumée. La congestion passive chronique du foie du fœtus 5 a été diagnostiquée comme secondaire à l'insuffisance cardiaque.

Discussion

systémique ne se trouvaient pas installées à la naissance de cet animal. Simplement, leurs effets ont certainement été minimisés par l'oxygénothérapie postnatale agressive que les auteurs avaient décidé d'instituer.

La déficience en surfactant, à l'origine de la faible ventilation pulmonaire du veau 1, serait due, soit à une sécrétion restreinte des cellules alvéolaires de type II, soit à une faible concentration du fait de la dilution par des quantités excessives de liquides amniotiques et/ou allantoïdiens. Quelle qu'en soit la cause, cette déficience en surfactant a en tout cas provoqué une atélectasie pulmonaire. Les faibles concentrations résultantes des alvéoles en oxygène auraient alors activé le réflexe de vasoconstriction artérielle, contribuant ainsi à aggraver une éventuelle hypertension pulmonaire préexistante. A l'autopsie, les lésions pulmonaires étendues du veau 1 n'étaient pourtant pas typiques d'une atélectasie secondaire à une déficience en surfactant.

En résumé, même si ce travail de Hill *et al.* (1999) met en évidence un accroissement de la fréquence de certaines altérations fonctionnelles (placentaires et cardio-pulmonaires) chez les clones issus d'un protocole de clonage par transfert de noyaux somatiques mené chez les bovins, il ne permet toujours pas de préciser si ces anomalies sont à relier à la technique de clonage proprement dite, ou plutôt aux conditions de culture *in vitro* des cellules somatiques et/ou des embryons reconstitués.

Etude 5 (56)

Matériels et méthodes

Dans cette étude de Renard *et al.*, des cellules donneuses ont été obtenues à partir d'une biopsie de peau effectuée sur l'oreille d'un veau de 15 jours produit lui-même par clonage embryonnaire. Ces explants cutanés ont alors été cultivés *in vitro* pendant une période variant de 20 à 30 jours (6 à 10 passages). A l'issue d'une étape supplémentaire de congélation-décongélation, celles qui présentaient un caryotype normal (60 chromosomes, 85% des cellules) ont été utilisées comme source de noyaux donneurs dans une procédure de clonage par transfert nucléaire. Parmi les embryons ainsi reconstitués, ceux ayant atteint le stade blastocyste d'apparence normale après une période de culture *in vitro* de 7 jours ont été transplantés dans l'utérus de génisses receveuses. Des examens échographiques ont été systématiquement effectués sur chaque receveuse au 35^{ème} jour suivant le transfert intra-utérin des embryons clonés. L'induction du part de la seule femelle diagnostiquée gestante a été réalisée au 276^{ème} jour de gestation avec de la dexaméthasone. L'extraction du veau de cette receveuse a nécessité de pratiquer une césarienne.

Des échantillons sanguins ont ensuite été prélevés tous les deux jours sur ce veau cloné afin de suivre l'évolution des valeurs de quelques-uns de ses paramètres sanguins.

Résultats

L'unique veau cloné produit par ce protocole expérimental est né le 6 juillet 1998. Il a résulté de la transplantation d'un noyau issu d'un groupe de cellules cultivées *in vitro* pendant 4 semaines (8 passages). Pour cela, 175 embryons ont été reconstitués par transplantation nucléaire, mais seulement six d'entre eux, parvenus au stade blastocyste, ont été transférés dans cinq receveuses. Des échographies réalisées sur chacune des femelles porteuses ont révélé qu'une seule de ces receveuses était gestante au 35^{ème} jour de gestation. La gestation de cette femelle est allée jusqu'à son terme. L'analyse du génotype du veau ainsi obtenu par des

séquences microsatellites d'ADN a confirmé que celui-ci avait bien la même origine que la cellule donneuse employée.

Une échocardiographie pratiquée immédiatement après la naissance de ce veau a mis en évidence une dilatation du ventricule droit de cet animal. Dès lors, le veau a reçu pendant une semaine un traitement associant un inhibiteur de l'enzyme de conversion et des diurétiques, ce qui a eu pour effet d'améliorer rapidement son état clinique. L'échocardiographie n'a permis de détecter aucun autre défaut cardiaque. Durant le premier mois de vie, ce veau n'a déclaré aucun autre problème, se développant parfaitement normalement.

Le suivi de son profil hématologique a montré que les taux sanguins de réticulocytes et d'érythroblastes étaient particulièrement élevés durant les trois premières semaines de vie. Par contre, le taux sanguin de lymphocytes s'est avéré normal durant le premier mois de vie avant de chuter rapidement. Moins de sept semaines après la naissance, une baisse concomitante des taux d'hémoglobine circulante et de réticulocytes a pu être constatée. La mise en place d'une complémentation en fer n'y a rien changé.

Le veau est décédé 51 jours après sa naissance d'une sévère anémie arégénérative (diminution du taux d'hémoglobine circulante sans réponse médullaire). Les résultats de l'autopsie ont mis en évidence une atrophie marquée du thymus, des ganglions lymphatiques et de la rate. L'examen histologique a révélé l'existence d'une aplasie lymphoïde. L'absence de follicules secondaires au sein des ganglions lymphatiques combinée au nombre restreint de follicules primaires semble suggérer que cette aplasie était déjà présente à la naissance de ce veau. L'éventualité d'une infection par le virus de la BVD, connu pour induire une atrophie thymique, a été rapidement exclue après analyse par PCR des cellules donneuses et d'un échantillon de sérum du veau. Le dosage des immunoglobulines G à partir des échantillons sanguins successivement prélevés sur cet animal a confirmé la déficience du système immunitaire qui aurait toutefois été compensée jusqu'à l'âge de six semaines par la protection induite par les anticorps du colostrum.

Discussion

Contrairement à ce qui avait été observé précédemment par Hill *et al.* (32), l'autopsie du veau cloné de cette étude a démontré que son décès n'était lié à aucune anomalie circulatoire. La confrontation des résultats des bilans sanguins et des examens post-mortem indiquait plutôt qu'une anémie arégénérative était à l'origine de la mort de cet animal. Selon les auteurs, cet échec du clonage somatique serait attribuable, soit au choix aléatoire d'une cellule donneuse portant une mutation survenue au cours de la période de culture *in vitro*, soit, plus certainement, à un défaut de reprogrammation des gènes de la cellule donneuse après transfert nucléaire.

Un autre cas d'atrophie thymique avait déjà été relaté chez un clone bovin issu d'une cellule musculaire fœtale : Marguerite, c'est le nom de ce clone, était en effet morte à l'âge de six semaines, peu de temps après avoir été présentée au Salon de l'Agriculture en mars 1998 (11, 39, 65). Suite à une plaie mineure, cette dernière avait développé une septicémie, qu'un traitement antibiotique massif n'avait pu juguler. Son autopsie avait également montré l'existence d'une atrophie du thymus.

Pour les auteurs de cette expérience, la considération globale de ces quelques données concernant la santé défaillante des clones bovins prouve au moins que la technique de clonage somatique pourrait être à l'origine d'effets pathologiques durables. Ceci implique en tout cas que les observations relevées à l'occasion des travaux menés dans l'espèce bovine soient prises en compte dans les débats sur le clonage humain reproductif.

2. Le syndrome du « gros veau »

Selon plusieurs auteurs (46, 68), si Willadsen *et al.* (1991) ont initialement montré que la naissance de veaux anormalement gros était régulièrement associée à la procédure de clonage par transfert de noyaux, depuis, il a été admis que ce problème était plus généralement rencontré après transplantation dans des receveuses d'embryons bovins produits *in vitro* (Behboodi *et al.*, 1995 ; Farin et Farin, 1995 ; Kruip et den Daas, 1997 ; Young *et al.*, 1998).

Néanmoins, les mécanismes pathogéniques de ce phénomène demeurent pour l'instant obscurs. Avant donc de faire le point sur l'état actuel des connaissances relatives à ce syndrome, deux points importants méritent d'être soulignés. Tout d'abord, caractériser ce phénomène seulement en termes de poids de naissance serait inapproprié puisque, ainsi que nous l'avons constaté précédemment, les veaux clonés présentent d'autres anomalies physiques et physiologiques que la seule augmentation de leur poids (24, 25, 32, 56, 72). Il serait donc plus juste de parler d'un syndrome pléiotropique du veau cloné. Deuxièmement, ainsi que nous l'avons également remarqué, tous les veaux clonés ne sont pas systématiquement affectés : la plupart des études réalisées à ce sujet montre même que la majorité d'entre eux apparaissent physiquement normaux (74).

2.1. Bases physiologiques et moléculaires du syndrome du « gros veau »

Une hypothèse plausible consiste à penser que les manipulations subies par l'embryon bovin au cours des premières étapes de la procédure de clonage par transplantation nucléaire, et plus précisément avant la mise en route du génome embryonnaire, influenceraient la transcription d'un ou de plusieurs gènes associés au développement embryonnaire précoce. Toutefois, les facteurs épigénétiques en cause n'ont pas encore été identifiés et nous pouvons, jusqu'à présent, seulement faire des hypothèses à partir des manifestations cliniques (56, 68, 74).

2.1.1. L'empreinte génomique

Les manipulations *in vitro* de l'embryon bovin induiraient des changements phénotypiques chez le veau nouveau-né en modifiant l'empreinte de gènes essentiels au développement embryonnaire et fœtal (69).

Pour Monk (1990), Reik *et al.* (1987), ainsi que Sapienza *et al.* (1987), cités par Walker *et al.* (68), l'une des composantes les plus importantes de l'empreinte génomique est représentée par la méthylation, l'expression des gènes ayant fixé des radicaux méthyle se trouvant grandement facilitée. Or, d'après Walker *et al.* (68), Howlett et Reik (1991) ont montré que, lorsque l'embryon bovin est l'objet de manipulations avant d'être transféré chez une receveuse, des séquences entières de gènes subissent des déméthylations parfois importantes lors des stades précoces de segmentation embryonnaire. Et ceci concerne notamment des gènes impliqués dans le développement fœtal comme, par exemple, le gène codant pour le facteur IGF-2, ou celui codant pour son récepteur (68, 74). Le niveau d'expression de ces gènes se trouve alors modifié, Garry *et al.* (25) ayant notamment démontré que la concentration plasmatique en IGF-2 des fœtus clonés était significativement inférieure à celle de fœtus témoins non clonés. Les conséquences de tels changements sur le développement placentaire ou fœtal paraissent évidentes (46).

Similairement, les noyaux donneurs se trouvant en phase G0 subiraient, au moment même de leur greffe dans des ovocytes receveurs énucléés, une inactivation temporaire d'un ou de plusieurs de leurs gènes portés par le chromosome X. La réactivation de ces gènes interviendrait à des moments variables du développement embryonnaire précoce, de façon

plus ou moins complète (réactivation totale, partielle ou nulle des gènes concernés). De tels défauts de reprogrammation des gènes du noyau transféré conduiraient inévitablement à des anomalies du développement fœtal (68).

2.1.2. Les facteurs cytoplasmiques

Par leurs travaux chez la souris, Babinet *et al.* (1990), Evsikov *et al.* (1990) et Latham et Solter (1991), cités par Walker *et al.* (68), ont signalé que la façon dont certains facteurs cytoplasmiques interagissaient avec le noyau était fondamentale pour le bon déroulement des premières étapes du développement embryonnaire. Selon plusieurs auteurs, cités par Walker *et al.* (68), des déficiences de cette régulation extragénétique pourraient se traduire par des anomalies du développement (Babinet *et al.*, 1990 ; Chen *et al.*, 1992 ; Reik *et al.*, 1993), ainsi que par des inhibitions de la transcription et de la méthylation de certains gènes (Reik *et al.*, 1993). Par exemple, lors d'une procédure de transfert nucléaire menée dans l'espèce bovine, la perte d'une portion substantielle de cytoplasme, soit par fragmentation suite aux segmentations successives de l'embryon reconstitué cultivé *in vitro*, soit lors de l'énucléation des ovocytes receveurs, suffirait à compromettre la reprogrammation du noyau transféré (68).

De même, les conditions de culture *in vitro* des embryons bovins reconstitués par transfert de noyaux se sont avérées influencer la viabilité des développements à terme à travers des mécanismes épigénétiques peu précis (27, 29, 46, 56, 74). Notamment, il semblerait que l'intégrité des organites et des membranes cytoplasmiques des cellules embryonnaires puisse être fragilisée par des variations qualitatives de la composition du milieu de culture, et qu'en conséquence, les interactions noyau-cytoplasme essentielles au développement précoce de l'embryon bovin se trouveraient perturbées (68).

2.2. L'hérédité du syndrome du « gros veau »

Bien que les bovins clonés semblent être des individus fertiles à l'état adulte (55), il n'y a pour l'instant aucune preuve de la transmission héréditaire de cette caractéristique morphologique à leur descendance (68). Pour que ce phénotype du « gros veau » soit transmis aux cellules de la lignée germinale, il faudrait en effet que les manipulations *in vitro* de l'embryon reconstitué par transplantation nucléaire influencent la mise en place de l'empreinte dans les cellules germinales primordiales du fœtus résultant. Ceci est une condition nécessaire mais pas suffisante. En effet, la transmission héréditaire de ce caractère à la descendance des individus clonés ne sera ensuite possible que si toutes les modifications épigénétiques responsables de ce syndrome demeurent inchangées durant la gamétogenèse, mais aussi durant les premières étapes du développement embryonnaire (68).

2.3. Conséquences cliniques et économiques du syndrome du « gros veau »

Le fait que la croissance fœtale des bovins clonés soit plus importante que celle de bovins témoins non clonés a des conséquences cliniques évidentes sur la façon dont se déroule le part, avec comme répercussion principale, une augmentation de l'incidence des dystocies affectant inévitablement la survie des veaux clonés nouveau-nés. Inévitablement, ce phénomène constitue une limite économique certaine aux applications éventuelles du clonage par transplantation de noyaux en élevage bovin allaitant ou laitier (68, 74).

Compte tenu de ces éléments, l'utilisation du clonage par transfert nucléaire des bovins en pratique commerciale courante ne saurait se faire sans la mise en œuvre d'investigations

supplémentaires permettant d'élucider les causes de ce syndrome du « gros veau ». Entre autre, il conviendrait de rechercher et de caractériser les modifications génétiques en cause (46, 74).

B. CARACTERISTIQUES DE CROISSANCE DES VEAUX CLONES

Wilson *et al.* (72) ont comparé le poids de veaux (de races différentes) clonés âgés de 205 jours (période de sevrage) et de 365 jours à celui de veaux du même âge produits par transfert embryonnaire, insémination artificielle (IA) ou monte naturelle (MN) (tableau 40).

Tableau 40 : Comparaison des poids (kg) à 205 et 365 jours de veaux produits par transfert nucléaire, transfert embryonnaire et insémination artificielle ou monte naturelle (72)

Origine des veaux	Sexe	Nombre	Moyenne (kg)	Distribution des poids (kg)
-------------------	------	--------	--------------	-----------------------------

<u>Poids à 205 jours</u>				
Clonage	mâle	141	274,1 ^a	161,0-390,1
Transfert embryonnaire	mâle	1391	270,1 ^{ab}	130,2-413,7
IA/MN	mâle	2124	265,7 ^b	131,1-404,6
Clonage	femelle	78	251,8 ^a	165,1-336,1
Transfert embryonnaire	femelle	1124	248,0 ^{ab}	139,7-342,5
IA/MN	femelle	1771	242,8 ^b	115,7-353,4
<u>Poids à 365 jours</u>				
Clonage	mâle	52	519,0 ^a	392,8-634,6
Transfert embryonnaire	mâle	763	497,4 ^b	295,7-663,6
IA/MN	mâle	1006	497,0 ^b	337,5-664,1
Clonage	femelle	14	429,1 ^a	360,6-488,1
Transfert embryonnaire	femelle	487	356,3 ^b	245,4-513,0
IA/MN	femelle	624	352,9 ^b	269,4-489,0

^{a,b} Les poids moyens des veaux clonés présentant des exposants différents au sein de cette même colonne sont significativement différents ($P < 0,05$).

Il ressort de cette étude que les poids des veaux clonés à 205 et 365 jours sont moins variables que leurs poids de naissance. Les poids moyens à 205 jours des veaux clonés ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$) de ceux des veaux obtenus par transfert embryonnaire. Par contre, ils sont significativement ($P < 0,05$) supérieurs à ceux des veaux produits par insémination artificielle ou monte naturelle.

Les poids moyens à 365 jours des veaux clonés sont significativement plus élevés ($P < 0,05$) que ceux des autres catégories de veaux. La différence est toutefois moins marquée que pour les poids de naissance. Exprimée en pourcentage de la masse corporelle totale, cette différence est effectivement inférieure à 5% à 365 jours, contre 24% à la naissance.

C. CARACTERISTIQUES DES BOVINS CLONES ADULTES

Selon plusieurs auteurs (17, 21, 34, 39, 55, 59), la fertilité des animaux clonés adultes a été démontrée chez le mouton et la souris (Wakayama *et al.*, 1998). A l'état adulte, les bovins clonés sont probablement également fertiles : les clones embryonnaires de l'INRA de Jouy-en-Josas ont déjà reproduit plusieurs fois par insémination artificielle ; ils donnent également

des taux normaux de blastocystes après Ovum Pick-Up et FIV (Heyman, données non publiées).

L'évolution récente de l'élevage bovin a consisté en une intensification des productions. Avec elle, de nouvelles pathologies sont apparues. Ainsi, les vaches laitières ont progressivement présenté une prédisposition accrue aux problèmes de dystocie et de fertilité, ainsi qu'aux maladies de la mamelle et des pieds. Or, il a été montré que l'incidence de telles maladies est également très élevée chez les bovins clonés (23). Les besoins nutritionnels des bovins clonés étant très spécifiques, il convient donc d'apporter un soin particulier à l'établissement de leur ration, afin de limiter au maximum les risques pathologiques inhérents à ces animaux (23).

D. LES CLONES : DES INDIVIDUS IDENTIQUES ?

La technique de clonage par transfert nucléaire permet potentiellement, à partir d'une même source de noyaux donneurs, de produire un grand nombre d'individus qui possèdent tous le même ensemble de gènes nucléaires (12, 28, 47, 48, 49, 57). Le fait de disposer de groupes d'animaux semblables, surtout lorsqu'il s'agit de bovins, présente de multiples intérêts que nous détaillerons ci-après. Seulement, il convient au préalable de nous interroger sur la réalité même du fondement théorique de cette biotechnologie qui énonce que les êtres vivants d'un même clone sont en tous points strictement identiques. Il semblerait en effet que les animaux clonés d'un même lot soient, au contraire, sujets à des variations phénotypiques. Parce que, par définition, la valeur phénotypique d'un individu dépend à la fois de sa valeur génotypique et de l'effet du milieu, nous montrerons que les variations du phénotype des bovins clonés peuvent donc résulter à la fois de variations génétiques et d'influences environnementales.

1. Les variations génétiques

Etant donné que, lors d'une procédure de clonage menée dans l'espèce bovine, tous les noyaux donneurs issus d'une même source (embryon, culture de cellules somatiques) sont génétiquement identiques, la progéniture dérivant du transfert de ces noyaux dans des ovocytes receveurs énucléés devrait strictement avoir la même constitution génétique nucléaire que les noyaux d'origine. Cependant, si antérieurement à la transplantation nucléaire, des modifications génétiques (amplification, translocation, délétion ou mutation de gènes) se produisent au sein des noyaux donneurs, alors ces réarrangements de la molécule d'ADN seront transmis aux embryons reconstitués à partir de ces noyaux, et les individus obtenus à terme seront génétiquement différents de l'individu sur lequel auront été prélevées les cellules donneuses (7, 48, 49).

Un second facteur à considérer est d'origine non nucléaire : il s'agit de l'hérédité cytoplasmique. La participation de cette hérédité cytoplasmique aux variations génétiques des animaux clonés peut s'avérer très importante quand la provenance des ovocytes receveurs n'est pas connue, comme cela est le cas lorsque les ovocytes utilisés sont prélevés sur des animaux d'abattoir (20, 47, 48, 49, 51). La principale source d'hérédité cytoplasmique est représentée par le génome des mitochondries. Or, d'après Prather (48), Olivo *et al.* (1983) ont remarqué qu'au sein d'une même lignée maternelle bovine, le génome des mitochondries était caractérisé par des variations parfois considérables. Les individus créés par transplantation de

noyaux génétiquement identiques dans des ovocytes receveurs à l'hérédité cytoplasmique si différente ne peuvent donc pas être considérés *stricto sensu* comme des clones (7, 48).

D'autres organites cytoplasmiques, dont le centriole, possèdent leur propre génome. Il serait utile de savoir si les différences observées dans le génome de ces organites en fonction de l'origine des ovocytes receveurs pourraient expliquer l'aptitude variable de noyaux donneurs pourtant génétiquement identiques à être correctement reprogrammés (48). Puisqu'il a été montré par Hartl et Neupert (1990), cités par Prather (48), que la synthèse des protéines des mitochondries se faisait sous l'influence directe du génome du noyau, on en déduit que des interactions importantes semblent exister entre le génome du noyau d'une cellule et celui de certains de ses organites cytoplasmiques. La possibilité que l'hérédité cytoplasmique affecte la reprogrammation d'un noyau transféré est donc bien réelle et mérite donc d'être envisagée avec soin (48, 49).

2. Les facteurs environnementaux

Conformément à ce qui vient d'être évoqué, pour employer le terme de clone dans un sens plus rigide, il faut prouver que les contributions cytoplasmiques des ovocytes receveurs sont équivalentes, et qu'aucun réarrangement chromosomique ne s'est produit au sein des noyaux donneurs. Toutefois, même si ces conditions sont rencontrées, il faut encore pouvoir évaluer l'influence de certains facteurs environnementaux sur le développement des individus clonés avant de considérer ces derniers comme des êtres strictement identiques (47, 49).

Dans ce contexte, les jumeaux « vrais » constituent des modèles utiles pour appréhender l'influence du milieu sur les bovins clonés (20, 43, 48) : d'abord, les embryons monozygotes se séparent au début du développement embryonnaire (stades compris entre 1 et 64 cellules), c'est-à-dire aux stades les plus utilisés pour le clonage embryonnaire. Ensuite, on peut supposer que la bipartition expose les embryons de jumeaux à des formes de stress comparables à celles que suscite le clonage. Enfin, dans la mesure où les génomes cytoplasmiques et nucléaires des couples de jumeaux « vrais » sont parfaitement semblables, les éventuelles variations phénotypiques constatées chez ces derniers sont obligatoirement attribuables à des effets épigénétiques de l'environnement. Du coup, la réalisation d'études portant sur des jumeaux monozygotes élevés séparément serait extrêmement précieuse pour tenter d'estimer le degré de variation des bovins clonés lié au milieu après la naissance (20). Des travaux menés par Seidel (1983), et rapportés par Prather (48), ont ainsi permis de démontrer que le fait que les organismes (embryons, fœtus, nouveau-nés, adultes) issus du clonage embryonnaire de blastomères bovins soient placés, à partir du moment du transfert nucléaire, dans des environnements aussi variés que les milieux *in vitro*, utérin, néonatal et post-natal avait fatalement des répercussions sur le phénotype des êtres vivants résultants.

3. Discussion

Les clones de bovins sont très similaires à l'individu sur lequel ont été prélevées les cellules donneuses. Ils ne sont toutefois pas totalement identiques à cet organisme d'origine en raison des inévitables différences liées aux remaniements des chromosomes, en raison aussi du rôle mal connu joué par le cytoplasme de l'ovocyte receveur au moment de la fusion, et en raison, enfin, de l'influence du milieu (48, 51). Ils en sont malgré tout très proches, beaucoup plus proches en tout cas que par la voie normale de la reproduction sexuée, qui introduit la diversité génétique. Le clonage permet notamment d'éliminer l'effet des chromosomes du géniteur de l'autre sexe, ainsi que l'effet des remaniements qui se produisent au moment de la fusion des gamètes (47). Bien que non absolue, l'uniformité génétique des

clones de bovins apparaît donc suffisamment élevée pour autoriser diverses applications pratiques (recherche, sélection) (48).

E. QUEL EST L'ÂGE DES BOVINS CLONES ?

Des travaux de recherche récents (59) ont souligné un problème scientifique qui pourrait remettre en cause les intérêts portés au clonage animal. Ces travaux font état d'une découverte qui porte sur la taille des chromosomes de trois clones de brebis (dont la fameuse Dolly). Leur taille s'est en effet avérée inférieure d'environ 20% à ce qu'elle aurait dû être. Les extrémités des chromosomes, baptisées télomères, s'érodent naturellement à chaque division cellulaire : leur taille peut donc être considérée comme une véritable horloge biologique affichant l'âge de la cellule et celui de l'organisme dont elle est issue (66). Dans le cas de Dolly, les chercheurs ont observé, en 1999, que ses télomères affichaient 9 ans d'âge, soit son âge de naissance (3 ans) augmenté de celui de la brebis donneuse du noyau, âgée de 6 ans au moment du prélèvement de tissu mammaire donneur. Cette pendule particulière qu'est le mécanisme d'érosion des télomères n'avait donc pas été remise à zéro durant le processus de clonage. Outre la difficulté d'attribuer un « âge » aux clones d'adultes (et plus encore aux clones de clones...), les questions soulevées par ce problème, autant philosophiques que scientifiques, sont nombreuses : un clone d'adulte présentera-t-il systématiquement dans ses cellules l'âge de l'individu cloné ? Son espérance de vie s'en trouvera-t-elle réduite ? Son organisme connaîtra-t-il un vieillissement précoce ? Comment la cellule à l'origine du clone aura-t-elle été reprogrammée ? Est-ce que ce phénomène biologique est observé dans d'autres espèces que l'espèce ovine ?

A ce propos, un travail réalisé par Lanza *et al.* (40) dans l'espèce bovine mérite d'être relaté. Dans cette expérience, les auteurs ont réussi à produire six veaux après transplantation de noyaux de fibroblastes fœtaux transgéniques dans des ovocytes receveurs énucléés et transfert d'une partie des blastocystes ainsi reconstitués ($n = 79$) chez des receveuses. Les fibroblastes utilisés ici comme donneurs de noyaux ont été cultivés *in vitro* pendant une période supérieure à 95% de leur durée de vie totale, et leur morphologie était compatible avec celle de cellules sénescents. De plus, leur capacité à entrer en phase S du cycle cellulaire était également très réduite. Malgré ces caractéristiques initiales, après analyse, la longueur des télomères de cellules sanguines nucléées prélevées sur les animaux clonés s'est révélée supérieure à la longueur des télomères de cellules identiques prélevées sur des veaux (âgés de 2 semaines à 10 mois) et des vaches (âgées de 6 mois à 19 ans) témoins. En outre, la longueur des télomères des fibroblastes fœtaux sénescents utilisés pour le transfert nucléaire a été démontrée comme étant nettement inférieure à celle de fibroblastes recueillis sur des fœtus clonés produits à partir de ces cellules.

Ces résultats montrent, d'une part, que des développements à terme peuvent être obtenus après clonage de cellules somatiques bovines sénescents, et d'autre part, que la reprogrammation lors de transfert de noyaux permet d'étendre la longueur des télomères des bovins clonés au-delà de la longueur des télomères de veaux nouveau-nés non clonés. Par ailleurs, Lanza *et al.* ont souligné que les élongations des télomères des cellules des bovins clonés étaient concomitantes d'un allongement de la durée de vie multiplicative de ces cellules. D'après les auteurs, ces données suggèrent que les embryons bovins reconstitués par transplantation nucléaire disposent d'un mécanisme autorisant la régénération des télomères au cours des événements du développement pré- et post-implantatoire. Les contradictions entre les conclusions de cette étude et celle de Shiels *et al.* (59) à propos de Dolly pourraient être dues à des différences entre espèces, et/ou à des différences dans la technique de

transplantation de noyaux, et/ou à des différences dépendantes du type cellulaire des noyaux donneurs.

En tout cas, cette aptitude du transfert nucléaire à amener les cellules somatiques bovines à un statut de jeunesse phénotypique a des implications importantes. Notamment, s'il était possible de reproduire ce phénomène dans d'autres espèces que les bovins, il serait envisageable d'étendre la durée de vie d'une grande variété de types cellulaires différenciés (cellules hépatiques, pancréatiques ou musculaires) en état de sénescence. Ceci pourrait conduire à augmenter la disponibilité en cellules de remplacement générées pour les constructions tissulaires et les thérapies de transplantation (26, 40, 66).

➤ **POINTS FORTS A RETENIR :**

- Chez les bovins, le clonage par transfert de noyaux de cellules embryonnaires ou somatiques se traduit généralement par des taux élevés de morbidité et de mortalité post-natales précoces. Le clonage à partir de noyaux embryonnaires bovins aboutit en effet, dans 3 à 5% des cas, à la naissance de veaux de santé fragile qui présentent, par conséquent, un risque de mortalité post-natale accru. Lors de clonage somatique, ces taux sont bien supérieurs encore, puisque 30 à 40% des veaux obtenus décèdent dans les jours qui suivent leur naissance.
- Les observations actuellement disponibles chez les bovins décrivent un syndrome caractérisé par un poids élevé des veaux clonés à la naissance (syndrome dit du « gros veau »), une croissance fœtale asynchrone associée à des déformations du squelette, des difficultés respiratoires, des anomalies cardiaques et artérielles, des problèmes rénaux, une régulation thermique anormale, un état d'hypoxie, une hyperlaxité des tendons et un réflexe de succion déficient.
- Le plus souvent, c'est apparemment une seule fonction de l'organisme qui est affectée, qu'il s'agisse de la fonction respiratoire, circulatoire ou immunitaire. Parfois, une déviation du sex-ratio en faveur des mâles est même observée.
- On ne connaît pas exactement les causes de ce syndrome pléiotropique, mais elles sont peut-être davantage liées aux conditions de culture *in vitro* de l'embryon reconstitué par transplantation de noyaux plutôt qu'à la technique de transfert nucléaire proprement dite, dans la mesure où ce phénomène est également observé pour des veaux issus de fécondation *in vitro*. Ce syndrome pourrait aussi résulter de certaines perturbations de la régulation énergétique fœto-placentaire au cours de la gestation, qui handicaperaient la mise en place des régulations insulino-dépendantes au moment de la mise-bas. Ces dérèglements seraient peut-être liés aux modifications de l'environnement des embryons clonés durant les premières étapes de la procédure de clonage par transplantation nucléaire et/ou durant la période de culture *in vitro*.
- En plus des problèmes de santé rencontrés par les veaux clonés à la naissance, la technique de clonage pourrait être à l'origine d'effets pathologiques durables : ceci implique que les observations relevées à l'occasion des travaux menés dans l'espèce bovine soient prises en compte dans les débats sur le clonage humain reproductif.
- Il semblerait que les poids moyens des bovins clonés à 365 jours soient significativement plus élevés que ceux des individus du même âge obtenus par transfert embryonnaire, insémination artificielle ou monte naturelle. La différence est toutefois moins marquée que pour les poids de naissance.
- A l'état adulte, les bovins clonés sont des individus probablement fertiles. Toutefois, il n'y a pour l'instant aucune preuve de la transmission héréditaire des caractéristiques morphologiques précédemment évoquées à leur descendance.
- Les clones de bovins sont très similaires à l'individu sur lequel ont été prélevées les cellules donneuses. Ils ne sont pourtant pas totalement identiques à cet organisme d'origine en raison des inévitables différences liées aux remaniements des chromosomes,

en raison aussi du rôle mal connu joué par le cytoplasme de l'ovocyte receveur au moment de la fusion, et en raison, enfin, de l'influence du milieu. Ils en sont malgré tout très proches, beaucoup plus proches en tout cas que par la voie normale de la reproduction sexuée, qui introduit la diversité génétique. Bien que non absolue, l'uniformité génétique des clones de bovins apparaît donc suffisamment élevée pour autoriser diverses applications pratiques (recherche, sélection).

- Lors de clonage somatique, la reprogrammation du noyau transféré est telle qu'elle permet d'étendre la longueur des télomères des bovins clonés au-delà de la longueur des télomères de veaux nouveau-nés non clonés. Ces élongations des télomères des cellules des bovins clonés sont concomitantes d'un allongement de la durée de vie multiplicative de ces cellules.
- Cette aptitude du transfert nucléaire à amener les cellules somatiques bovines à un statut de jeunesse phénotypique a des implications importantes. Notamment, s'il était possible de reproduire ce phénomène dans d'autres espèces que les bovins, il serait envisageable d'étendre la durée de vie d'une grande variété de types cellulaires différenciés (cellules hépatiques, pancréatiques ou musculaires) en état de sénescence. Ceci pourrait conduire à augmenter la disponibilité en cellules de remplacement générées pour les constructions tissulaires et les thérapies de transplantation.

V. INTERETS DU CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE DES BOVINS

A. INTERETS DU TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS POUR LA RECHERCHE FONDAMENTALE

La procédure de clonage par transfert de noyaux constitue un outil expérimental de choix pour extraire un grand nombre d'informations concernant le développement de l'embryon de mammifères et sa différenciation (8, 11, 18, 49, 51, 55). Dans cette optique, des protocoles de clonage de la souris ont par exemple été établis en vue de recherches à caractère fondamental sur les relations qui s'établissent entre le noyau et le cytoplasme (53, 61). Seulement, même si les premières étapes du développement embryonnaire sont bien connues dans cette espèce, la souris représente un modèle bien différent des mammifères domestiques, ne serait-ce que par la mise en route plus précoce de son génome embryonnaire (53).

Le modèle bovin a donc été rapidement préféré à celui de la souris (11). Exception faite de quelques résultats spectaculaires, l'efficacité du clonage des bovins demeure pourtant faible. Malgré tout, dans cette espèce, les perturbations induites par la transplantation de noyaux embryonnaires ou somatiques dans des ovocytes receveurs énucléés commencent à être utilisées pour mieux comprendre le rôle de l'environnement précoce du noyau dans l'apparition de syndromes affectant tardivement le développement du jeune (55). Il est vrai que, d'un point de vue technique, la vache présente quelques avantages (durée de gestation plus élevée, taille compatible avec des examens et des prélèvements périodiques) par rapport à la souris, autorisant une exploration clinique précise de certains mécanismes biologiques du développement embryonnaire et fœtal (55). Et puisqu'il a été supposé que tous les mammifères euthériens partageaient la même forme de régulation génétique du développement, les expériences de clonage par transplantation nucléaire des bovins seraient à même d'apporter au moins autant d'enseignements généraux que les travaux effectués chez la souris (20).

En travaillant sur le modèle bovin, on devrait ainsi parvenir à mieux comprendre les échecs de développement observés après clonage, en précisant notamment s'ils sont dus à une reprogrammation défectueuse du noyau après son introduction dans le cytoplasme receveur, ou aux conditions de culture des ovocytes et éventuellement des cellules donneuses avant leur utilisation, voire encore aux conditions de culture des embryons reconstitués avant leur transfert chez des receveuses (55, 56). Sans compter que ces études réalisées dans l'espèce bovine devraient également permettre de mieux appréhender la physiologie de l'embryon humain, et par conséquent, les débats sur le clonage humain reproductif et non reproductif y gagneraient certainement en clarté (55).

B. INTERETS DES CLONES BOVINS EN EXPERIMENTATION ANIMALE

On utilise, depuis longtemps déjà, les vrais jumeaux pour l'expérimentation, qu'ils soient obtenus naturellement ou par bissection (27, 31). Aujourd'hui, le clonage offre des

perspectives nouvelles : le fait de pouvoir disposer de clones de quatre, cinq ou six veaux permet des approches expérimentales jusqu'alors irréalisables (6, 27, 57).

1. Diminution du nombre d'animaux nécessaires (16)

Certains thèmes de recherche amènent obligatoirement à travailler sur un petit nombre d'animaux parce que le coût des mesures impliquées dans le protocole (ajouté au coût d'entretien) est élevé. Que peut donc apporter le clonage dans ces conditions ?

Un traitement correspond à une modalité expérimentale (niveau d'alimentation, âge, ...) dont on souhaite mesurer l'effet sur la moyenne et/ou la variabilité de caractéristiques ou de performances données d'un groupe d'animaux. L'efficacité statistique de l'utilisation d'animaux clonés se mesure alors par le nombre équivalent d'animaux non clonés qui seraient nécessaires pour obtenir la même « puissance » de détection d'un effet lié au traitement. La « puissance » est une notion statistique qui correspond à la probabilité de déclarer significatif un effet quand celui-ci existe bien. Un exemple est présenté dans le tableau 41. Pour un caractère d'héritabilité élevé ($h^2 = 0,5$) pour lequel la variabilité (variance) intra-traitements serait élevée et de même ordre de grandeur que la variabilité inter-traitements, l'utilisation de 10 clones répliqués à 3 exemplaires (30 animaux) serait aussi efficace que celle de 53 ($30 \times 1,78$) animaux normaux (génétiquement indépendants). Dans un tel cas, le clonage est capable de contribuer à l'efficacité d'un dispositif expérimental si son coût spécifique ne représente pas plus de 78% du coût expérimental d'un animal normal. Si le même raisonnement est appliqué à des critères d'héritabilité faible ($h^2 = 0,1$), il apparaît alors que l'utilisation de clones est surtout intéressante pour les caractères très hératables.

Tableau 41 : Efficacité statistique d'un animal cloné par rapport à un animal classique pour la détection d'un effet traitement expérimental (16)

Nombre total d'animaux en expérimentation	Nombre de clones	Nombre de répliques par clone	$h^2 = 0,1$	$h^2 = 0,5$
30	10	3	1,04	1,78
	5	6	1,08	1,85
	1	30	1,10	1,89
60	20	3	1,08	1,90
	10	6	1,09	1,93
	2	30	1,10	1,94

h^2 = variance génétique/variance intra-traitement. Dans cet exemple, on a fait l'hypothèse que la variance intra-traitement était égale à la variance entre traitements.

2. Utilisation des clones bovins pour l'expérimentation

2.1. Utilisation des clones bovins en immunopathologie (27)

Plusieurs séries de clones de veaux nés à l'INRA ont déjà été utilisées pour des recherches, notamment en pathologie. Par exemple, en immunopathologie parasitaire, l'effet antigénique de molécules isolées de *Fasciola* a été particulièrement étudié : pour cela, l'évolution de la population lymphocytaire a été suivie dans le sang de bovins expérimentaux infectés par rapport à des bovins témoins. Or, si les animaux expérimentaux ne sont pas identiques génétiquement, leur population de lymphocytes est initialement très hétérogène et il devient pratiquement impossible de détecter une éventuelle modification du rapport CD4/CD8 entre animaux témoins et traités. En utilisant des animaux clones, on dispose d'un modèle homogène beaucoup plus sensible pour mesurer un effet.

2.2. Etude de l'influence des facteurs d'environnement

Selon Biggers (1986), cité par Prather (48), si les animaux clonés ne sont pas strictement identiques phénotypiquement, ils présentent toutefois des caractéristiques de croissance et des comportements plus similaires que des animaux non clonés choisis au hasard. De ce fait, des bovins clonés de même génotype, placés dans des élevages différents, constitueraient d'excellents modèles pour étudier l'influence des facteurs d'environnement sur les performances (28, 49).

2.3. Etude du comportement alimentaire (27)

Un autre exemple d'utilisation des clones concerne l'étude du comportement alimentaire et mérycique des bovins, caractère soumis à une grande variabilité entre animaux. Ainsi, une étude de Baumont *et al.* (1995, cités par 27), réalisée sur un clone de cinq veaux mâles de race Holstein, a montré que les coefficients de variation entre animaux pour des paramètres tels que la quantité ingérée, la durée journalière de rumination, ou la vitesse d'ingestion, sont réduits de 40 à 60% chez les clones par rapport à des animaux expérimentaux non clones. Ces taurillons clones ont ensuite été abattus, et les mesures effectuées sur les différents compartiments de l'appareil digestif ont confirmé une très grande similitude entre les animaux, contrairement à des taurillons non clones contemporains.

2.4. Autres applications

Grâce aux clones bovins produits par transplantation nucléaire, l'analyse des interactions entre le génotype et des traitements variés s'avère possible (57). Des recherches en pathologie et en reproduction deviennent également plus facilement accessibles (29, 41, 47, 49).

C. INTERETS DU CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE DANS LA GESTION DES RESSOURCES GENETIQUES BOVINES

1. Créer un fonds génétique dans l'espèce bovine

Des banques d'embryons de races menacées se constituent actuellement, en France comme ailleurs (37). Dans ce contexte, la collaboration de plusieurs laboratoires de l'INRA a par exemple conduit à la création d'une embryothèque des différentes races de lapins afin de rassembler un « fonds génétique » pour cette espèce (30). L'objectif avoué est d'étendre cette organisation à d'autres espèces que le lapin, et plus spécialement aux bovins : pour y parvenir, le clonage serait fort utile (30, 37).

2. Aider à la réalisation de programmes de croisement originaux

Renard et Heyman (53) rapportent les travaux de chercheurs vietnamiens (Uoc *et al.*, 1992) dont l'objectif était d'augmenter la qualité génétique du buffle des marais (*Bubalo bubalis*). Cet animal est utilisé non seulement comme source de protéines pour l'alimentation, mais aussi comme force de travail dans les rizières, et également comme moyen de transport dans les régions des hauts plateaux. Une des voies retenue pour l'amélioration génétique a été la mise en place d'un programme de croisement avec des buffles des rivières importés d'Inde. Peu de jeunes ont pu ainsi être obtenus. Ceci a amené Uoc *et al.* (1992) à définir une méthode originale combinant le transfert d'embryons et le clonage afin de lever un des obstacles à la faible efficacité reproductrice observée dans les conditions naturelles et sur laquelle butaient plusieurs équipes dans différents pays. Leurs résultats ont permis d'envisager des applications dans les élevages de sélection de buffles et ont suscité un début de coopération avec des partenaires de pays voisins (Thaïlande, Malaisie).

3. Gestion des races de petits effectifs

Les biotechnologies représentent des auxiliaires précieux pour le maintien des populations animales de faibles effectifs. Certaines techniques appropriées comme la cryoconservation des gamètes et des embryons sont déjà utilisées. On envisage que le clonage pourra peut-être s'intégrer dans les stratégies qui se sont mises en place depuis la Convention signée par 157 pays, en 1992, lors du sommet de la Terre pour la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique (52). La technique de clonage par transfert de noyaux permettrait notamment d'envisager des schémas de sélection différents dans les races bovines de petits effectifs pour lesquelles les schémas « classiques » sont inapplicables (15, 27, 47, 50, 53). Par exemple, en ce qui concerne les petites populations qui suivent un programme de sauvegarde, on peut penser qu'au point de vue de la technique, le clonage somatique de chaque membre de la population en vue de son inévitable remplacement est la solution idéale sans perte aléatoire de gènes (à l'occasion des méioses), et tout en évitant la « mort sociale » de la population que représente sa seule conservation sous forme de gamètes ou d'embryons congelés. Cependant, cette solution risque fort d'être financièrement insupportable, soit pour les collectivités nationales, soit pour les petites collectivités d'éleveurs directement concernées (16).

D. LES CLONES BOVINS ET L'ELEVAGE

Avant de se pencher sur l'avenir du clonage des bovins dans le contexte de l'élevage traditionnel, il faut garder à l'esprit que la sélection a en fait une double mission, la seconde ayant été quelque peu oubliée (38) :

- en premier lieu, elle doit générer un progrès génétique répondant à une demande conjoncturelle, ce qu'elle a réalisé depuis trente ans environ avec une belle efficacité,
- et dans le même temps, elle doit permettre de conserver une diversité génétique entre races et intra-race suffisante pour être en mesure de faire face à la demande du lendemain.

Le clonage doit être considéré comme un outil supplémentaire très utile dans l'arsenal des biotechnologies de la reproduction autorisant la multiplication des embryons à forte valeur ajoutée (27). Toutefois pour être complètes et réalistes, les perspectives d'application du clonage par transplantation nucléaire dans les programmes de sélection des bovins doivent être raisonnées en tenant compte de multiples aspects (15) :

- la génétique des populations représente une certaine force de freinage quand on veut progresser dans une direction génétique donnée,
- la rentabilité économique à long terme des opérations envisagées, tant au niveau de l'éleveur que du groupe d'éleveurs, doit être impérativement recherchée si l'on souhaite que cette biotechnologie s'implante solidement dans l'élevage,
- le contexte international de concurrence accrue où un excès de prudence dans les évolutions peut justement conduire à ce que l'on voulait précisément éviter, à savoir un préjudice économique.

L'élaboration de réponses adéquates exige de quantifier tous ces aspects, ce qui conduit à appréhender les raisonnements de la génétique quantitative que nous relatons ci-après.

1. Les stratégies de sélection actuelles dans l'élevage bovin

1.1. Déterminisme génétique des caractères (15)

Les stratégies de sélection actuelles de l'élevage bovin reposent sur l'hypothèse d'un déterminisme polygénique additif. Une multitude de gènes, ayant chacun un effet limité (polygénisme), et agissant indépendamment les uns des autres (additivité), est supposée justifier les variations héréditaires observées. Ceci n'est pas catégoriquement infirmé par les résultats obtenus lors de sélections effectives, mais il ne faut absolument pas exclure l'existence de quelques gènes ayant un effet dit majeur, qu'il convient de rechercher par les techniques de la génétique moléculaire et de la statistique.

L'existence d'un déterminisme polygénique a plusieurs conséquences fondamentales. La première, favorable, réside dans le fait que les limites de la sélection sont très éloignées (peu de risque d'atteindre un « plateau » de sélection). Les autres conséquences sont globalement défavorables : progrès génétiques initiaux moins importants qu'en situation oligogénique, impossibilité de connaître le génotype exact d'un bovin (remplacé par de sa valeur génétique additive, qui résume l'effet moyen de ses gènes, estimable au travers des performances de cet animal et de ses apparentés sujets aux effets de milieu), et très forte dispersion, due aux hasards de la méiose, des valeurs génétiques additives des animaux résultant d'un même accouplement (la théorie permet de prédire que la variabilité génétique entre pleins frères ou

sœurs est encore la moitié de la variabilité totale de la population). Ces deux derniers points sont fondamentaux pour bien comprendre l'optimisation de l'insertion des nouvelles techniques de reproduction en sélection. Dans ce domaine, on raisonne non sur des individus mais sur des groupes, car c'est à ce niveau que les prévisions sont valables.

1.2. Les facteurs du progrès génétique (15)

Le succès d'une sélection se mesure globalement par la vitesse d'évolution des valeurs génétiques additives dans la population (progrès génétique annuel). Cette mesure globale résulte de la synthèse de nombreuses composantes. Ainsi, quatre facteurs fondamentaux influent sur le progrès génétique : l'intervalle de génération, la pression de sélection, la précision de la sélection, et la variabilité génétique disponible. A cela, il faut ajouter les modalités de transmission des gènes d'une génération à l'autre, qui ont des paramètres statistiques propres, et dont il faut évaluer l'impact simultané. On distingue les « voies » père-fils (choix des pères des nouveaux taureaux), père-fille (choix des taureaux d'insémination), mère-fils (choix des mères des nouveaux taureaux), mère-fille (choix des mères des génisses de remplacement).

La théorie permet d'établir que, dans des conditions simplifiées, le progrès génétique annuel s'exprime tout simplement par le rapport D/L où D est la différentielle de sélection moyenne sur les quatre voies précédemment mentionnées, et où L est l'intervalle de génération moyen sur ces quatre voies. Rappelons que la différentielle de sélection correspond à l'écart de valeur génétique entre les reproducteurs retenus et la série dont ils sont issus, et que l'intervalle de génération est l'âge du reproducteur à la naissance de ses descendants. Pour être complet, il faut tenir compte de l'écart entre populations d'élite (les noyaux de sélection) et populations commerciales : il n'est pas obligatoirement lié au progrès génétique annuel (création du progrès génétique), et il conviendrait de le réduire grâce aux biotechnologies (diffusion du progrès génétique).

2. Perspectives d'application du clonage par transfert nucléaire dans l'élevage bovin

Le clonage par transplantation de noyaux est avant tout destiné aux animaux de très haute valeur génétique (29). Il faut toutefois signaler que les perspectives d'utilisation du clonage en matière de sélection bovine ne sont que potentielles dans le sens où elles exigent que les techniques de base soient au préalable suffisamment maîtrisées. Il faut pour cela garantir l'efficacité des techniques pour éviter les aléas trop importants lors de leur mise en œuvre à grande échelle. Dans ce but, l'obtention d'une naissance pour seulement quatre à cinq embryons reconstitués est apparue à la fois comme un seuil à atteindre et un objectif qui ne paraît plus aujourd'hui irréaliste (16). Cette précision étant apportée, nous avons tenté de dresser le bilan des bénéfices et risques liés aux applications possibles du clonage dans l'élevage bovin.

2.1. Amélioration de la connaissance de la valeur génétique des reproducteurs

En sélection, la réplique même limitée d'animaux de phénotype exceptionnel (cinq à dix copies par animal) permettrait d'évaluer avec une précision bien meilleure que les méthodes traditionnelles, et à un moindre coût, les aptitudes génétiques des reproducteurs (11, 15, 16, 28, 37, 41, 53). En outre, elle autoriserait de retenir comme critères de sélection la résistance à des maladies ou l'adaptation à des modes d'élevage plus extensifs, critères peu pris en compte jusqu'alors, car à héritabilité faible (41, 50, 53).

2.1.1. Exemple en production laitière (15, 16)

Dans le cas des bovins laitiers, on peut considérer que le clonage des embryons mâles est, non seulement d'un intérêt mineur par rapport au clonage des embryons femelles, mais en plus, il présente beaucoup de risques de perte de variabilité génétique, les mâles d'insémi

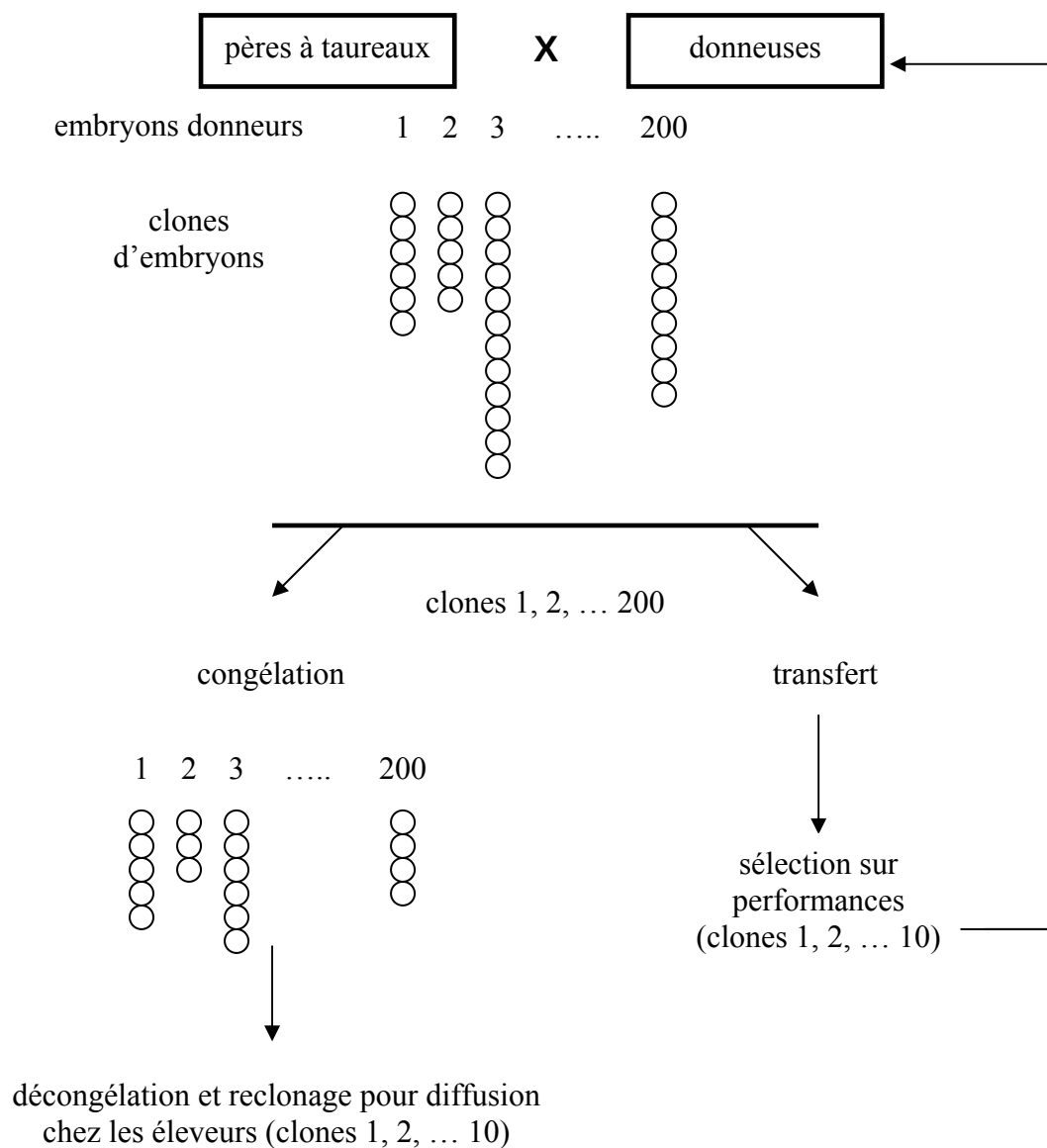


Figure 11 : Utilisation collective des clones femelles chez les bovins laitiers (15, 16)

Tableau 42 : Précision de l'indexation des clones femelles pour la production laitière (15)

--	--	--

Taille du clone femelle	Précision (R^2)	Nombre de filles d'un taureau pour la même précision*
2	0,40	10
5	0,63	25
10	0,77	50

* Mode de lecture : un clone de cinq vaches est connu avec la même précision qu'un taureau avec 25 filles non clonées (on n'a aucun intérêt à cloner la descendance pour évaluer le père).

Tableau 43 : Impact du clonage sur le progrès génétique annuel chez les bovins laitiers par rapport à un schéma utilisant le transfert d'embryons (TE) produits par des femelles de 2 ans (16)

Origine des noyaux donneurs	Age des femelles donneuses	Nombre de veaux par clone ⁽¹⁾	Progrès génétique annuel par rapport à un schéma avec TE
Embryons	4 ans	3	+ 5%
		5	+ 10%
Fibroblastes fœtaux	4 ans	3	- 3%
		5	+ 10%
Fibroblastes de veau (âgé de 9 mois)	3 ans	3	+ 21%
		5	+ 27%

⁽¹⁾ Chaque génotype utilisé est supposé donner un clone de taille constante

2.1.2. Exemple en production de viande (16)

La prise en compte dans les objectifs de sélection des bovins à viande des critères de rendement et de qualité de la carcasse, ainsi que des critères de qualité de la viande, conduit normalement aujourd'hui à tester les reproducteurs mâles sur leur descendance. Le recours au clonage permet alors d'envisager d'abattre et d'effectuer directement des mesures sur les carcasses des clones du reproducteur, et non plus sur celles de ses descendants. Au total, on utilisera moins d'animaux, mais leur coût individuel de production sera élevé. Si on souhaite maintenir le même coût total pour l'ensemble du schéma, il conviendra alors d'employer moins de clones que de descendants du reproducteur. Mais la précision des index de sélection ne pourra être augmentée que si le coût du clonage n'est pas trop élevé, car il y aurait trop peu de clones. On peut montrer, que pour un caractère dont le coefficient d'héritabilité est égal à 0,4, la précision des index de sélection est améliorée tant que le surcoût individuel lié au clonage n'est pas supérieur à 500%. Ceci a beaucoup de chance d'être vérifié si le coût de base (coût total d'un animal normal jusqu'à son abattage) est élevé, notamment à cause d'une durée d'engraissement importante.

2.2. Diffusion de géotypes d'élite bien connus (15, 16)

Deux situations peuvent être envisagées :

- le géotype est exprimé par un seul individu dont les performances sont connues. L'objectif est de diffuser des gènes intéressants pour des caractères d'expression tardive comme ceux impliqués dans la résistance à des maladies ou dans la longévité. Le clonage envisagé est alors le clonage somatique à partir de noyaux de cellules prélevées sur l'animal adulte une fois connues ses performances.
- le géotype est exprimé par plusieurs individus. L'objectif est d'utiliser les clones issus d'accouplements entre animaux d'élite non pour le programme de sélection, mais pour la diffusion chez les éleveurs. Dans le cadre du programme de sélection, il n'est pas nécessaire de recourir au clonage somatique, et le clonage d'embryons peut suffire, mais la sélection des clones pour la diffusion doit être à la fois sévère et précise. Une fois les clones d'élite produits et leurs performances connues, une diffusion ultérieure pourra être réalisée par clonage somatique, mais on peut aussi envisager le recours au clonage embryonnaire à partir d'embryons clonés préalablement congelés (clonage de deuxième génération) dans l'attente des résultats de l'évaluation génétique.

Le niveau d'efficacité économique de la transplantation embryonnaire, en tant que technique, est alors nettement amélioré (De Boer et Arendonk (1994), cités par 15, 16). Le tableau 44 présente le résultat de simulations concernant le transfert à la ferme de tels embryons recloneés. Le remplacement d'embryons ordinaires (issus du 1% le meilleur des vaches simples) par des embryons recloneés (correspondant aux 10% les meilleurs des clones issus d'accouplements entre animaux d'élite comme dans la figure 11), entraîne un meilleur niveau génétique des génisses nées de transfert. La simulation génétique montre alors une augmentation très sensible (+ 64%) des recettes liées à la transplantation embryonnaire. Dans l'hypothèse où le prix de revient de l'embryon cloné serait le même que celui de l'embryon produit *in vivo*, le bilan financier au bout de 10 ans d'une activité continue de transfert à la ferme (une génisse née de transfert chaque année) serait négatif (- 14%), mais toutefois bien moins que celui résultant de l'utilisation de la transplantation embryonnaire classique (- 50%). Une réduction des prix de revient de la transplantation grâce au clonage aurait un impact important puisque une baisse de 50% des coûts permettrait d'obtenir un bilan financier largement positif (+ 74%).

Tableau 44 : Impact économique de l'utilisation dans un troupeau de clones bovins testés et sélectionnés (15, 16)

Année	Recettes cumulées (kF)		Coûts cumulés (kF)	
	TE classique	TE avec clones	TE classique	50% TE classique
0	0	0	4	2
2	0	0	12	6
4	1,7	2,9	20	10
6	6,0	10,5	28	14
8	12,4	22,2	36	18
10	22,1	38,2	44	22

Hypothèse : chaque année, une génisse est produite par transplantation embryonnaire (TE).

Exemple : bilan financier à l'année 10 $\rightarrow 100 \times ((\text{recettes} - \text{coût})/\text{coût})$

TE classique $\rightarrow 100 \times ((22,1 - 44)/44) = - 50\%$

Si coût du clone de l'embryon = coût TE classique $\rightarrow 100 \times ((38,2 - 44)/44) = - 14\%$

Si coût du clone de l'embryon = 50% coût de l'embryon obtenu par TE classique $\rightarrow 100 \times ((38,2 - 22)/22) = + 74\%$

2.3. Diffusion commerciale potentielle de clones bovins « terminaux »

Pour la production à partir de races allaitantes, les embryons issus de géniteurs ayant une excellente conformation peuvent être démultipliés puis transférés à des receveuses pour engendrer des lots d'animaux à carcasses homogènes, de haute qualité standard (28). Cette approche n'est toutefois valable que pour des caractères très héréditaires : du fait de la méiose, les embryons issus de deux bons individus ne sont pas forcément bons. Plusieurs sociétés s'étaient montées aux USA et au Canada dans les années 90 pour faire du clonage embryonnaire commercial : elles ont toutes fait faillite (16, 28, 29, 30, 41, 51, 52, 53). Par contre, on pourrait envisager de multiplier à plusieurs exemplaires un individu exceptionnel par clonage somatique (16).

Les animaux sont ici engagés dans des systèmes de production de viande exigeant une qualité uniforme et une régularité d'approvisionnement de marchés très ciblés (système à la base des labels de production). Le testage puis la sélection de clones dans une lignée terminale à seule fin de diffusion (et non de sélection intra-lignée) permettrait de satisfaire à ces exigences, en diminuant la variabilité de qualité du produit offert au consommateur (cette variabilité n'étant toutefois pas supprimée à cause de l'influence des facteurs de variation non génétiques toujours présents). Les coûts induits par ce mode de production devront alors être confrontés aux prix que les consommateurs seraient prêts à payer, une fois constatées la supériorité et la régularité de la qualité (16).

2.4. Synergie entre le clonage et les biotechnologies de la connaissance du génome (15, 16, 42)

Actuellement, la recherche mondiale en génétique est très active dans deux domaines : d'une part, la constitution de cartes génétiques balisant le génome grâce à des régions à polymorphisme élevé (marqueurs moléculaires de type microsatellite), et d'autre part, la détection de gènes majeurs à effets individuels importants dits QTL (quantitative trait loci). Cette détection est obtenue en étudiant les relations entre les performances et les génotypes pour des marqueurs voisins de ces QTL. On peut donc espérer disposer à long terme de méthodes de sélection assistées par marqueurs (Colleau et Boichard (1997), cités par 15, 16), pour lesquelles les biotechnologies du génome et de la reproduction bénéficieront mutuellement l'une de l'autre. La connaissance des génotypes marqueurs (et des performances des ascendants ou apparentés qui ont transmis ces marqueurs) permet d'affiner le choix des reproducteurs mâles et femelles d'élite impliqués dans les opérations de reproduction intensive (transfert embryonnaire et accouplements raisonnés). Les produits issus de ces reproducteurs peuvent être triés plus efficacement en intégrant la connaissance de leur génome marqueur. Inversement, les techniques de reproduction permettent de diffuser efficacement les génotypes favorables. A l'extrême, le clonage permettrait de multiplier un génotype (connu via le marquage moléculaire) correspondant à une association très rare de gènes favorables à plusieurs loci et/ou pour plusieurs caractères.

E. CLONAGE ET TRANSGENESE

1. La transgénèse : généralités (4)

La transgénèse est le transfert de gènes d'une espèce d'êtres vivants vers une autre. Les espèces sont séparées entre elles par des barrières de fécondité. Un individu d'une espèce n'est, dans l'immense majorité des cas, pas capable de féconder (ou d'être fécondé par) un individu de sexe opposé d'une autre espèce et de donner naissance à une progéniture fertile. La transgénèse peut aussi être définie comme l'expression dans une cellule d'un gène qui lui est étranger.

Les avantages de la transgénèse sont déjà évidents aujourd'hui. Ils consistent notamment en la production de diverses molécules en grandes quantités. Citons, par exemple, l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, ou encore l'insuline. Ces molécules sont utilisées en médecine et en recherche. Au rayon des inconvénients, certains produits de gènes végétaux se sont révélés allergisants pour certains consommateurs de la plante ayant reçu le gène étranger. Il convient donc d'agir avec prudence. Notons d'ailleurs que les allergies alimentaires des enfants sont en progression constante depuis quelques années, sans que la transgénèse puisse être incriminée. Notons aussi que le transfert de gènes à des fins thérapeutiques fait l'objet de nombreuses recherches, notamment dans le domaine de la cancérologie. On parle alors de thérapie génique.

Ces approches sont prometteuses : elles donnent des résultats spectaculaires dans certains systèmes expérimentaux, mais n'ont pas atteint le stade de l'application médicale à ce jour. La transgénèse végétale passe, elle, dans la pratique agricole : colza et maïs transgéniques sont cultivés sur des milliers d'hectares. Des avantages pratiques et des intérêts économiques puissants jouent en faveur de ces pratiques nouvelles ; la peur de l'inconnu, en partie due à l'ignorance, la crainte d'absence de contrôle et le sentiment de viol des lois de la nature sont les motivations d'attitudes négatives répandues.

2. Modalités d'obtention des bovins transgéniques (figure 12)

2.1. Micro-injection d'ADN dans le pronucléus de l'œuf fécondé

Jusque très récemment, les bovins transgéniques étaient obtenus par micro-injection directe d'ADN dans le noyau (pronucléus mâle) de l'embryon juste après la fécondation (au stade 1 cellule) (7, 9, 31, 38, 47, 51). Cette méthode présente un certain nombre de désavantages (7, 9, 10, 14, 31, 47) :

- les gènes introduits ne peuvent qu'être ajoutés au génome de l'œuf fécondé, interdisant des modifications génétiques plus précises ;
- l'intégration du transgène se produit de façon aléatoire au sein du génome ;
- toutes les cellules des animaux transgéniques ainsi créés ne contiennent pas le gène étranger (mosaïcisme) ;
- le niveau d'expression tissulaire du transgène ainsi que les modalités spatio-temporelles de cette expression sont imprévisibles ;
- enfin, la transmission du transgène à la lignée germinale est variable.

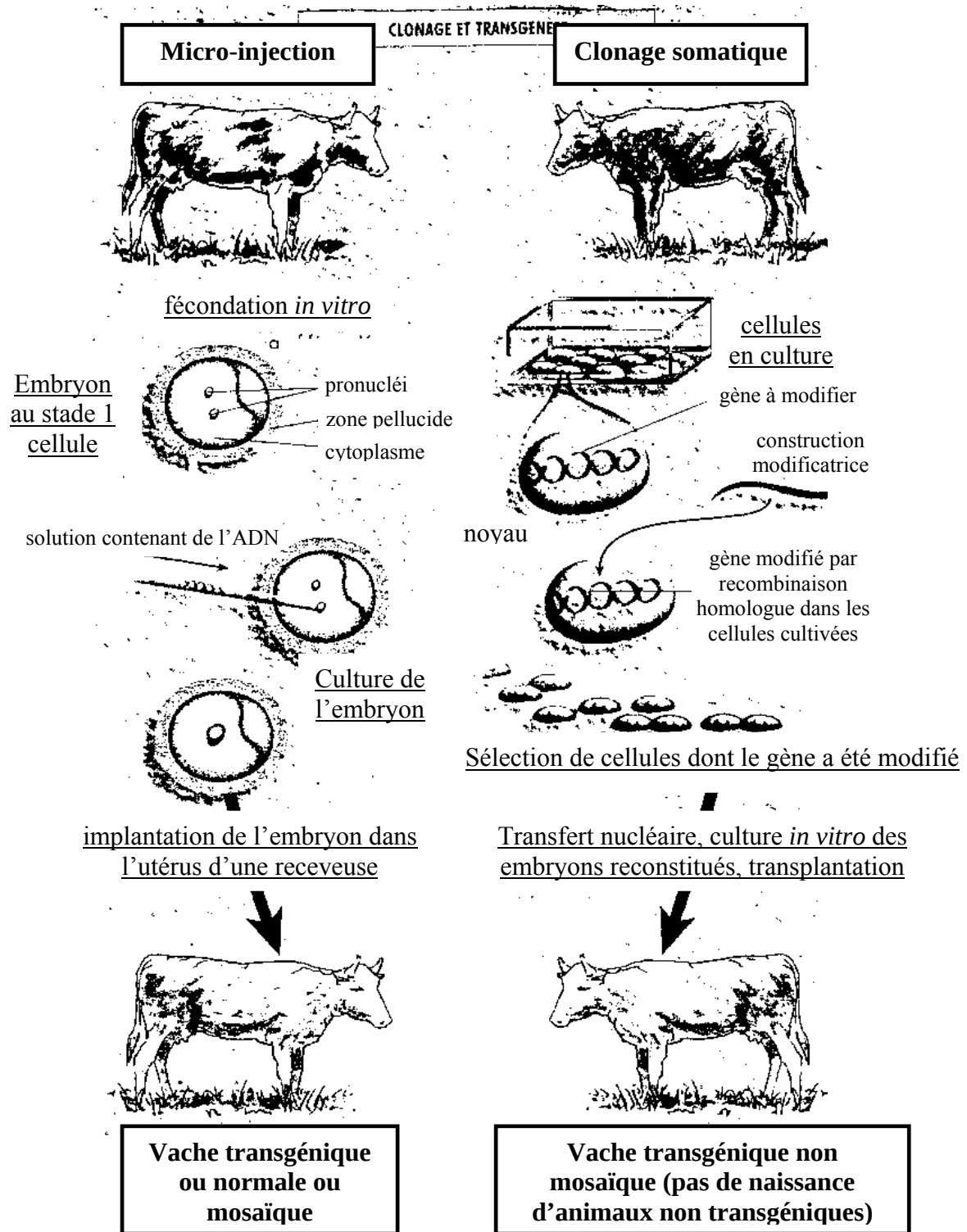


Figure 12 : Les modalités d'obtention des bovins transgéniques (47)

Du fait de ces inconvénients, pour chaque application, plusieurs lignées de bovins transgéniques nécessitent d'être constituées dans le but d'optimiser les chances d'obtenir au moins une lignée avec un niveau élevé d'expression du transgène (2, 13). Et comme, par cette

technique, seulement une petite proportion d'animaux intègrent le transgène, on estime qu'environ 500 embryons doivent être injectés et transférés chez des receveuses pour finalement produire un seul veau transgénique (13, 38, 47). Par conséquent, en utilisant cette approche, la production d'un troupeau entier de bovins transgéniques requiert au moins deux générations, souvent plus : ceci rend cette méthode peu efficace et très coûteuse (2, 13, 31). Sans compter que le gène transféré ne se retrouve pas systématiquement à la génération suivante, et que d'autre part, il peut interagir avec d'autres gènes et en perturber le fonctionnement, faisant alors apparaître une faible proportion de malformations (38, 47). Faute de pouvoir fabriquer à volonté du bétail transgénique, il a été imaginé de « recopier » à l'infini en le clonant un bovin transgénique obtenu à grand-peine : mais compte tenu de la faible efficacité de la procédure de clonage somatique, cette approche ne s'avèrerait pas moins onéreuse (39, 47).

En liant le transgène à un morceau d'ADN nommé promoteur, il est possible de rendre actif ce transgène seulement dans tel ou tel organe ou tissu. C'est bien sûr une expression maximale du gène dans la mamelle qui est alors recherchée, ainsi que sa transmission à la descendance de l'animal transgénique (38, 47). De cette manière, la firme PPL Therapeutics est déjà parvenue à produire l'alpha 1 antitrypsine, destinée au traitement de la mucoviscidose, ainsi que le facteur IX de la coagulation pour le traitement de l'hémophilie (38, 51). Bien que peu rentable, cette technique de production des protéines thérapeutiques d'origine transgénique semble néanmoins moins coûteuse et plus efficace que les procédés classiques de fermentation ou de culture des tissus (38). En effet, les glandes mammaires sont en principe beaucoup plus productives que les cultures de tissus, et permettent une extraction et une purification relativement aisée de la molécule recherchée. Les substances issues du lait de mammifères transgéniques sont aussi sûres d'un point de vue sanitaire (sous réserve bien entendu de conditions sanitaires d'élevage strictes), et éliminent par exemple le risque de contamination virale des produits dérivés du sang humain. Elles sont par ailleurs certainement plus proches des protéines humaines que les substances fabriquées par les bactéries, éloignées de notre espèce sur l'arbre phylogénétique. Les grands laboratoires n'ont toutefois pas montré un intérêt démesuré pour les protéines recombinantes issues de cette technique de micro-injection, globalement considérée comme trop incertaine (38, 47, 51).

2.2. Transfert de noyaux transgéniques de cellules somatiques cultivées bovines dans des ovocytes énucléés

Dans l'optique de la création de lignées de bovins transgéniques, l'intérêt de la technique de transfert de gènes par micro-injection est donc plutôt limité. Les perspectives deviennent tout autres avec le clonage somatique, particulièrement lorsqu'on considère les possibilités offertes par les modifications génétiques des noyaux au cours de la période de culture des cellules somatiques (38, 50). Il y a en effet de nombreux avantages à produire des développements à terme à partir de la transplantation nucléaire de cellules somatiques bovines génétiquement modifiées qui peuvent être maintenues en culture (6, 7, 9, 13, 31, 51, 52, 55) :

- comme les cellules cultivées peuvent être congelées et stockées, la source de noyaux donneurs ne constitue pas un facteur limitant, permettant la production d'un grand nombre d'individus sur une longue période ;
- avant le transfert nucléaire, la sélection de populations de cellules présentant un génotype et un phénotype requis devient réalisable ;
- mais surtout, la combinatoire des cultures cellulaires et de la transgénèse autorise désormais des modifications génétiques précises du génome par recombinaison homologue, précédemment restreintes à l'emploi de cellules ES : ces modifications génétiques ciblées incluent le remplacement, l'inactivation et la mutation spécifique de certains gènes (un allèle ou les deux) à des sites actifs du génome, ainsi que l'addition précise de gènes « étrangers » au génome ;
- à l'image des constructions moléculaires utilisées chez la souris (10), des approches élégantes permettent même de « piloter » le fonctionnement d'un transgène dans l'espace (c'est-à-dire dans un tissu donné), et dans le temps (c'est-à-dire à certains moments de la vie fœtale ou adulte) : il est par exemple possible de transfecter de façon stable les cellules somatiques bovines avec une construction contenant un gène humain lié à un promoteur connu pour fournir une expression élevée du transgène dans la glande mammaire ;
- enfin, comme chaque animal transgénique ainsi obtenu dérive de la transplantation d'un seul noyau génétiquement modifié dans un ovocyte énucléé, toute notion de mosaïcisme est éliminée, et en même temps, la transmission du transgène à la lignée germinale est obligatoirement assurée.

Par cette méthode, la production d'animaux transgéniques s'avère significativement plus efficace que par la technique de micro-injection d'ADN, notamment parce que l'intégration du transgène peut être évaluée *in vitro* avant transfert nucléaire (2). Il a ainsi été montré que, dans certaines conditions, la transplantation d'environ dix embryons clonés chez des receveuses pouvait suffire pour conduire à la naissance d'un veau transgénique (13). D'autre part, comme les cellules (de sexe prédéterminé) modifiées et sélectionnées peuvent être multipliées *in vitro* et que les animaux transgéniques déjà nés peuvent également être reproduits par clonage, de multiples copies de bovins transgéniques peuvent être obtenues après clonage, autorisant une création rapide de troupeaux transgéniques (7, 39, 50). De cette façon, beaucoup moins d'animaux sont nécessaires pour produire des « fondateurs transgéniques », et un troupeau entier de bovins transgéniques peut alors être constitué en une seule génération, ce qui, comparé à la technique de micro-injection, représente un gain de temps considérable : le coût d'obtention de lots complets d'animaux transgéniques s'en trouverait d'autant réduit (9, 13).

Bien que séduisant, ce protocole associant clonage et transgénèse connaît pourtant quelques limites. La première d'entre elles concerne la durée importante durant laquelle les cellules transfectées doivent être cultivées (croissance des colonies) avant que leur sélection ne soit envisageable (testage génétique) (2, 51) : en effet, si on sait, essentiellement à partir

des résultats accumulés depuis une quinzaine d'années chez la souris, comment insérer un transgène en un site précis du génome, et comment en contrôler finement l'expression à la fois dans un tissu donné et pendant une période donnée, encore faut-il parvenir à trier (à l'aide de séquences d'ADN déterminant une résistance à certains antibiotiques et de gènes rapporteurs du fonctionnement effectif du transgène) les cellules dans lesquelles s'est produite une recombinaison homologue entre l'ADN étranger et le génome hôte : or, ceci n'est possible que si les cellules sont maintenues suffisamment longtemps en culture. Ensuite, la capacité des cellules somatiques à subir un deuxième ciblage génétique est assurément diminuée (2). Toutefois, les cellules de fœtus clonés à partir de ces cellules transgéniques peuvent à leur tour être modifiées, permettant de pallier cet inconvénient : la possibilité démontrée (40) de recycler et de « rajeunir » continuellement les cellules bovines vieillissantes par transfert de noyaux permet même d'envisager de multiples modifications génétiques à grande échelle. Enfin, certains types cellulaires paraissent être plus facilement génétiquement modifiables que d'autres (13) : ainsi, de par ses caractéristiques (dont sa grande durée de survie en culture primaire), le fibroblaste bovin est considéré comme un bon candidat aux manipulations génétiques (14). Cette dernière considération n'est d'ailleurs pas sans amener quelques interrogations supplémentaires, parmi lesquelles (47) : quelle sera l'efficacité réelle du ciblage de gènes sur les différentes catégories de cellules en culture ? Est-ce que les différents types cellulaires auront tous la même capacité à intégrer de façon stable le transgène de manière à éviter de créer des embryons anormaux après transplantation nucléaire ?

Malgré de nombreuses autres questions sans réponse, se rapportant notamment à l'innocuité de cette méthode chez les animaux d'élevage, les premiers succès obtenus chez la vache (13, 32) montrent l'avantage du clonage somatique sur la technique de micro-injection d'ADN au stade pronoyau pour produire des animaux transgéniques : le clonage offre donc de nouvelles perspectives pour nous permettre d'exploiter pleinement une technologie comme la transgénèse, certes encore peu efficace, mais de forte valeur ajoutée potentielle (38, 55).

3. Clonage des bovins et transgénèse : perspectives d'application

La possibilité pour l'homme d'intervenir directement sur le patrimoine génétique des animaux crée une situation radicalement nouvelle. Au prélèvement raisonné, à travers le choix des meilleurs reproducteurs et des combinaisons de gènes les plus favorables d'une population animale donnée (sélection), on substitue un façonnage génétique pour produire quelques animaux qui pourront servir à fonder une nouvelle population. C'est à partir de cette nouvelle combinatoire de technologies associant le clonage somatique des bovins et la transgénèse que se dessinent trois champs d'applications très prometteurs (52).

3.1. Production de protéines à usage pharmaceutique et médical

Un bovin est un biotransformateur très efficace, capable de transformer des aliments simples, comme l'herbe, en composés complexes, comme le lait, qui contient plus d'une centaine de protéines différentes. Plusieurs protéines du lait, telles que les caséines, ne sont produites que par les cellules de la glande mammaire car leurs gènes sont régulés par des séquences d'ADN ne fonctionnant que dans ce tissu. Si on associe ces séquences à celles de gènes codant pour une molécule d'intérêt thérapeutique comme l'alpha 1 antitrypsine, utilisée pour traiter l'emphysème pulmonaire et soulager les malades atteints de la mucoviscidose, cette molécule sera produite dans le lait des vaches (47, 52). Pour y parvenir, une telle construction moléculaire peut être injectée dans l'embryon bovin au stade 1 cellule, par micro-injection, mais nous l'avons vu, l'efficacité d'une telle procédure est faible (2, 13, 31,

38, 47, 51). Par contre, la technique de clonage à partir de noyaux génétiquement modifiés (par ciblage génétique) de cellules somatiques semble bien plus appropriée. En effet, disposer d'emblée, avec le clonage, de plusieurs animaux à forte production laitière comme la vache, c'est non seulement réduire le coût de production de la molécule compte tenu des potentialités de synthèse de la mamelle, mais c'est aussi s'imposer rapidement sur de nouveaux marchés (11, 52, 70). Cette logique, simp

idéal. Plus généralement, les rongeurs constituent souvent de mauvais modèles pour de nombreuses maladies génétiques humaines : leurs symptômes ne sont effectivement pas toujours identiques à ceux des maladies humaines, leur conférant une efficacité limitée pour appréhender soit l'évolution de la maladie, soit de nouvelles méthodes de traitement (6, 52). Dans le cas de la mucoviscidose, ceci pourrait provenir du fait que le gène concerné des souris a une structure moléculaire différente de celle du gène humain, alors que ce n'est le cas ni avec le lapin, ni avec le mouton. En réalité, on ne fait que prendre en compte l'évolution des espèces (la souris est beaucoup plus éloignée de l'homme que le mouton) ou le bricolage de la nature au cours des millénaires (le lapin, pour certains gènes, est très cousin de l'homme !) (7, 52). Dans ce contexte, le modèle bovin pourrait, au même titre que le mouton ou le lapin, être utilisé pour approfondir nos connaissances sur l'ontogenèse et les régulations des principales fonctions de l'organisme, mais également pour étudier les maladies pour lesquelles le recours à la souris s'est avéré décevant (55).

3.3. Thérapies cellulaires et xénotransplantations

Tous les projets évoqués jusqu'à présent impliquent la naissance de bovins viables par clonage. Or, les données de la recherche montrent que si l'efficacité du clonage demeure faible, c'est surtout parce qu'il existe une mortalité fœtale élevée (13, 40, 42, 50, 52, 56, 65). L'embryon reconstitué à partir de noyaux de cellules différenciées commence à se diviser et à se différencier apparemment normalement : c'est surtout après l'implantation que les ennuis commencent ! Acceptons ce constat. Pourquoi, alors, ne pas chercher à mieux tirer parti de cet embryon cloné dont les cellules peuvent a priori s'engager dans une première voie de différenciation ? Au lieu de viser l'obtention d'un développement à terme, tentons plutôt d'orienter les cellules embryonnaires, qui sont capables de multiplication active, dans une voie de différenciation donnée, pour en faire des cellules nerveuses, des cellules épithéliales de peau, des précurseurs de cellules osseuses (52).

Cette stratégie s'appuie sur les progrès réalisés dans un tout autre domaine de recherche, à savoir celui qui s'intéresse aux relations fondamentales qui existent entre la prolifération et la différenciation cellulaires, avec comme objectif, une meilleure compréhension des mécanismes qui conduisent une cellule à devenir cancéreuse. De très nombreuses recherches montrent qu'il est possible, au moins partiellement, d'orienter en culture le destin des cellules, et ce, d'autant mieux que les cellules sont encore proches de leur état embryonnaire (52).

Pourquoi alors ne pas appliquer ces connaissances au contrôle de la différenciation de cellules embryonnaires issues de clonage ? Et ceci, avec comme objectif l'obtention de tissus pouvant être greffés chez l'homme. Dans cette optique, la transgénèse ciblée de cellules somatiques cultivées, réalisée préalablement à la transplantation de noyaux, permettrait de modifier spécifiquement les déterminants antigéniques des tissus donneurs afin de prévenir les rejets immuns accompagnant généralement les xénogreffes (6, 9, 13, 70). C'est ce que propose d'ores et déjà la société américaine Advanced Cell Technology qui a montré que la greffe de cellules nerveuses issues d'embryons bovins clonés de 50 jours (reconstitués par transfert dans des ovocytes énucléés de noyaux de fibroblastes fœtaux cultivés et transfectés avec le gène lacZ) dans le cerveau de rats manifestant les troubles caractéristiques de la forme humaine de la maladie de Parkinson pouvait guérir ces animaux, ces cellules continuant par ailleurs, après la greffe, de sécréter de la noradrénaline (le médiateur chimique dont l'absence ou la trop faible production est responsable de la maladie) (77).

Dans cet exemple de thérapie cellulaire, l'immunocompétence des cellules greffées et des cellules hôtes n'est pas requise. Mais une nouvelle route s'ouvre pour les autogreffes : il devient en effet envisageable d'utiliser l'ovocyte de vache (qui peut être obtenu dans des conditions sanitaires très contrôlées) pour reprogrammer le noyau de cellules prélevées par

simple biopsie sur un patient, puis d'orienter les cellules de l'embryon cloné dans une voie de différenciation qui conduirait aux précurseurs de différentes cellules spécialisées (sanguines, cutanées, nerveuses...) (20, 33). On pourrait ainsi lever la réticence à utiliser comme receveur des ovocytes humains énucléés (52). Plusieurs équipes se sont lancées dans cette recherche. Il est encore trop tôt pour dire si ces paris ambitieux seront rapidement atteints. Par contre, à peine la recherche vient-elle de nous annoncer qu'il existait pour les mammifères une autre façon de se reproduire que la seule reproduction sexuée, qu'elle commence à nous laisser entrevoir une possibilité radicalement nouvelle, avec ce clonage non reproductif, de corriger les défauts de nos cellules ou de nos organes. Et il faut bien avouer que le fait de pouvoir régénérer, par transfert nucléaire, à partir d'un seul prélèvement de peau, ou de globules blancs du sang (lymphocytes B), des cellules nerveuses, osseuses ou sanguines met chacun de nous face à une demande sécurisante de thérapie cellulaire pour mieux s'armer contre des maladies invalidantes comme celle de Parkinson, d'Alzheimer, ou certaines leucémies (6, 33, 52, 70).

➤ **POINTS FORTS A RETENIR :**

Rapport-Gratuit.com

ibryonnaires
tilisées pour
ppa

VI. PROBLEMES POSES PAR L'UTILISATION DU CLONAGE CHEZ LES BOVINS

A. LIMITES POUR L'ELEVAGE BOVIN

1. Préservation de la variabilité génétique

Une des objections ou inquiétudes fréquemment évoquées à propos du clonage est le risque de disparition plus rapide de la variabilité génétique (15, 16, 27, 28, 37, 52, 53, 54).

Force est de constater que cet appauvrissement est déjà une réalité, qu'il soit envisagé entre races ou intra-race. En effet, depuis environ 40 ans, le complexe économique en agriculture a fait sienne la nécessité de gains permanents de productivité et contribué à ce qu'aujourd'hui, beaucoup de races « non rentables » se trouvent en péril. Quant à la diversité génétique intra-race, et plus particulièrement au sein des grandes races, c'est la très forte pression de sélection qui l'a laminée, dans la mesure où, à ses débuts, la sélection rationnelle n'a pas tenu compte de la consanguinité : à l'instar des races de chiens, dans chacune desquelles il n'y a, à présent, plus d'individus qui ne soient pas non consanguins (un animal est dit non consanguin lorsque ses parents n'ont pas d'ancêtre(s) commun(s) sur cinq générations), il n'y aura probablement bientôt plus aucun bovin laitier qui ne le soit pas également. Parallèlement, et ce n'est sans doute pas la conséquence la moins néfaste, les éleveurs se sont habitués à un matériel animal standardisé, sans surprise. Et puisque, d'une certaine manière, le clonage s'inscrit dans la logique de cette tendance, si on se persuade que la diversité génétique a déjà été passablement appauvrie en quelques quarante années, on peut se dire, qu'à moins d'une utilisation très large, le clonage ne va entraîner qu'une faible diminution de la diversité génétique (37). Pour Colleau (1992) notamment, cité par plusieurs auteurs (27, 52, 53), l'utilisation raisonnée du clonage dans le cadre de la création du progrès génétique à l'intérieur des noyaux de sélection devrait limiter les risques à un niveau bien plus faible que l'utilisation massive d'un petit nombre de taureaux d'insémination, ce qui est la situation actuelle : avec cinq répliques par clone, le taux final de consanguinité après utilisation systématique de cette technologie dans un programme de sélection pendant 100 ans, ne se traduirait que par une augmentation de 0,25% du taux de consanguinité. Avec 10 répliques, ce taux n'augmenterait que de 0,3%.

Pour les autres applications qui pourraient faire appel à un grand nombre de clones, des précautions devront être envisagées, et un encadrement de la technologie fixant les règles d'utilisation à large échelle des clones testés sera nécessaire, surtout si le coût de mise en œuvre technique diminue (16, 52). Quelques pistes peuvent déjà être ébauchées. Un clonage limité à 50-100 exemplaires pour les animaux utilisés en reproduction paraît raisonnable, alors qu'il y aurait peu d'inconvénients à dépasser cette limite pour les clones « terminaux » (16). Le bilan technico-économique présenté précédemment (voir page 160) tient compte de cet aspect puisqu'il suppose que les clones diffusés appartiennent aux 10% les meilleurs de la population des clones, et non au tout meilleur clone, ce qui veut dire qu'il y en a plusieurs pour maintenir une diversité des génotypes d'élite (15, 16). L'utilisation abusive de certains clones devrait donc être découragée par une législation internationale (en toute rigueur, le problème se pose déjà pour la semence) (16, 52). Ainsi, il ne paraît pas opportun d'ajouter au stock de semences de taureaux d'insémination celui de leurs clones plus jeunes qui seraient produits au fur et à mesure des résultats du testage. La mise en place de cet encadrement rejoindra les tentatives actuelles que mènent plusieurs organismes internationaux pour réglementer une activité économique trop libérale qui ne respecte pas les ressources génétiques (16).

2. Le contexte agricole actuel (37)

Aux interrogations portant sur la place du clonage dans les schémas modernes de sélection des bovins, les spécialistes fournissent des réponses contrastées : la réponse est enthousiaste pour certains généticiens et directeurs de structures de sélection, alors qu'elle est réservée pour d'autres.

La réponse réservée consiste à faire remarquer qu'en élevage bovin, les structures de sélection se sont déjà dotées de schémas de sélection extrêmement efficaces, faisant d'ailleurs une bonne place à la transplantation embryonnaire. En l'état actuel des choses, ce type de schéma donne d'excellents résultats et a généré d'importants progrès génétiques. Les tenants d'une prudente réserve estiment par conséquent que l'on crée suffisamment de progrès génétique, et que le clonage ne répond pas en élevage traditionnel à un véritable besoin. Cette réponse est intéressante en ce qu'elle souligne l'importance des gains génétiques qui ont été réalisés jusqu'à présent. Cela revient à dire que si le clonage était largement appliqué, il ne ferait qu'accélérer un processus d'accroissement du potentiel de production qui est déjà très largement engagé.

Le clonage est à intégrer au débat général sur l'agriculture de demain. Au cœur de ce débat, se trouve la sélection. Dans l'évolution contemporaine de l'élevage depuis les années 60, elle a été une nécessité et a profité au moins en première intention aux consommateurs. Elle est née avec l'intensification et le productivisme, eux-même issus d'une dégradation des termes de l'échange : augmentation perpétuelle des coûts de production et baisse en francs constants du prix de vente des unités bovines. Les éleveurs ont donc été obligés, pour compenser un revenu en baisse, d'accroître le nombre d'unités produites. Cette analyse commence toutefois à être contestée, notamment par les tenants de l'agriculture biologique, qui estiment qu'en réalité, si on tient compte de tous les méfaits causés à l'environnement par l'agriculture, le consommateur paie par impôts interposés les produits de l'élevage beaucoup plus chers qu'il ne le croit. Le système agricole actuel est, de plus, régulièrement remis en cause depuis quelques années par les hommes politiques, à l'occasion des réunions agricoles notamment : pollution de l'environnement, exode rural, désertification, dégradation des paysages, autant de thèmes auxquels les agriculteurs et leurs dirigeants sont sensibles sans toutefois qu'ils s'en sentent responsables. En effet, ils prétendent avoir subi un choix de société. La balle concernant les grandes orientations de l'agriculture de demain se trouverait donc à nouveau entre les mains de la société.

Dans ce contexte, on peut estimer que l'extensification a de bonnes chances de se développer dans le secteur de la production de viande d'herbivores. Cela est beaucoup plus discutable pour ce qui est du secteur laitier. Le clonage est un de ces cas d'innovation technologique dont l'agriculture intensive et productiviste n'a pas cessé de se nourrir. Il est bien clair que si ce type d'agriculture a de l'avenir, le clonage, dès qu'il sera opérationnel, trouvera son créneau. Que celui-ci soit important ou le soit moins, c'est encore difficile à dire. Bien que la sélection ne soit pas nécessairement au service des performances et de l'intensification, le recours aux techniques avancées est quand même beaucoup moins utile dans un contexte extensifié, et ce n'est pas dans un tel domaine que le clonage des bovins trouverait beaucoup d'applications.

B. CONDITIONS NECESSAIRES POUR L'APPLICATION COMMERCIALE DU CLONAGE DES BOVINS

Pour une application commerciale du clonage par transplantation de noyaux des bovins, certaines conditions doivent être remplies. Il convient en effet :

- de produire efficacement *in vitro* les ovocytes receveurs nécessaires au transfert nucléaire et, par conséquent, d'envisager le coût effectif de la constitution de ces stocks d'ovocytes matures afin que cette opération soit la plus rentable possible (1, 48, 57).
- de cultiver *in vitro* les embryons reconstitués selon une procédure fiable et économique (48, 57).
- d'assurer la conservation par congélation des embryons clonés (3, 48).
- de définir un marché, ce qui implique au préalable d'établir et de tester l'uniformité du phénotype d'une lignée clonale individuelle : par exemple, une compagnie ou un producteur pourrait fort bien commercialiser une lignée clonale d'embryons bovins ayant une grande facilité de naissance, un taux de croissance déterminé, une résistance à des maladies précises, voire même certaines caractéristiques comportementales (48).

Toutefois, le clonage des bovins ne pourra être utilisé commercialement à grande échelle sans résolution de certains problèmes déjà évoqués tels que les faibles taux de gestation constatés après transplantation des embryons clonés à des receveuses, et aussi l'existence d'anomalies néonatales des veaux clonés (poids augmenté, faibles taux de survie) (58, 63). De façon plus générale, les faibles rendements globaux de la procédure de clonage, ainsi que la variabilité des résultats démontrent que le chemin risque d'être long avant une éventuelle exploitation économique de cette biotechnologie (47, 57).

Par ailleurs, il est également indispensable que le consommateur soit d'accord pour consommer des animaux nés par transfert nucléaire (ou leurs produits, comme le lait) (39). Enfin, il faut aussi que la législation ne s'oppose pas à la commercialisation des clones et de leurs produits, ce qui est, par exemple, le cas dans les pays scandinaves. En France, il y a pour l'instant un moratoire (concernant les clones embryonnaires et somatiques) sur la commercialisation des clones et de leurs produits, en principe pour laisser le temps de prouver la non toxicité des produits : des études devraient être menées pour vérifier (ou non) l'innocuité de la viande et du lait des clones ainsi que leur équivalence par rapport aux produits des animaux normaux (33, 39, 43, 52, 55).

C. LE CONTEXTE ECONOMIQUE ACTUEL DE L'ACTIVITE SCIENTIFIQUE DE RECHERCHE RELATIVE AU CLONAGE

Outre son intérêt scientifique évident, l'annonce de la naissance de la brebis Dolly par Wilmut *et al.* (1997), cités par (4, 6, 7, 26, 31, 47, 50), a aussi mis en pleine lumière un autre aspect de l'activité de recherche sur le clonage : celui de ses modes de financement. Car, sans la firme privée Protein Pharmaceutical Limited (PPL) qui contribue activement au financement de l'équipe du Dr Wilmut depuis plusieurs années, Dolly n'aurait peut-être pas encore vu le jour, et la reprogrammation complète de l'activité d'un noyau somatique serait encore considérée comme biologiquement impossible (50, 51) ! En fait, le statut du Roslin Institute d'Edimbourg est complexe, pour ne pas dire hybride, dans la mesure où les chercheurs de ce centre sont rémunérés par l'état britannique, tandis que la gestion des structures de recherche ainsi qu'une partie du financement des travaux sont à la charge de PPL (47).

La raison d'être de cette société, ainsi que d'autres entreprises privées qui travaillent dans le domaine prometteur de la transgénèse et du clonage, est la production de protéines d'intérêt médical dans le lait de bovins transgéniques (ou « gene farming »). Dans ce contexte où les

enjeux financiers sont considérables, ces grands groupes privés se livrent actuellement une rude concurrence (37, 38, 43, 47). Pour revenir à Dolly, c'est cette situation de concurrence accrue qui a conduit Wilmut et ses collègues à attendre le terme de la procédure de dépôt de brevet avant de publier dans la revue scientifique *Nature* leur expérience historique, car à cette période, une technique de clonage efficace intéressait énormément les firmes de biotechnologie qui fabriquaient déjà et élevaient des animaux transgéniques (38). En juillet 1997, la naissance de l'agnelle Polly (premier animal cloné et transgénique), encore une fois issue des éprouvettes de PPL et du Roslin Institute, est, pour les mêmes raisons économiques, entourée d'un halo de mystère : compte tenu de l'importance économique de cette nouvelle, l'annonce officielle de cette conception est même effectuée non plus dans une revue scientifique, mais dans le *Financial Times* (38). Les investisseurs eux-mêmes ne s'y sont pas trompés et, à cette période, l'action de la société à capitaux-risques PPL a rapidement fait un bond de 16% (50).

Au total, en matière de clonage, la bataille est sévère, car la protection juridique des innovations contribue à la fois à stimuler les financements (surtout aux Etats-Unis), et à freiner les échanges scientifiques ! En France, la création récente, en association avec l'INRA, d'une société spécialisée dans la transgénèse des mammifères d'élevage (la société BioProtein Technologies) devrait néanmoins permettre d'élargir la compétition et, en ce sens, elle doit être perçue d'un bon œil (52).

D. LES POSITIONS DU PUBLIC VIS-A-VIS DU CLONAGE

1. Les clones bovins inquiètent les associations de consommateurs japonais (39)

Mi-avril 1998, la principale association japonaise de consommateurs se voit confirmer par le ministère de l'Agriculture nippon que sur les 370 clones issus de bovins depuis 1990, 66 d'entre eux avaient été vendus en boucherie, et cela, sur une période de quatre ans. Le fort émoi du public japonais a incité le gouvernement de l'archipel à lancer une campagne d'information attestant de l'innocuité de cette viande produite, à l'époque, à partir des cellules dissociées d'un embryon pré-implantatoire : un ministre japonais a même été obligé de manger de la viande de clone bovin à la télévision pour rassurer la population !

2. Perspectives révélées par une étude canadienne (21)

En février 2000, a été réalisée, au Canada, une enquête téléphonique portant sur un échantillon de 1000 personnes adultes choisies au hasard, afin de mieux comprendre les positions du public vis-à-vis du clonage, et plus généralement vis-à-vis des biotechnologies.

Dans cette optique, les individus interrogés ont dû répondre à trois types de questions différentes :

- premièrement, les personnes questionnées devaient signaler ce qui leur venait à l'esprit lorsqu'on leur parlait de biotechnologies. Leurs réponses ont été comparées avec les résultats d'une enquête menée en 1997 (avant Dolly) sur un échantillon de 1000 Canadiens adultes ;
- ensuite, les individus ont été soumis à une série de questions visant à élucider certaines images et attentes associées au clonage ;
- enfin, dans le but de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux réactions méfiantes ou au contraire enthousiastes vis-à-vis du clonage, les personnes sondées ont été priées de considérer les pour et les contre d'un exemple particulier de clonage animal, à savoir l'utilisation de clones d'animaux de rente pour la production de vaccins.

Cette enquête a tout d'abord révélé que, depuis la naissance de Dolly, la perception du clonage par le grand public a été radicalement modifiée. En effet, en 1997, sur 1000 Canadiens interrogés, seulement 3% d'entre eux faisaient référence au clonage. À l'opposé, en 2000, cette proportion a pratiquement atteint 30%. Concernant l'utilisation du clonage des animaux de rente pour la production de vaccins, plus de la moitié des personnes questionnées jugent cette application potentielle comme fort utile. Cependant, pour 6 personnes sur 10, cette perspective s'avère hautement risquée, et surtout, plus de la moitié des individus sondés considèrent qu'elle est moralement inacceptable.

Par ailleurs, afin de déterminer de façon plus détaillée les facteurs qui affectent les positions du public par rapport au clonage, les auteurs de cette enquête ont tenté d'analyser la contribution de plusieurs variables différentes à la considération globale du clonage. Les variables étudiées sont donc celles-ci :

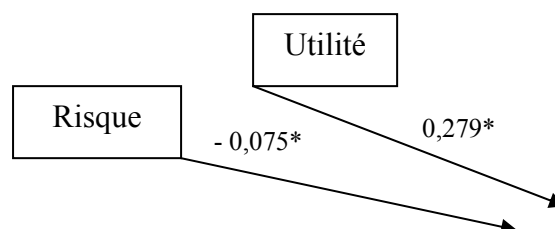
- la compréhension par le public de notions génétiques de base, estimée à travers les réponses à six questions relativement simples, comme par exemple : « Le clonage des animaux aboutit-il à la production d'individus génétiquement identiques ? », ou encore : « Chez l'homme, est-il vrai que les gènes du père déterminent le sexe de ses enfants ? ».
- les positions du public vis-à-vis du clonage, évaluées à travers les réponses des personnes interrogées à quelques propositions (tableau 45), ainsi que la perception par ces personnes de l'utilité, du risque et de l'acceptabilité morale de cette biotechnologie.
- l'intérêt porté par le grand public aux biotechnologies, mesuré à travers les réponses aux deux questions suivantes : « Avez-vous lu (presse), entendu (radio) ou vu (télévision) quelque chose se rapportant aux biotechnologies dans les trois mois écoulés ? », et : « Avant aujourd'hui, avez-vous déjà parlé de biotechnologies avec quelqu'un ? ».

Tableau 45 : Les positions du public canadien vis-à-vis du clonage (21)

Affirmations	Individus en accord avec	Individus en désaccord avec
--------------	--------------------------	-----------------------------

	l'affirmation	l'affirmation
• De nombreuses personnes tireront profit du clonage des animaux. • En matière de clonage, la consultation du public est une perte de temps. • Les risques inhérents au clonage sont acceptables. • Même si le clonage laisse entrevoir certains bénéfices, il n'en demeure pas moins fondamentalement contre nature. • Les règlements actuels sont suffisants pour protéger les gens contre les risques liés au clonage. • La modification des caractéristiques des animaux par le biais de biotechnologies modernes devrait être abandonnée au profit de méthodes d'élevage plus traditionnelles.	13,3% 12,7% 6,4% 43,8% 8,8% 35,5%	30,7% 15,3% 26,7% 26,9% 20,4% 26,3%

Il ressort de cette étude, qu'à l'exception des variables « compréhension des notions génétiques de base » et « intérêt porté au clonage », les autres facteurs ont chacun une influence plus ou moins importante sur les attitudes d'encouragement (ou de rejet) du public vis-à-vis du clonage (figure 13). La variable « acceptabilité morale » semble notamment constituer l'élément le plus influent dans l'orientation du jugement des personnes interrogées vers une considération enthousiaste ou au contraire méfiante vis-à-vis du clonage animal.



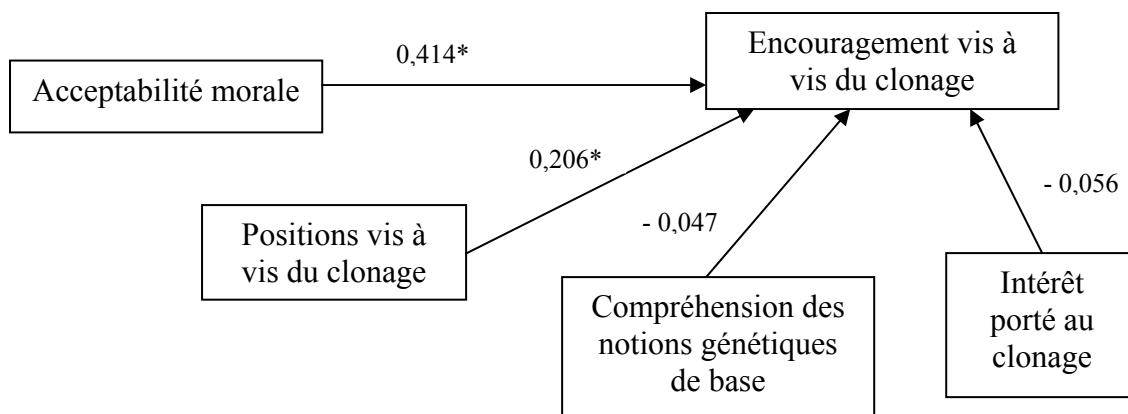


Figure 13 : Facteurs influençant l'enthousiasme du public canadien pour le clonage (21)

La valeur associée à chaque variable analysée est un coefficient de corrélation mesurant l'influence de la variable en question sur l'encouragement du public canadien vis-à-vis du clonage : les valeurs avec exposant (*) ont une influence significative (analyse de régression multiple, $P < 0,05$) sur les attitudes enthousiastes du public canadien vis-à-vis du clonage.

E. CLONAGE : DE L'ETHIQUE A LA POLITIQUE, DE L'ANIMAL A L'HOMME

Les inquiétudes éthiques soulevées par le clonage concernent les dérives de l'application de ces techniques à l'animal d'une part, et à l'homme d'autre part (11, 50, 51).

En ce qui concerne l'animal, le développement des mouvements de protection, avec tout ce qu'il y a d'excessif dans le discours, pousse à élaborer une véritable éthique à l'égard du clonage animal (47). Ainsi, il serait bon que le zootechnicien ne se cantonne pas à la seule réponse actuelle qui est celle du respect du bien-être des animaux, mais qu'il intègre véritablement cette préoccupation à son activité, à cause certes des retombées qu'elles peuvent avoir chez l'homme, mais bel et bien aussi à cause de ce qu'elles impliquent pour l'animal lui-même (37, 58). De même, il serait souhaitable que les recherches soient accompagnées très en amont, dès l'élaboration des protocoles (11, 20, 51, 53). A ce propos, l'INRA travaille déjà en collaboration avec les unions d'éleveurs, mais il faudrait sans doute élargir cet accompagnement à d'autres participants, ne serait-ce que pour mieux traduire les préoccupations de la société civile. Par exemple, la présence d'associations de consommateurs au sein de ces comités de concertation semblerait tout à fait appropriée (11).

Plus généralement, le principe de précaution que les organisations d'éleveurs, au moins en Europe, souhaitent respecter, doit désormais prévaloir non seulement pour les espèces dites de rente, d'intérêt agronomique, mais aussi pour les animaux de compagnie (50). L'actualité récente a clairement montré que les relations que l'homme entretient avec les populations animales évoluent rapidement. Notamment, les perspectives offertes par les mutagenèses contrôlées pourraient donner à l'homme un pouvoir sur les animaux domestiques plus important que celui dont il dispose déjà avec la souris puisque, au lieu d'en user essentiellement pour mieux comprendre la complexité du développement et établir des modèles de maladies humaines, comme il le fait avec cette espèce, il pourrait l'élargir à d'autres finalités économiques, ou à de simples dispositions de convenance (10, 51). Qu'en sera-t-il alors des habitudes qui nous lient aux espèces domestiques, produits du travail de

générations d'éleveurs ? Que convient-il de faire face à ce pouvoir de façonner les animaux où nous conduit le clonage ? Ces deux questions sont à la base même d'une démarche éthique analysant les conséquences pour l'animal du développement des connaissances scientifiques. Discerner dans l'avancée de nos connaissances sur le vivant ce qui est acceptable de ce qui ne l'est pas pour des applications à nos « cousins les bêtes » apparaît donc comme une démarche éthique spécifique, nécessaire mais encore neuve, qui doit être l'occasion d'un renouveau des débats sur la place de l'animal dans notre société (50, 51).

Celle qui concerne l'homme est, en revanche, maintenant solidement établie dans de nombreux pays, et surtout en Europe (50). Le fait est suffisamment rare pour être remarqué : c'est la première fois, en effet, dans l'histoire des technologies, qu'on voit une application nouvelle déboucher quasiment immédiatement sur des décisions politiques et des réglementations (5, 9, 33, 39, 43, 47, 52, 55). L'opinion, comme les décideurs politiques qui ont réagi instantanément, ne s'y sont pas trompés : Dolly est bien la préfiguration du clone humain que la science pourrait permettre de fabriquer si la technique était véritablement transposable à l'homme et mise à la disposition de tout un chacun. On comprend, dans ces conditions, que le président Clinton aux Etats-Unis et que le président Chirac, en France, aient d'emblée saisi leurs comités d'éthique respectifs sur la question du clonage humain. Le Comité consultatif national d'éthique français s'est prononcé le 22 avril 1997 et le Comité d'éthique américain, le 9 juin 1997.

En lisant ces avis, on est frappé de la convergence des points de vue des deux comités qui, pourtant, appartiennent à deux cultures « éthiques » très différentes (43). La bioéthique, aux Etats-Unis, vise essentiellement à garantir la possibilité pour les individus de se conduire de la façon la plus autonome. Elle permet, par exemple, de considérer qu'il existe un véritable « droit à procréer », en utilisant au besoin toutes les technologies offertes par la biomédecine, puisque ce droit prime. En Europe, et spécialement en France, la bioéthique s'entend de manière différente. Elle s'inscrit dans une réflexion plus globale, en tout cas moins individualiste. Ainsi, le respect de la dignité humaine, en tant que principe transcendant l'individu, peut justifier certaines restrictions apportées à l'exercice de la liberté individuelle. Par exemple, l'interdiction en France, et dans la plupart des autres pays européens, du recours à la maternité de substitution (mères porteuses) paraît répondre au souci de protéger la femme dans sa dignité. On estime, en effet, que celle-ci ne serait pas respectée si la femme était amenée à louer son corps, au profit d'autrui, dans le cadre d'une « prestation d'enfantement ».

Ces différences d'approche n'ont cependant pas empêché les deux comités, américain et français, d'aboutir à des conclusions semblables, et sur la base de principes communs. Leur position est la suivante :

- La technique du clonage n'est pas, en tant que telle, contraire à l'éthique. D'ailleurs, les généticiens l'utilisent couramment dans le cadre de leurs recherches, qu'il s'agisse de cloner de l'ADN ou des cellules entières.
- Mais la production de clones humains doit, elle, être fermement condamnée, étant donné qu'elle conduit à instrumentaliser la personne humaine, à la transformer en véritable objet, d'une manière attentatoire au respect de l'homme.

L'avis du Comité d'éthique de l'Union européenne, lui aussi invité à examiner la question du clonage, et qui s'est prononcé le 28 mai 1997, ne dit pas autre chose (43, 60) : « De nombreuses raisons, relève ce Comité, ont été avancées pour justifier le clonage humain, depuis des raisons franchement égoïstes (le millionnaire en quête d'immortalité) jusqu'à des motifs apparemment acceptables (le couple cherchant à compenser la perte d'un enfant ou souhaitant la naissance d'un donneur totalement compatible avec leur enfant atteint d'un mal

mortel). Malgré cela, l'instrumentalisation de l'homme, voire le danger d'eugénisme, rendent le clonage reproductif éthiquement inacceptable ».

S'il n'est pas surprenant, face à de tels enjeux de société, de voir les comités d'éthique, dans les pays où il en existe, appelés à statuer sur le clonage, il est en revanche plus étonnant de constater la rapidité avec laquelle les gouvernements ont réagi, tant au plan national qu'international. Le clonage humain se trouve donc maintenant prohibé, non seulement par une série de dispositions législatives nationales, mais également dans le droit international de la bioéthique (5, 9, 33, 39, 43, 47, 52, 55). Et ce, alors même que la plupart des états ayant approuvé ces normes du droit international sont eux-mêmes encore dépourvus de toute législation en la matière. C'est le cas, en particulier, des Etats-Unis (39, 43, 52, 63). Bien que ce pays soit reconnu comme chef de file dans le domaine de la génétique humaine et des biotechnologies, les activités de recherche peuvent s'y exercer, en effet, en dehors de tout encadrement juridique. La raison est simple : les grands laboratoires industriels, si influents en politique, sont farouchement opposés à toute réglementation fédérale qui puisse entraver la marche de leurs activités. Ils sont ainsi à l'origine de l'échec des propositions législatives tendant à interdire le clonage humain. En Europe, la situation est plus contrastée (5, 9, 39, 43, 47, 50, 52). La plupart des pays de l'Union européenne se sont dotés de législations, interdisant soit le clonage humain à proprement parler (comme en France, en Italie, aux Pays-Bas ou au Royaume-Uni), soit même toute possibilité de recherche sur l'embryon (en Allemagne). Les pays d'Europe de l'Est n'ont pas encore ce type de législation, ne serait-ce que parce que les recherches en sciences de la vie y sont peu ou pas du tout développées.

Face aux incertitudes du droit interne, propre à chaque nation, le droit international de la bioéthique s'est finalement adapté remarquablement vite aux nouveaux défis de la génétique (11, 43, 52, 55). On le constate d'abord en Europe, que ce soit au plan du Conseil de l'Europe ou de l'Union européenne. Ainsi, la Convention du Conseil de l'Europe sur la Biomédecine et les droits de l'homme, signée à Oviedo, en Espagne, le 4 avril 1997, ne dit mot du clonage. Elle est par ailleurs très discrète en matière de recherche sur l'embryon, se limitant à renvoyer aux états membres le soin d'autoriser ou non cette recherche. Il est donc d'autant plus notable que la naissance de Dolly ait poussé ces états à compléter cette Convention, avant même son entrée en vigueur, par un Protocole additionnel adopté à Paris le 12 janvier 1998 par la France et 18 autres pays européens. Il prohibe formellement le clonage « à des fins de reproduction d'êtres humains » et, pour la première fois, prévoit même des sanctions pénales contraignantes pour les états signataires. L'Union européenne, dans sa logique propre centrée sur le fonctionnement du marché, n'a pas non plus été en reste. Plusieurs textes de portée normative évoquent la question du clonage. Ainsi, la directive du 6 juillet 1998, relative à la protection légale des inventions biotechnologiques, et qui vise à harmoniser en Europe les règles applicables aux brevets sur la matière vivante, exclut tout procédé mis au point en vue de cloner des êtres humains. Dans le même ordre d'idées, la décision du Parlement européen et du Conseil des ministres sur les crédits de recherche alloués au titre du programme quadriennal de recherche communautaire (1998-2002), refuse tout financement européen pour des projets de recherche qui tendraient au clonage humain.

Au niveau universel, il n'existe pas encore de texte sur la bioéthique, juridiquement contraignant (43). Pourtant, un premier pas vers une réglementation « éthique » des activités relatives à la génétique a déjà été franchi avec l'adoption de la Déclaration sur le génome humain et les droits de l'homme (43, 52). Elaboré à l'UNESCO, à partir de 1993 sous l'égide du Comité international de bioéthique, ce texte, ratifié par les 186 états membres de l'Organisation mondiale, est le premier document universel de protection du génome humain dans l'esprit des droits de l'homme. L'Assemblée générale des Nations unies ne s'y est pas trompée : le 9 décembre 1997, elle a approuvé à son tour cette Déclaration, le jour même du 50^{ème} anniversaire du texte fondateur qu'est la Déclaration universelle des droits de l'homme

(43, 52, 55). L'approbation par l'ONU est due à l'initiative de la France. Elle révèle le caractère éminemment politique des choix faits en matière de bioéthique, à une époque où la puissance technologique apparaît aussi déterminante pour un état que sa puissance militaire. La Déclaration en question, tout en fixant le cadre éthique et juridique des activités relatives à la génétique humaine, se veut un texte de référence permanent. Elle énonce des principes sans chercher à réglementer telle ou telle pratique biomédicale en particulier. Toutefois, une pratique et une seule y est mentionnée : c'est celle du clonage humain, contraire à la dignité de la personne humaine, et que les états sont invités, pour ce motif, à interdire. Le clonage est ainsi devenu, de façon emblématique, la ligne infranchissable au-delà de laquelle on peut se demander si tout ne devient pas possible.

Pour autant, on peut se demander s'il est réellement fondé d'interdire d'emblée le clonage humain à cause des craintes manifestées par quelques décideurs ? La société accueille toujours avec hostilité les idées nouvelles, en particulier dans le domaine de la reproduction (20, 33, 47). La peur de l'inconnu suscitée par la contraception, la fécondation *in vitro*, la conservation des embryons congelés, les mères porteuses, le don d'embryons, le génie génétique, entre autres, s'est révélée largement infondée. Déjà, ces apports nouveaux de la biologie se sont propagés dans le monde et améliorent le bien-être de l'homme (20, 33). Aujourd'hui, des objections morales et philosophiques sont de nouveau soulevées à l'encontre du clonage, qui semblerait menacer l'individualité, l'autonomie et la dignité de chaque être humain, et avilir la personne humaine en la ramenant au rang de l'objet (20, 50, 52, 55). En d'autres temps, la contraception, l'avortement et la fécondation *in vitro* avaient déjà suscité des réactions similaires. Pourtant, la soif des couples de s'assurer à tout prix une filiation biologique et le mythe récurrent de la « renaissance », moyen d'immortalité, constitueraient très probablement les bases d'une importante demande individuelle et sociale de l'utilisation de la reproduction asexuée par clonage dans l'espèce humaine (33, 47, 60).

En Europe, une seule organisation pionnière, la Société européenne pour la reproduction humaine et l'embryologie (ESHRE), s'est démarquée des critiques générales exprimées sur le clonage en appelant ses membres à suspendre toute tentative pendant cinq ans, jusqu'à ce que les implications éthiques et biologiques du clonage aient été mieux étudiées. Aux Etats-Unis, la Commission consultative nationale de bioéthique (National Bioethics Advisory Commission) s'est également ralliée à ce point de vue, se positionnant là aussi en faveur d'une interdiction de cinq années suivie d'une réévaluation à la fin de cette période. Cette commission a par ailleurs jugé que les méfaits psychologiques éventuellement causés à l'enfant, ainsi que les effets probables sur les valeurs morales, religieuses et culturelles de la société pouvaient suffire à justifier le maintien de l'interdiction du clonage à l'avenir, mais qu'il fallait encore du temps pour examiner et évaluer ces questions. Selon ces organisations, un délai de cinq ans devrait donc être suffisant pour que les études sur les animaux révèlent tout le potentiel et les inconvénients du clonage, et que certaines décisions sur le clonage humain puissent être prises, comme par exemple celle de dupliquer des embryons de 2 ou 4 cellules obtenus après fécondation *in vitro*, afin de produire des embryons génétiquement identiques pour des couples stériles (20).

Ces prises de position sont séduisantes, au sens où elles prônent la réalisation de travaux menés dans un certain esprit d'ouverture. Seulement, d'un point de vue scientifique, les aléas de la reprogrammation de l'activité des noyaux révélés par les effets à long terme que l'on commence à mettre en évidence dans plusieurs laboratoires semblent déjà condamner à eux seuls toute tentative de clonage reproductif dans notre espèce (51, 55). Pourtant, et c'est là que les choses se compliquent, en matière de clonage, il revient, non pas aux seuls scientifiques, mais à la société toute entière, de donner les réponses nécessaires (33, 43, 52). Les forces sociales intégrant des références culturelles ont à cet égard, dans une société

pluriculturelle comme la nôtre, un rôle capital à jouer (52). Or, pour ce faire, les citoyens ont besoin d'un minimum de connaissances afin de pouvoir procéder aux choix démocratiques qu'appelle aujourd'hui la science. Il est indispensable que le public comprenne ce qui se passe dans les grands laboratoires où l'on manipule le vivant. L'émoi causé par la venue au monde de Dolly a eu ce mérite : en alertant, de manière spectaculaire, l'opinion sur les prouesses de la génétique, cette naissance a placé chacun face à ses responsabilités (43) : Quel monde voulons-nous demain ? Quelle société sommes-nous en train de construire, à une époque où la science bouleverse nos conceptions traditionnelles et même nos plus prof

299.391.1006levervicnos c ? toym

- En élevage bovin, une des objections fréquemment évoquées à propos du clonage est le risque de disparition plus rapide de la variabilité génétique. Cette crainte est infondée : l'utilisation raisonnée du clonage dans le cadre de la création du progrès génétique à l'intérieur des noyaux de sélection devrait limiter les risques à un niveau bien plus faible que l'utilisation massive d'un petit nombre de taureaux d'insémination, ce qui est la situation actuelle.
- Le clonage est un de ces cas d'innovation technologique dont l'agriculture intensive et productiviste n'a pas cessé de se nourrir. Il est bien clair que si ce type d'agriculture a de l'avenir, le clonage, dès qu'il sera opérationnel, trouvera son créneau. Le recours aux techniques avancées (dont le clonage) est quand même beaucoup moins utile dans un contexte extensif.
- L'utilisation commerciale à grande échelle des clones bovins implique de contrôler certains points précis de la technique de clonage par transfert nucléaire (savoir produire *in vitro*, selon une procédure fiable et économique, les ovocytes receveurs, savoir cultiver *in vitro* les embryons reconstitués, réaliser la conservation par congélation des embryons clonés et maîtriser les rendements peu élevés de la technique ainsi que la variabilité des résultats). Au préalable, il convient également de définir un marché et de s'assurer que les consommateurs sont prêts à consommer des bovins clonés (ou leurs produits, tel le lait).
- L'avenir scientifique du clonage dépend des investissements importants consentis par certaines firmes privées qui parient sur ses applications futures. La raison d'être de ces entreprises est notamment la production de protéines d'intérêt médical dans le lait des bovins transgéniques (« gene farming »). Dans ce contexte où les enjeux financiers sont considérables, ces grands groupes privés se livrent actuellement une sévère bataille.
- L'acceptabilité morale du clonage semble constituer le principal critère de rejet (ou au contraire d'acceptation) de cette biotechnologie par le grand public.
- Les inquiétudes éthiques soulevées par le clonage concernent les dérives de l'application de ces techniques à l'animal d'une part, et à l'homme d'autre part.
- En matière de clonage animal, il serait bon que le zootechnicien ne se cantonne pas à la seule réponse actuelle qui est celle du respect du bien-être des animaux, mais qu'il intègre véritablement cette préoccupation à son activité, à cause certes des retombées qu'elles peuvent avoir chez l'homme, mais bel et bien aussi à cause de ce qu'elles impliquent pour l'animal lui-même. De même, il serait souhaitable que les recherches soient accompagnées très en amont, dès l'élaboration des protocoles.
- Quant au clonage humain, il se trouve désormais prohibé non seulement par une série de dispositions législatives nationales, mais également dans le droit international de la bioéthique.

CONCLUSION

La définition, dès le début des années 1980, de techniques de reconstitution d'embryons par introduction chez les mammifères d'un noyau dans le cytoplasme d'un ovocyte ou d'un embryon préalablement énucléé a ouvert la voie à des études fondamentales sur la régulation de l'expression des génomes parentaux issus de cellules embryonnaires (49, 55). Elle a aussi permis l'essor de travaux plus finalisés sur la multiplication d'embryons au stade morula et la naissance de groupes d'animaux possédant le même ensemble de gènes nucléaires, ou clones (41, 49, 55).

La technique de clonage par transfert de noyaux a connu, au début des années 90, notamment avec l'espèce bovine, un engouement commercial de quelques années (28, 30, 41, 51). Il faut dire que depuis la naissance, en 1987, du premier veau obtenu par transfert de noyaux embryonnaires, des progrès considérables ont été réalisés sur le plan technique (maturation ovocytaire *in vitro*, culture *in vitro* et micromanipulations), ainsi que sur le plan fondamental (étude des interactions noyau/cytoplasme), permettant d'augmenter significativement l'efficacité du clonage embryonnaire par transfert de noyaux (27, 28, 29, 30, 31, 41, 42). Avec ce type de noyaux, il a ainsi montré que 10% des embryons reconstitués pouvaient donner naissance à un veau (27, 29, 30, 31, 41, 51). Cependant, le nombre restreint de noyaux contenus dans l'embryon donneur au stade morula limite la taille moyenne du clone de blastocystes obtenu *in vitro*, ainsi que le nombre de veaux que l'on peut attendre après transplantation (42).

En utilisant des cellules somatiques en culture comme cellules donneuses de noyaux, on lève la limite imposée par le faible nombre de cellules de chaque embryon (31, 42, 51). Plusieurs stratégies de reconstitution des embryons sont aujourd'hui utilisées, qui donnent une place importante à la coordination entre les stades du cycle du noyau donneur et du cytoplasme receveur (22, 49, 55). Mais l'efficacité est beaucoup plus faible, comprise entre 0,3 et 2% (31, 42, 51, 55) !

Avant tout, le clonage par transfert nucléaire des bovins demeure donc, encore aujourd'hui, une activité de recherche. De plus, des problèmes biologiques nouveaux doivent être résolus, tels ceux liés à la mortalité élevée que nous observons tardivement pendant la gestation, et parfois bien après la naissance (22, 27, 31, 51, 55). Mais cet aspect, a priori négatif, pourrait être riche d'enseignements pour des études de base sur les mécanismes de la différenciation et du vieillissement cellulaires (22, 42, 49, 51).

Néanmoins, l'obtention d'animaux apparemment normaux et fertiles a incité les firmes privées à parier sur le clonage, car au-delà de son utilisation comme outil pour la compréhension de la biologie du développement de l'embryon de mammifère, le clonage des bovins offre de nombreuses perspectives d'applications, tant pour l'expérimentation animale que pour la sélection ou la gestion des ressources génétiques (51, 55). Mais c'est surtout l'association avec la transgénèse, à partir de modifications génétiques contrôlées des cellules donneuses en culture, qui suscite le plus grand intérêt (51, 55).

Le clonage des bovins par transfert de noyaux est dans le droit prolongement de la démarche entamée lors de l'apparition d'autres biotechnologies de l'embryon (comme l'insémination artificielle) : l'homme enrichit ses connaissances sur le fonctionnement des êtres vivants, puis tente de les modifier à son profit (16). Mais au fond, la création de bovins ou d'autres mammifères clonés est-elle vraiment nécessaire ? Le clonage est-il compatible avec la réalité biologique actuelle ? Et surtout, quel est le rapport exact de ses coûts et de ses bénéfices - médicaux, économiques, écologiques, sociaux, spirituels et éthiques - réels ? (23). La technologie du clonage soulève inévitablement une autre question qui est celle de la propriété des ressources génétiques dans le monde animal : on peut en effet envisager qu'un jour, une grande société soit capable de produire et vendre une lignée d'embryons clonés avec

garanties sanitaires, vitesse de croissance assurée, conformation standardisée... avec un mode d'emploi intégrant les conditions d'élevage et d'environnement (28). Une telle situation n'est certainement pas souhaitable, ne serait-ce que parce que la diversité génétique entre individus est une richesse qu'il faut protéger (28, 30). Il ne faut pas s'y tromper : dès le laboratoire, ce sont les biotechnologies qui doivent être mises au service du patrimoine animal et non le contraire (30).

Les progrès de la science donnent souvent le vertige. Il faut toutefois prendre garde au réflexe inconscient d'antipathie à l'égard de tout ce qui n'est pas naturel. Le clonage est assurément sans précédent parmi les mammifères et il modifierait certainement le cours de l'évolution s'il était massivement adopté. Nous avons déjà interféré avec le cours de l'évolution en mettant en place des instances économiques et sociales aidant à se reproduire les individus qui ne pourraient le faire sans elles (20, 33, 47), et la plupart des gens ne jugent pas cela indésirable, bien que cela soit assurément non naturel. On ne peut trouver écrites dans le livre de la nature les lois de la vie bonne ou du bon gouvernement. Quand la morale et les valeurs sont en jeu, aucune réponse absolue ne peut être trouvée dans aucun livre. C'est à nous de réfléchir au type de société dans lequel nous voulons vivre et d'affronter les problèmes pratiques qui se posent à nous dans cet objectif. Si nous avons décidé de vivre dans une société libre et démocratique, les volontés des individus ne peuvent être contrariées que pour de bonnes raisons. Dans le cas du clonage, c'est aux personnes qui veulent l'empêcher d'expliquer en quoi et pour qui ce choix est mauvais. Il est évident que chacun a le droit d'être entendu. Pour autant, ceux qui se réfèrent à des arguments surnaturels ou spirituels ont-ils la moindre qualification pour contribuer au débat sur le clonage ? Il existe un danger bien réel de voir interdite une recherche aux bénéfices potentiels gigantesques pour la seule raison qu'elle heurte les croyances religieuses de certains. Une vision de la nature humaine enracinée dans le passé mythique de l'humanité ne doit certainement pas être notre critère fondamental de décision morale en ce qui concerne le clonage.

L'émotion considérable provoquée par la naissance de Dolly appelle une analyse des forces en jeu autour de la biotechnologie du clonage. Là, recherche et applications progressent de pair, côtoyant le marché pour qui le vivant est d'abord une activité minière. Là, les esprits curieux de la complexité de l'ontogenèse rencontrent les téméraires fascinés par la puissance de l'homme sur le vivant. Là, se dessinent de nouvelles utilisations de l'animal qui pourraient redéfinir les contours de notre représentation de l'homme. En débattre en connaissance de cause, c'est donc bien s'affirmer acteur de notre destin (52).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BARNES (F.), ENDEBROCK (M.), LOONEY (C.), POWELL (R.), WESTHUSIN (M.), BONDIOLI (K.) : Embryo cloning in cattle : the use of in vitro matured oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 1993, **97**, 317-320.
2. BETTHAUSER (J.), FORSBERG (E.), AUGENSTEIN (M.), CHILDS (L.), EILERTSEN (K.), ENOS (J.), FORSYTHE (T.), GOLUEKE (P.), JURGELLA (G.), KOPPANG (R.), LESMEISTER (T.), MALLON (K.), MELL (G.), MISICA (P.), PACE (M.), PFISTER-GENSKOW (M.), STRELCHENKO (N.), VOELKER (G.), WATT (S.), THOMPSON (S.), BISHOP (M.) : Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nature Biotechnology*, 2000, **18**, 1055-1059.
3. BOOTH (P.J.), VAJTA (G.), HOLM (P.), GREVE (T.), CALLESEN (H.) : Post-thaw in vitro survival of vitrified cloned bovine embryos. *Vet. Rec.*, 1997, **140**, 404.
4. BURNY (A.) : Le clonage des êtres : quelques considérations. *Cahiers Agricultures*, 1998, **7**, 389-390.
5. CALLESEN (H.) : Farm animal embryo technology - Ethics and legislation. *A.E.T.E. Newsletter*, 1998, **9**, 4-5.
6. CAMPBELL (K.H.S.) : Cloning technology and its implications. In : Simpson Symposia, University of Edinburgh, 26-29 août 1998, 32-34.
7. CAMPBELL (K.H.S.) : Look on the bright side of cloning. *Nature Med.*, 1998, **4** (5), 557-558.
8. CAMPBELL (K.H.S.), McWHIR (J.), RITCHIE (W.A.), WILMUT (I.) : Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, **380**, 64-66.
9. CAMPBELL (K.H.S.), McWHIR (J.), RITCHIE (W.A.), WILMUT (I.) : Implications of cloning. *Nature*, 1996, **380**, 383.
10. CAPECCHI (M.) : Le remplacement des gènes. *Pour la Science*, 1994, **199**, 56-63.
11. CHASTANT (S.) : Trois questions à... Jean-Paul Renard. *La Semaine Vétérinaire*, 1998, **888**, 34.
12. CHESNE (P.), HEYMAN (Y.), PEYNOT (N.), RENARD (J.P.) : Nuclear transfer in cattle : birth of cloned calves and estimation of blastomere totipotency in morulae used as a source of nuclei. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1993, **316**, 487-491.
13. CIBELLI (J.B.), STICE (S.L.), GOLUEKE (P.J.), KANE (J.J.), JERRY (J.), BLACKWELL (C.), PONCE DE LEON (F.A.), ROBL (J.M.) : Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, **280**, 1256-1258.
14. CIBELLI (J.B.), STICE (S.L.), GOLUEKE (P.J.), KANE (J.J.), JERRY (J.), BLACKWELL (C.), PONCE DE LEON (F.A.), and ROBL (J.M.) : Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nature Biotechnology*, 1998, **16**, 642-646.

15. COLLEAU (J.J.) : Les biotechnologies de l'embryon bovin : application à la sélection, réalités et enjeux économiques. *Cahiers Agricultures*, 1993, **2**, 93-102.
16. COLLEAU (J.J.), HEYMAN (Y.), RENARD (J.P.) : Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *INRA Prod. Anim.*, 1998, **11** (1), 41-56.
17. DEDET (V.) : Une double naissance de veaux clonés transgéniques. *La Semaine Vétérinaire*, 1998, **882**, 27.
18. DELHAISE (F.), ECTORS (F.J.), DE ROOVER (R.), ECTORS (F.), DESSY (F.) : Nuclear transplantation using bovine primordial germ cells from male fetuses. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1995, **7**, 1217-1219.
19. ECTORS (F.J.), THONON (F.), DELVAL (A.), FONTES (R.S.), TOUATI (K.), BECKERS (J.F.), ECTORS (F.) : Comparison between culture of bovine embryos in vitro versus development in rabbit oviducts and in vivo. *Livestock Prod. Sci.*, 1993, **36**, 29-34.
20. EDWARDS (R.G.), BEARD (H.K.) : Les clones, des copies parfaites ? *La revue de la CFDT*, 1998, **14**, 26-31.
21. EINSIEDEL (E.F.) : Cloning and its discontents – a Canadian perspective. *Nature Biotechnology*, 2000, **18**, 943-944.
22. FRERET (S.) : Transfert nucléaire dans l'espèce bovine : culture, caractérisation et synchronisation des cellules somatiques utilisées comme source de noyaux. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2000, n°76.
23. FOX (M.W.) : Is cloning necessary ? *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997, **211** (12), 1504.
24. GARRY (F.B.), ADAMS (R.), McCANN (J.P.), and ODDE (K.G.) : Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*, 1996, **45** (1), 141-152.
25. GARRY (F.), ADAMS (R.), HOLLAND (M.D.), HAY (W.W.), McCANN (J.P.), WAGNER (A.), SEIDEL (G.E.) : Arterial oxygen, metabolite and energy regulatory hormone concentrations in cloned bovine fetuses. *Theriogenology*, 1998, **49**, 321.
26. GLASER (V.) : Cloned cows turn back the cellular clock. *Nature Biotechnology*, 2000, **18**, 594.
27. HEYMAN (Y.), CHESNE (P.), LE BOURHIS (D.) : Clonage et sexage embryonnaires : recherches et perspectives d'applications chez les bovins. *Le Point Vétérinaire.*, 1996, **28**, numéro spécial « Reproduction des ruminants », 873-880.
28. HEYMAN (Y.), CHESNE (P.) et RENARD (J.P.) : Transplantation de noyaux et obtention de clones chez les mammifères domestiques. *Rec. Méd. Vét.*, 1991, **167** (3/4), Spécial Reproduction des Ruminants, 315-322.

29. HEYMAN (Y.), CHESNE (P.), LE BOURHIS (D.), RENARD (J.P.) : Clonage embryonnaire et sexage chez les bovins : résultats actuels et perspectives. *Renc. Rech. Ruminants*, 1995, **2**, 367-372.
30. HEYMAN (Y.), CHESNE (P.), GARNIER (V.), THUARD (J.M.), RENARD (J.P.) : Le clonage embryonnaire chez les mammifères domestiques : du nouveau à l'I.N.R.A. de Jouy-en-Josas. *BTIA*, 1990, **56**, 33-36.
31. HEYMAN (Y.), VIGNON (X.), CHESNE (P.), LE BOURHIS (D.), MARCHAL (J.), RENARD (J.P.) : Cloning in cattle : from embryo splitting to somatic nuclear transfer. In : Proc. 14th A.E.T.E meeting, Venise, 11-12 septembre 1998, 81-89.
32. HILL (J.R.), ROUSSEL (A.J.), CIBELLI (J.B.), EDWARDS (J.F.), HOOPER (N.L.), MILLER (M.W.), THOMPSON (J.A.), LOONEY (C.R.), WESTHUSIN (M.E.), ROBL (J.M.), STICE (S.L.) : Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*, 1999, **51** (8), 1451-1466.
33. KAHN (A.) : Un clone, un enfant comme les autres ? *La revue de la CFDT*, 1998, **14**, 19-25.
34. KANKA (J.) : Brief summary of the cloning history. *A.E.T.E. Newsletter*, 1998, **9**, 7-8.
35. KRISHER (R.L.), BAVISTER (B.D.) : Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, 1998, **49**, 103-114.
36. KUBOTA (C.), YANG (X.), DINNYES (A.), TODOROKI (J.), YAMAKUCHI (H.), MIZOSHITA (K.), INOHAE (S.), TABARA (N.) : In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 1998, **51**, 281-286.
37. LAMBOY (O.) : L'avenir du clonage en élevage divise les spécialistes. *La Dépêche Vétérinaire*, 1997, **527**, 8-10.
38. LAMBOY (O.) : L'industrie de la biotechnologie mise sur le clonage et la transgénèse. *La Dépêche Vétérinaire*, 1997, **527**, 10.
39. LAMBOY (O.) : La santé défaillante des clones. *La Dépêche Vétérinaire*, 1999, **600**, 1-10.
40. LANZA (R.P.), CIBELLI (J.B.), BLACKWELL (C.), CRISTOFALO (V.J.), FRANCIS (M.K.), BAERLOCHER (G.M.), MAK (J.), SCHERTZER (M.), CHAVEZ (E.A.), SAWYER (N.), LANSDORP (P.M.), WEST (M.D.) : Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, 2000, **288**, 665-669.
41. LE BOURHIS (D.), HEYMAN (Y.) : Le clonage embryonnaire par transfert de noyaux : où en est-on chez les bovins ? *Elevage et Insémination*, 1995, **270**, 1-11.

42. LE BOURHIS (D.), VIGNON (X.), CHESNE (P.), HEYMAN (Y.), RENARD (J.P.) : Clonage somatique chez les bovins : premiers résultats. *Elevage et Insémination*, 1998, **287**, 3-9.
43. LENOIR (N.) : Le clonage menace-t-il l'humanité ? *La revue de la CFDT*, 1998, **14**, 32-41.
44. LEWIS (I.M.), PEURA (T.T.), LANE (M.W.), VAJTA (G.), TROUNSON (A.O.) : Pregnancies and live birth achieved from vitrified multigenerational cattle nuclear transfer embryos. *Theriogenology*, 1998, **49**, 323.
45. MOENS (A.), CHESNE (P.), DELHAISE (F.), DELVAL (A.), ECTORS (F.J.), DESSY (F.), RENARD (J.P.), HEYMAN (Y.) : Assessment of nuclear totipotency of fetal bovine diploid germ cells by nuclear transfer. *Theriogenology*, 1996, **46**, 871-880.
46. NUMABE (T.), OIKAWA (T.), KIKUCHI (T.), HORIUCHI (T.) : Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, **64**, 13-20.
47. POSTEL-VINAY (O.), MILLET (A.) : Comment ça va Dolly ? *La Recherche*, 1997, **297**, 50-63.
48. PRATHER (R.S.) : Nuclear transplantation as a method for cloning embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1990, **195** (1), 7-12.
49. PRATHER (R.S.), FIRST (N.L.) : Cloning embryos by nuclear transfer. *J. Reprod. Fert.*, 1990, **41**, 125-134.
50. RENARD (J.P.) : S'il te plaît, copie-moi un mouton. *Médecine/sciences*, 1997, **13** (3), 426-427.
51. RENARD (J.P.) : Le clonage chez les mammifères. *Cahiers Agricultures*, 1998, **7**, 391-393.
52. RENARD (J.P.) : Clonage : les bases du débat. *La revue de la CFDT*, 1998, **14**, 3-18.
53. RENARD (J.P.), HEYMAN (Y.) : La multiplication par clonage : un nouvel outil pour la sélection animale. *Cahiers Agricultures*, 1992, **1**, 309-316.
54. RENARD (J.P.), HEYMAN (Y.) : Développement embryonnaire et clonage chez les mammifères. *Ann. Zootech.*, 1992, **41**, 381-387.
55. RENARD (J.P.), LEGOUY (E.), CHASTANT (S.), HEYMAN (Y.), VIGNON (X.) : Clonage : le présent et les perspectives. *Contracept. Fertil. Sex.*, 1999, **27** (6), 405-411.
56. RENARD (J.P.), CHASTANT (S.), CHESNE (P.), RICHARD (C.), MARCHAL (J.), CORDONNIER (N.), CHAVATTE (P.), VIGNON (X.) : Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *The Lancet*, 1999, **353**, 1489-1491.

57. ROBL (J.M.), STICE (S.L.) : Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. *Theriogenology*, 1989, **31** (1), 75-84.
58. SEAMARK (R.F.) : Recent advances in animal biotechnology : welfare and ethical implications. *Livestock Prod. Sci.*, 1993, **36**, 5-15.
59. SHIELDS (P.G.), KIND (A.J.), CAMPBELL (K.H.S.), WADDINGTON (D.), WILMUT (I.), COLMAN (A.), SCHNIEKE (A.E.) : Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*, 1999, **399**, 316-317.
60. SILVER (L.) : Les clones à venir. *BIOsciences*, 2000, **1**, 48-49.
61. SOLTER (D.) : Lambing by nuclear transfer : *Nature*, 1996, **380**, 24-25.
62. STICE (S.L.), STRELCHENKO (N.S.), KEEFER (C.L.), MATTHEWS (L.) : Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 1996, **54**, 100-110.
63. STICE (S.L.), ROBL (J.M.), PONCE DE LEON (F.A.), JERRY (J.), GOLUEKE (P.G.), CIBELLI (J.B.), KANE (J.J.) : Cloning : new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology*, 1998, **49**, 129-138.
64. THIBIER (M.), GUERIN (B.) : Les biotechnologies de la reproduction et l'amélioration sanitaire du troupeau. *Rec. Méd. Vét.*, 1991, **167** (3/4), Spécial Reproduction des Ruminants, 249-258.
65. VIGNON (X.), CHESNE (P.), LE BOURHIS (D.), FLECHON (J.E.), HEYMAN (Y.), RENARD (J.P.) : Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1998, **321**, 735-745.
66. VOGEL (G.) : In contrast to Dolly, cloning resets telomere clock in cattle. *Science*, 2000, **288**, 586-587.
67. WAKAYAMA (T.), PERRY (A.C.F.), ZUCCOTTI (M.), JOHNSON (K.R.), YANAGIMACHI (R.) : Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394**, 369-374.
68. WALKER (S.K.), HARTWICH (K.M.), SEAMARK (R.F.) : The production of unusually large offspring following embryo manipulation concepts and challenges. *Theriogenology*, 1996, **45**, 111-120.
69. WILKINS (R.J.) : Cloning nonuniformity. *Nature Biotechnology*, 2000, **18**, 5.
70. WILMUT (I.) : Future perspectives on nuclear transfer. In : Simpson Symposia, University of Edinburgh, 26-29 août 1998, 37-38.
71. WILMUT (I.), CAMPBELL (K.H.S.), ROBL (J.M.), JERRY (D.J.), STICE (S.L.), CIBELLI (J.B.) : Quiescence in nuclear transfer. *Science*, 1998, **281**, 1611.

72. WILSON (J.M.), WILLIAMS (J.D.), BONDIOLI (K.R.), LOONEY (C.R.), WESTHUSIN (M.E.), McCALLA (D.F.) : Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim. Reprod. Sci.*, 1995, **38**, 73-83.
73. YANG (X.), KUBOTA (C.), SUZUKI (H.), TANEJA (M.), BOLS (P.E.J.), and PRESICCE (G.A.) : Control of oocyte maturation in cows - Biological factors. *Theriogenology*, 1998, **49**, 471-482.
74. YOUNG (L.) : Candidate mechanisms underlying the Large Offspring Syndrome. In : Simpson Symposia, University of Edinburgh, 26-29 août 1998, 35-36.
75. ZAKHARTCHENKO (V.), WOLF (E.), PALMA (G.A.), BREM (G.) : Effect of donor embryo cell number and cell size on the efficiency of bovine embryo cloning. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995, **42**, 53-57.
76. ZAKHARTCHENKO (V.), REICHENBACH (H.D.), RIEDL (J.), PALMA (G.A.), WOLF (E.), BREM (G.) : Nuclear transfer in cattle using in vivo-derived vs. in vitro-produced donor embryos : effect of developmental stage. *Mol. Reprod. Dev.*, 1996, **44**, 493-498.
77. ZAWADA (W.M.), CIBELLI (J.B.), CHOI (P.K.), CLARKSON (E.D.), GOLUEKE (P.J.), WITTA (S.E.), BELL (K.P.), KANE (J.), PONCE DE LEON (F.A.), JERRY (D.J.), ROBL (J.M.), FREED (C.R.), STICE (S.L.) : Somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in Parkinsonian rats. *Nature Med.*, 1998, **4** (5), 569-574.

**CLONAGE PAR TRANSFERT NUCLEAIRE CHEZ LES BOVINS :
TECHNIQUE, RESULTATS ACTUELS ET PERSPECTIVES**

NOM et Prénom : GAULON Patrice

Résumé :

L'obtention d'animaux identiques génétiquement (clones) est devenue une réalité chez les bovins. Les progrès en maturation *in vitro* d'ovocytes, transfert nucléaire et sexage ont permis d'obtenir des clones d'embryons sexés avec un rendement voisin de celui de la fécondation *in vitro* (30% de blastocystes). Toutefois, après clonage embryonnaire, moins de 10% des embryons reconstitués sont capables de se développer à terme après transplantation chez une femelle receveuse. De même, le clonage de cellules somatiques est associé à des taux élevés de mortalité périnatale (syndrome des gros veaux). Dans les deux cas, il n'est pas certain que la procédure de transfert nucléaire soit responsable de ces échecs. Les limitations du développement semblent plutôt liées à des défauts de synchronisation entre les longueurs des cycles cellulaires de la cellule donneuse et de l'ovocyte receveur : il en résulte une synthèse incomplète d'ADN ainsi qu'une reprogrammation incomplète du noyau transféré avant la première division cellulaire.

En recherche fondamentale, le transfert nucléaire est un outil permettant de conduire des études sur le développement embryonnaire chez les mammifères. Pour l'élevage, il constitue un moyen d'accélérer la sélection et, éventuellement, de créer des lignées de phénotype défini. En médecine, il constitue une méthode plus efficace et plus rapide pour obtenir des fœtus transgéniques utilisables à des fins de thérapie cellulaire, des animaux adultes produisant des protéines pharmaceutiques, des modèles animaux de pathologie humaine et des tissus pour la réalisation de xénotransplantations. Certaines de ces applications connaîtront vraisemblablement un essor important dans un futur plus ou moins proche.

Les réussites en matière de clonage animal ont inévitablement soulevé une polémique concernant la possibilité de cloner l'être humain. Du coup, des propositions visant à définir les cadres des recherches sur l'embryon ainsi qu'à ajouter certains amendements au code pénal sont en cours de négociations. Ce n'est pas suffisant : nous devons, avant toute chose, nous demander si l'application de telles techniques à l'homme est cliniquement utile et éthiquement acceptable.

Mots-clés :

Transfert nucléaire, clonage, bovin.

JURY :

Président : Pr

Directeur : Dr vét. Sylvie CHASTANT-MAILLARD

Assesseur : Dr vét. Yves MILLEMANN

Adresse de l'auteur :

GAULON Patrice

4, rue du Docteur Laënnec

35550 PIPRIAC

**BOVINE NUCLEAR TRANSFER CLONING :
TECHNIQUE, CURRENT RESULTS AND PROSPECTS**

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



NAME and First name : GAULON Patrice

Summary :

The production of genetically identical animals (clones) becomes now possible in cattle. Progress on *in vitro* maturation of oocytes, nuclear transfer and embryo sexing resulted in getting clones of sexed blastocysts at a rate which is close to the one obtained of *in vitro* fertilisation (30% of blastocysts). However, after embryonic cloning, less than 10% of reconstituted embryos are able to develop to term after transplantation to a recipient female. Also, somatic cloning by nuclear transfer is associated with high rate of perinatal mortality (Large Offspring Syndrom). In any case, there is still no evidence that nuclear transfer itself is responsible for these failures. The limitations of development observed with transferred nuclei are thought rather to result from asynchronies in the length of the cell cycle between the donor cell and the recipient cytoplasm : this leads to incomplete DNA synthesis and incomplete reprogramming before the first cell division.

In the sphere of fundamental research, nuclear transfer is a valuable tool in embryological studies in mammals. For breeding, it constitutes a way to accelerate the animal selection and, possibly, to create animal lines of clearly defined phenotype. In the biomedical sphere, it will be a more efficient and faster way of making transgenic fetuses for cell therapies, adult animals for pharmaceutical protein production, new animal models for human pathology and tissues for xenotransplantations. We will come likely to see some of these applications in the near future and others in the long-term future.

Successful animal cloning experiments inevitably raised a polemic about the possibility of the human being cloned. As a result, proposals of work principles with the embryonal material are being negotiated, but also amendments of the penal code. This is not sufficient : above all, we have now to question whether the application of similar techniques in humans would be either clinically useful and ethically acceptable.

Key words :

Nuclear transfer, cloning, cattle.

JURY :

President : Pr

Director : Dr vet. Sylvie CHASTANT-MAILLARD

Assessor : Dr vet. Yves MILLEMANN

Author's address :

GAULON Patrice

4, rue du Docteur Laënnec

35550 PIPRIAC