

La multiplication par clonage : un nouvel outil pour la sélection animale

Jean-Paul Renard, Yvan Heyman

L'obtention en grand nombre d'individus génétiquement identiques est une pratique couramment utilisée dans les productions végétales. Jusqu'à une date récente, elle n'était pas envisageable pour les productions animales ; la situation est en train de changer, en particulier en ce qui concerne les mammifères. Cette évolution est due à une meilleure connaissance du début du développement de l'embryon et à la mise au point de nouvelles technologies de micromanipulation.

Ces dernières années, la scission de l'embryon au stade préimplantatoire de son développement a commencé à être utilisée au niveau des élevages pour produire des paires de jumeaux notamment chez les bovins. Mais cette approche est limitée ; elle ne permet que très rarement d'obtenir des triplés. Une autre technique est en train de voir le jour qui consiste à réaliser en série la greffe d'un noyau, provenant d'une cellule d'un embryon « donneur », dans le cytoplasme d'un ovule « receveur » dont on a, au préalable, retiré le matériel nucléaire. Les chances de développement à terme des embryons ainsi reconstitués sont aujourd'hui encore faibles. Toutefois cette biotechnologie ouvre la voie à la production de véritables clones, c'est-à-dire un ensemble de plusieurs individus génétiquement identiques tous issus d'un même embryon. Ces clones constitueront un nouvel outil pour la diffusion et la création de progrès génétiques.

J.P. Renard, Y. Heyman : Unité de Biologie du Développement, INRA, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Une technique expérimentale déjà ancienne

Le concept du clonage animal par transfert de noyaux est relativement ancien puisqu'il avait déjà été proposé par Speeman en 1938 [1]. Chez les amphibiens, Briggs et King [2] démontraient en 1952 que des noyaux prélevés au stade préblastula et greffés dans des ovocytes pouvaient induire le développement. Ce n'est que beaucoup plus tard que cette approche a pu être transposée aux embryons de mammifères à la suite des travaux de Mac Grath et Solter [3] en 1983 qui furent les premiers à décrire une méthode efficace pour échanger les noyaux d'embryons de souris de stade une cellule. En 1986, Willadsen [4] obtient pour la première fois la naissance d'agneaux après transfert de noyaux de stade 8 cellules.

La technique de transfert nucléaire et son adaptation aux embryons de différentes espèces ont fait l'objet de plusieurs revues [5-7]. La procédure technique est décrite dans la *figure 1*. Elle consiste à dissocier et isoler les blastomères d'un embryon donneur de noyaux. Parallèlement, on procède par micromanipulation à l'énucléation d'une série d'ovocytes receveurs en aspirant les chromosomes arrêtés en métaphase de 2^e division méiotique, à travers la membrane plasmique de l'ovocyte préalablement traité à la cytochalasine. Chaque blastomère est alors réinséré sous la zone pellucide de chaque ovocyte receveur énucléé et les œufs ainsi reconstitués sont soumis à une stimulation électrique dans le but de fusionner les membranes du blas-

tomère et de l'ovocyte pour faire pénétrer le noyau et induire l'activation. Le noyau transféré est alors modifié par le cytoplasme ovocytaire receveur et son programme de développement ainsi réinitialisé. Après fusion, les séries d'embryons reconstitués sont placées en culture *in vitro* pour assurer leur développement jusqu'à un stade compatible avec leur transplantation dans l'utérus de femelles porteuses. Dans notre laboratoire, un expérimentateur confirmé peut en routine reconstituer environ une cinquantaine d'embryons par jour.

Des résultats encore modestes, mais en pleine évolution

Les œufs ainsi reconstitués ne sont pas tous capables de se développer à terme, loin s'en faut ! Si beaucoup sont capables de se diviser et de commencer leur développement, on constate que la mortalité embryonnaire augmente rapidement avec le temps de culture ou après transfert dans une femelle receveuse. En outre, la base de données expérimentales disponibles aujourd'hui est très différente selon les espèces.

Bovins

C'est probablement chez cette espèce que les applications du clonage embryonnaire seront les plus importantes. Depuis la naissance du premier veau issu de transfert nucléaire en 1987 [8], une intense activité de recherche

sur le clonage de l'embryon bovin a été développée à la fois au sein de laboratoires de recherches institutionnels publics et de sociétés privées qui misent sur une application commerciale. Quatre compagnies nord-américaines ont déjà fait naître plusieurs centaines de veaux par transfert de noyaux, le record actuellement publié étant un clone de 11 veaux obtenu à partir d'un seul embryon [9]. Néanmoins les rendements globaux de ces interventions sont encore très faibles. D'après les données récentes de la littérature, rassemblées dans le *tableau 1*, on peut estimer que dans de bonnes conditions 20 à 30 % des embryons reconstitués à partir de blastomères d'embryons de 16 à 50 cellules et d'ovocytes maturés *in vivo* ou *in vitro*, sont capables de se développer jusqu'au stade blastocyste. La transplantation de tels blastocystes clonés dans l'utérus de génisses receveuses aboutit à des taux de mise-bas n'excédant pas 15 à 25 % selon les équipes. En conséquence, le rendement global (nombre de veaux nés/nombre d'embryons reconstitués) reste encore inférieur à 5 %.

Quelques étapes de cette procédure sont déjà bien maîtrisées (*tableau 2*) : le taux d'énucléation des ovocytes est supérieur à 95 % si l'on associe aux micromanipulations le marquage de la chromatine et sa visualisation en microscopie de fluorescence, car le cytoplasme est très opaque chez les bovins. Les paramètres d'électrostimulation ont été testés et permettent maintenant d'obtenir régulièrement entre 70 et 90 % de fusion selon la taille du blastomère et la qualité de l'ovocyte. On sait d'autre part que l'activation de l'œuf dépend de l'âge de l'ovocyte [10]. Une même stimulation de courant continu de l'ordre de 1,2 KV/cm pendant 50µs est efficace à la fois pour fusionner et activer puisque 82 % des œufs reconstitués à partir de blastomères d'embryons de 32 cellules et d'ovocytes maturés *in vitro* stimulés à 36h après le début de maturation, sont capables de se diviser au stade 2 cellules [11]. Le développement ultérieur, lui, est caractérisé par une grande variabilité et dépend comme nous le verrons dans les voies de recherches, à la fois du cycle du noyau donneur et des facteurs liés à l'âge et à la qualité de l'ovocyte receveur.

Le développement *in vitro* des embryons clonés, jusqu'au stade blastocyste, est rendu plus difficile chez cette espèce par l'existence du stade de blocage 8-16 cellules que l'on peut partiellement dépasser en utilisant un système de coculture avec des cellules d'épithélium tubaire bovin. L'utilisation d'ovocytes receveurs produits par maturation *in vitro* à partir d'ovaires de vaches prélevés à l'abattoir, est une étape-clé pour l'avenir du clonage de

l'embryon bovin. Les premiers résultats faisaient référence à l'utilisation d'ovocytes maturés *in vivo*, mais depuis peu il a été montré que des cytoplastes préparés à partir d'ovocytes maturés *in vitro* peuvent être tout aussi compétents pour assurer le développement *in vitro* d'embryons bovins reconstitués [12, 13]. L'embryon donneur de noyaux est généralement prélevé entre 5 et 6 jours, au stade morula constitué en

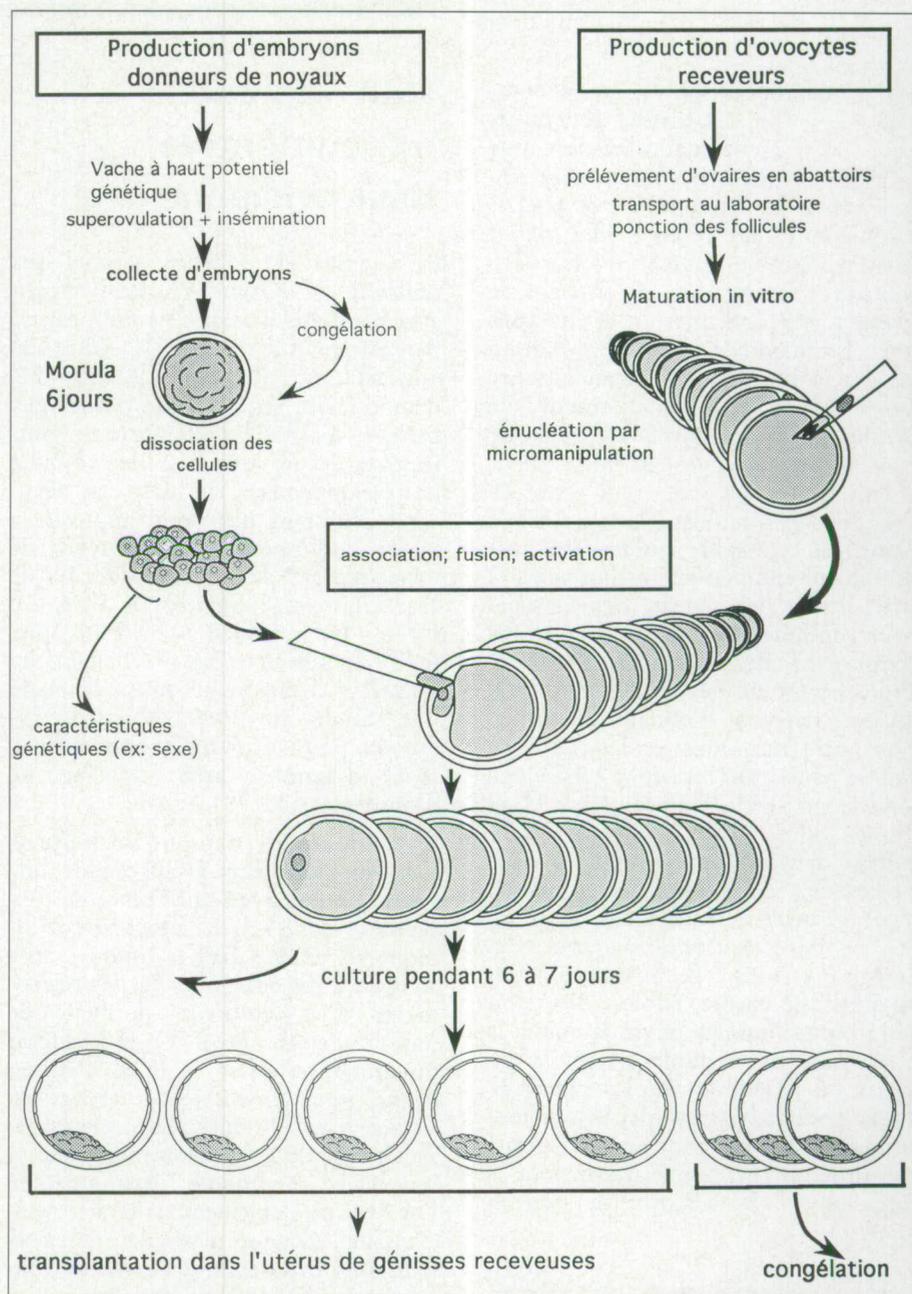


Figure 1. Principe du clonage embryonnaire par transfert de noyaux chez les bovins.

Figure 1. Principle of embryo cloning by nuclear transfer in cattle.

moyenne de 32 blastomères mais il ne semble pas y avoir de différence significative dans le développement des embryons reconstitués selon le stade de l'embryon donneur entre 16 et 60 cellules. Par contre, au-delà, l'aptitude des noyaux de cellules du bouton embryonnaire de blastocyste bovin à être reprogrammés n'a pas encore été démontrée comme c'est le cas chez la brebis [14].

L'analyse des gestations et mise bas après transplantation de blastocystes clonés révèle l'existence de mortalités embryonnaires accrues [15] ainsi que l'obtention de veaux anormalement gros à la naissance [16]. On estime que 20 à 30 % des veaux ont un poids de naissance élevé malgré une durée de

gestation tout à fait normale. Les raisons de ces anomalies sont encore inconnues et méritent des études approfondies.

Lapin

Contrairement à la souris, l'embryon de lapin est probablement un bon modèle pour l'étude du clonage bovin. En effet il présente un certain nombre de similitudes : aptitude des noyaux à être reprogrammés un ou deux cycles après la mise en route du génome embryonnaire, apparition de la polarisation des blastomères au stade 32 cellules comme c'est le cas dans l'embryon bovin. Les premiers essais de transfert de noyau chez le lapin datent

de 1975 [17], mais ce n'est qu'en 1988 que la naissance de lapereaux issus de transfert nucléaire a été rapportée [18]. Nous avons pu obtenir dans notre laboratoire [19] un clone de 6 lapins à partir d'un seul embryon donneur de stade 32 cellules, préalablement congelé puis dissocié et greffé dans une série d'ovocytes énucléés 19 h post hCG. L'aptitude de noyaux de morula de 16 à 64 cellules à être reprogrammés jusqu'à la naissance de lapereaux a été confirmée [20]. En revanche, les cellules de bouton embryonnaire, utilisées comme source de noyaux ont un potentiel de développement très réduit et n'ont pas permis la naissance de jeunes. Plus que le stade de développement de l'embryon donneur avant la formation du blastocyste, le cycle cellulaire du noyau du blastomère doit avoir une influence déterminante sur le développement des embryons clonés. Il a été montré que des noyaux greffés en début de cycle conduisaient à un taux de développement significativement meilleur que celui de noyaux en milieu de cycle (71 % vs 15 % de blastocystes formés respectivement) sans pouvoir affirmer que ces noyaux étaient en phase G1 et S au moment de la reconstitution [21].

Brebis

Parmi les mammifères domestiques, c'est chez la brebis qu'un clone de deux agneaux a pu être obtenu pour la première fois par Willadsen en 1986 [4]. Ce résultat a depuis stimulé les recherches sur le clonage embryonnaire chez d'autres espèces. L'embryon de brebis donneur de noyau a été utilisé avec succès initialement au stade 8 cellules puis étendu à d'autres stades : 32 cellules [22], 64 cellules [23] et il a même été démontré que des cellules issues de la masse cellulaire interne de blastocystes pouvaient encore être utilisées et donner naissance à un agneau après transfert nucléaire [14]. Bien que les données chez la brebis soient très limitées, il semble que le rendement global du clonage en terme de jeunes soit plus important (de l'ordre de 10 %) chez cette espèce que chez les bovins.

Porc

Chez cette espèce, la naissance de jeunes issus de transfert nucléaire n'a pu

Tableau 1

Développement des embryons bovins après transfert de noyaux

Embryons donneurs	Ovocytes receveurs	Développement <i>in vitro</i>		Développement <i>in vivo</i>		Références
		morula/blastocyste	%	naissances	clones	
4-16c.	ovulé	23/185	12,0	2		[8]
16c.	ovulé	92/493	18,6			[44]
32-40 c.	ovulé	84/375	22,0			[44]
16-64 c.		280/1181	23,7	92	n=8	[9]
16-32 c.	<i>in vitro</i>	10/102	9,8			[45]
8-64 c.	ovulé	?	?	101	n=4	[46]
32 c.	ovulé	19/96	19,8			[12]
32 c.	<i>in vitro</i>	14/86	16,3			[12]

Development of bovine embryos after nuclear transfer

Tableau 2

Clonage de l'embryon bovin, efficacité des différentes étapes

	Rendement	Écarts	Pour 100 noyaux
1) énucléation de l'ovocyte	95 %		
2) dissociation de l'embryon donneur	90 %		
3) électrofusion	90 %	[75-100]	81
4) division des embryons reconstitués	75 %	[50-90]	60
5) développement en coculture jusqu'au stade blastocyste	25 %	[0-40]	15
6) transplantation dans femelles receveuses :			
- gestations initiées	35 %	[0-50]	5,2
- gestations à 3 mois	25 %	[0-40]	3,7
- mises bas	20 %	[0-35]	3

Bovine embryo cloning : success rate of the various stages

être obtenue qu'à partir d'embryons donneurs de stade 4 cellules [24] avec un très faible rendement de l'ordre de 1 %. Les tentatives à partir de noyaux de stade 16 cellules n'ont pas permis de produire de blastocystes *in vitro* à partir des œufs reconstitués [25].

Chèvre

Des jeunes issus de transfert de noyaux de stade 8 à 32 cellules ont pu être produits récemment [26] mais à notre connaissance, aucun clone de chevreaux n'a été rapporté dans la littérature. Des noyaux embryonnaires de chèvre ont également été transplantés dans des cytoplasmes ovocytaires de bovin (transferts interspécifiques) mais le développement ne dépasse pas le stade morula [27].

Souris

Ce modèle, qui est bien différent des mammifères domestiques, ne serait-ce que par la mise en route plus précoce du génome embryonnaire, est très utilisé pour des recherches à caractère fondamental sur les relations qui s'établissent entre le noyau et le cytoplasme. Ceci est facilité par une bonne connaissance du début du développement chez cette espèce. Les expériences de Smith *et al.* [28] ont montré que des noyaux de stade 1 ou 2 prélevés en début de cycle pouvaient se développer si on les fusionne à des cytoplasmes en fin de stade 1 alors que la réciproque (noyau de fin de stade 1 ou 2 dans un cytoplasme de début de cycle) n'aboutit pas au clivage. Récemment des développements jusqu'au stade blastocyste *in vitro* ont été obtenus pour des embryons reconstitués à partir de cytoplasme d'ovocyte en télophase 1 et de noyaux de stade 2, 4 cellules ou même bouton embryonnaire ; cependant le développement jusqu'au souriceau n'a pu être obtenu qu'à partir des noyaux de stade 2 [29]. La souris se révèle donc être un bien piètre modèle pour l'étude du clonage embryonnaire !

Voie de progrès

Comprendre les interactions noyau/cytoplasme

La première indication qu'une repro-

Tableau 3

Développement *in vitro* des embryons clonés de lapin selon l'état de leur noyau deux heures après fusion

Nombre d'embryons clonés	Aspect de la chromatine 2 h après transfert nucléaire*		
	remodelée**	non modifiée	condensée
observés	58	21	12
%	(64 %)	(23 %)	(13 %)
développés au stade 2 cellules	46/58 (79 %)	14/21 (67 %)	0/12 (0 %)
développés au stade blastocyste	23/46 (50 %)	0/14 (0 %)	-

* Les embryons sont observés en microscopie de fluorescence basse énergie après marquage spécifique du noyau.

** Gonflement marqué de la chromatine : le volume du noyau est multiplié par 4 (d'après [34]).

In vitro development of cloned rabbit embryos according to the state of their nucleus two hours after fusion

grammation nucléaire se produit est le gonflement du noyau transplanté. Cette réorganisation intervient sous l'effet du cytoplasme de l'ovocyte receveur. Une telle situation existe au cours de la fécondation normale et il a été montré chez la souris que la chromatine du noyau du spermatozoïde est soumise à une phase de décondensation rapide après pénétration dans l'ovocyte ovulé [30]. Il s'ensuit un remplacement progressif des protamines par des histones somatiques et une nouvelle enveloppe nucléaire va se former à partir d'éléments stockés dans l'ovocyte. Après transfert de noyaux de thymocytes dans des ovocytes de souris, Szollosi *et al.* [31] ont montré que la rupture de la membrane nucléaire et l'acquisition d'une nouvelle structure membranaire sont également nécessaires à la formation d'un noyau diploïde fonctionnel. Par immunocytochimie, il a été observé chez le porc qu'un noyau prélevé au stade 16 cellules acquiert les protéines laminaires nucléaires présentes dans le cytoplasme receveur alors que ces protéines sont généralement perdues au stade 8 cellules [32].

L'utilisation de marqueurs spécifiques du DNA (Bisbenzimidazole Hoechst 33342) associés à la microscopie de fluorescence à basse énergie permet maintenant de suivre *in situ* de façon

dynamique les modifications de structure de la chromatine sans perte de viabilité de la cellule [33]. Le remodelage du noyau conditionne donc son aptitude à se diviser et à reprendre les premières étapes du développement. Chez le lapin nous avons développé cette approche en observant l'évolution de la chromatine au cours des heures qui suivent la reconstitution des embryons clonés. La cinétique du gonflement du noyau greffé a été reliée à l'aptitude au développement *in vitro* des embryons correspondants et nous avons montré que des embryons reconstitués à partir de noyaux de stade 32 cellules et d'ovocytes de 19h post-hCG, étaient capables de former des blastocystes dans des proportions significativement plus élevées (50 %) si le noyau greffé doublait de diamètre pendant les 2 h suivant l'électrofusion [34] (tableau 3). L'observation ponctuelle et précoce des embryons reconstitués devrait permettre leur sélection avant même de les retransplanter dans une femelle receveuse et contribuer à améliorer les rendements.

Disposer de cytoplasmes receveurs compétents

Le clonage de l'embryon bovin nécessite de grands nombres d'ovocytes au

stade métaphase II. Les techniques de maturation *in vitro* permettent maintenant de produire de tels ovocytes pour la FIV ou le clonage à un coût réduit, à partir d'ovaires de vaches collectés dans les abattoirs. Mais après maturation *in vitro*, l'évaluation du degré de maturation nucléaire lors de l'énucléation n'est pas un critère suffisant pour juger de l'aptitude d'un ovocyte à conduire le développement d'un noyau exogène. L'âge de l'ovocyte à partir duquel est préparé le cytoplasme semble être un facteur très important pour le développement ultérieur des embryons reconstitués [12]. Si les blastomères de bovin sont fusion-

nés avec des cytoplasmes ovocytaires de 36 h par rapport au début de la maturation *in vitro*, le développement jusqu'au stade blastocyste est significativement plus élevé [11] que celui des embryons reconstitués à partir d'ovocytes de 28 h (respectivement 23 et 9 %). Cette acquisition de la compétence est encore mal comprise. On sait qu'elle dépend en partie des conditions d'activation de l'ovocyte, [35] qui elles-mêmes évoluent avec son âge. Chez les bovins, le taux d'activation augmente avec le vieillissement [10]. Mais des changements au niveau moléculaire doivent intervenir dans le cytoplasme des ovocytes au cours du processus de vieillissement. Cela se traduit par une action différente des composants cytoplasmiques sur le remodelage du noyau après électrofusion. Des noyaux embryonnaires de bovin fusionnés à des jeunes ovocytes en métaphase II (24 h de maturation) subissent très rapidement une condensation de leur chromatine (forme pcc), tandis qu'après fusion dans des cytoplasmes âgés (42 h de maturation) ils sont remaniés directement en une structure ressemblant à un pronoyau, sans formation de pcc [36]. Nous avons également observé que la première segmentation intervient plus tôt dans les œufs reconstitués à partir de cytoplasmes âgés que dans les œufs issus de cytoplasmes jeunes ([37], données non publiées). De telles études sont en cours chez les bovins pour caractériser au niveau biochimique et moléculaire la qualité du cytoplasme receveur préparé à partir d'ovocytes maturés *in vitro*.

Congélation et recyclage des embryons clonés

La congélation de l'embryon est un moyen pratique pour disposer de noyaux donneurs au bon moment. Chez les bovins, des noyaux issus d'embryons congelés peuvent efficacement être reprogrammés. Cependant la perte de blastomères est importante après décongélation de jeunes morula chez cette espèce [9]. Sur le modèle lapin nous utilisons systématiquement des morula congelées comme source de noyaux [19]. Chez cette même espèce, nous avons obtenu quelques développements jusqu'au stade blastocyste (8 %) des embryons reconstitués à partir de blastomères congelés et d'ovocytes également congelés. Mais aucun résultat n'a encore pu être obtenu chez les bovins à partir d'ovocytes receveurs préalablement conservés dans l'azote liquide.

Le recyclage d'embryons clonés de première génération est une source potentielle de noyaux pour produire des clones de deuxième génération. A ce jour, quelques veaux sont nés aux États-Unis après un clonage de 3^e génération. Cependant le rendement diminue dès le 2^e cycle [38]. Chez le lapin, en combinant le transfert de noyaux en série et la congélation des embryons clonés nous avons pu reconstituer plus d'une centaine de morula à partir d'un seul embryon donneur en 3 générations [39]. Le recyclage des noyaux devrait donc être un moyen d'augmenter le nombre d'individus identiques génétiquement, notamment chez les bovins.

Summary

Clonal multiplication : a new tool for animal selection

J.P. Renard, Y. Heyman

Embryo cloning by transfer of nuclei into the cytoplasm of enucleated oocytes opens a new field of application in embryo-transfer biotechnology. In the cattle-rearing industry, for example, several series of five to ten identical calves (clones) have already been produced. However, less than 10 % of the reconstituted embryos have been able to develop to term after transplant into the surrogate mother. More progress is imperative if we want this technology to generate applications. Examples of these include the spreading of genotypes selected for weakly-heritable characteristics and the creation of new genetic progresses. This progress requires greater understanding of the fundamental, and interrelated, key stages occurring at the onset of embryonic development: the effect of oocyte cytoplasm on nuclear organisation, and the programming of gene activity already turned on in the donor nucleus prior to transfer.

Cahiers Agricultures 1992 ; 1 : 309-16.

Tableau 4

Développement *in vitro* des embryons bovins clonés selon l'âge des ovocytes receveurs utilisés

Ovocyte receveur	Nombre d'embryons reconstitués	Nombre fusionnés (%)	Nombre divisés (%)	Nombres blastocystes obtenus (%)
« jeunes » 28 h	108	98/108 (90,7 %)	56/98 (57 %)	5/56 (9 %)
« âgés » 36 h	112	106/112 (94,6 %)	94/106 (88 %)	22/94 (23 %)

In vitro development of cloned bovine embryos according to age of host oocyte

Obtention de cellules souches embryonnaires comme source de noyaux

Chez la souris, des lignées de cellules qui conservent toutes leurs potentialités de différenciation (cellules dites ES) ont été isolées à partir de boutons embryonnaires en sélectionnant des conditions de culture *in vitro* qui permettent aux cellules de se multiplier sans se différencier. Si l'on injecte de telles cellules dans la cavité blastocœliquique d'un autre embryon, elles peuvent contribuer à la formation des différents tissus du fœtus. Elles sont donc pluripotentes. Cependant il est peu probable que des noyaux de cellules ES de souris puissent être reprogrammés après transfert nucléaire et conduire à un développement à terme alors que des cellules de bouton embryonnaire ne le permettent pas [29].

Chez les ruminants en revanche, des noyaux issus de bouton embryonnaire et transférés dans des ovocytes énucléés peuvent se développer à terme [14]. Il serait donc très intéressant chez le bovin ou la brebis, d'établir des lignées de cellules ES afin de disposer d'un très grand nombre de noyaux identiques. Ces recherches sont en cours dans plusieurs laboratoires, mais il semble que des colonies de cellules ES soient beaucoup plus difficiles à obtenir à partir de blastocystes de bovin que chez la souris et que leur croissance est beaucoup moins rapide. Néanmoins Saito *et al.* [40] ont fusionné des cellules de type ES de bovin à des ovocytes maturés *in vitro* et énucléés. Un tiers des œufs reconstitués se sont divisés *in vitro* et 10 % ont atteint le stade 8-16 cellules. Chez le lapin, nous isolons actuellement par immunochirurgie du bouton embryonnaire, une lignée de cellules qui restent indifférenciées pendant au moins 5 passages *in vitro* [41]. La possibilité d'utiliser des marqueurs génétiques chez cette espèce est un avantage pour déceler la totipotence de ces lignées à travers la formation de chimères.

Quelles applications pour l'élevage ?

Le clonage embryonnaire constitue une biotechnologie à forte valeur ajoutée, qui réclame la compétence de techniciens hautement qualifiés. Méthode

sophistiquée, cette biotechnologie est considérée par certains comme un luxe réservé à un petit nombre de pays développés, voire une fuite en avant technologique qui ne répond pas aux difficultés économiques que connaît actuellement ce secteur de production. S'ajoute à ces critiques la peur de voir cette technologie être utilisée sans discernement et à l'origine d'une perte irrémédiable de la diversité génétique des espèces domestiques.

Ces accusations ne prennent pas la mesure de ce qui est encore du domaine de la recherche, donc soumis à nombreuses incertitudes, et ce qui pourra faire l'objet effectivement d'applications. Elles sont en outre grossièrement simplificatrices et n'envisagent pas les possibilités multiples que pourrait offrir l'utilisation de cette technologie. Deux données illustrent la prudence (voire la modestie) et la rigueur dont on doit faire preuve quand on veut juger *a priori* du bien ou du mal de telle ou telle application de la science.

La première concerne les résultats récents obtenus par des collègues chercheurs vietnamiens avec qui nous travaillons depuis plusieurs années. Leur objectif est d'utiliser le transfert d'embryons puis, à plus long terme, le clonage pour 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 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 les a amenés à définir une méthode originale de stimulation de l'ovaire de jeunes buffles et à lever un des obstacles à la faible efficacité reproductrice observée dans les conditions naturelles et sur laquelle butaient plusieurs équipes dans différents pays [42]. Leur résultats permettent d'envisager des applications dans les élevages de sélection de buffles et les connaissances qu'ils ont acquises avec cette recherche suscitent un début de coopération avec des partenaires des pays voisins (Thaïlande, Malaisie). Elles les placent en outre en interlocuteurs

critiques (parce que compétents) devant les techniciens de compagnies étrangères qui explorent actuellement les marchés potentiellement pleins d'avenir de ces pays d'Asie du Sud-Est.

L'autre donnée concerne la peur de voir le clonage devenir une source d'appauvrissement du progrès génétique. Toute peur doit être raisonnée, et cela est possible maintenant en s'appuyant sur la base de données expérimentales existantes. Il vient d'être montré qu'avec 5 répliques par clones, ce qui est un objectif raisonnable mais encore non réel, le taux final de consanguinité après une 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 par clones, ce taux n'augmenterait que de 0,30 % [43]. Ceux qui voient déjà des clones partout envahissant les élevages ont certes raison de dire qu'à ce moment là, la consanguinité sera une menace pour la diversité génétique. Mais en serons nous jamais un jour rendu là ! Le clonage est avant tout destiné à l'amélioration génétique. Dans de nombreux pays où celle-ci n'a pu encore se développer suffisamment, comme par exemple l'Inde, le clonage et les technologies de la reproduction sont envisagés pour l'obtention, plus rapide que par les voies classiques, de taureaux d'insémination artificielle à partir de familles déjà sélectionnées par des éleveurs qui, « intuitivement », ont su choisir les bons animaux. Cette forme de valorisation du patrimoine d'un pays est aussi l'une des applications du clonage. Cette technique peut en effet être appliquée pour mieux connaître les caractéristiques génétiques de race de petits effectifs qui jusqu'à maintenant ne pouvaient être valorisées dans les schémas classiques. Ce qui est sûr, c'est que si le clonage doit un jour sortir du laboratoire où il est encore en phase de recherche, il permettra de connaître avec la même précision, mais à partir d'un nombre d'animaux contrôlés beaucoup plus réduit [43], les caractéristiques d'un reproducteur. Le coût de la sélection en sera d'autant moins élevé ce qui permettra alors de développer des programmes sur des critères moins héréditaires que les critères,

surtout quantitatifs, utilisés aujourd'hui. Diversifier les objectifs de la sélection est un atout pour de nombreuses régions dont l'économie ne peut être vouée qu'à l'élevage.

Les raisons qui viennent d'être avancées ne doivent pas pour autant sous-estimer les risques que comporterait à terme l'utilisation de cette technologie sans réglementation, c'est-à-dire en dehors d'une politique de gestion des ressources génétiques. C'est là que dès aujourd'hui doit se porter notre vigilance.

Conclusion

Les données présentées sur le clonage embryonnaire permettent de prendre la mesure des nouveaux outils que forge la recherche. Faire évoluer les objectifs des programmes de sélection, situer la place de chacun, éleveurs et utilisateurs, dans la gestion de ces programmes sont autant d'actions à développer qui orienteront le long travail déjà engagé en faveur des espèces d'intérêt zootechnique et du maintien de la diversité génétique des animaux de ferme ■

Résumé

Le clonage embryonnaire par transfert d'un noyau dans le cytoplasme d'ovocytes énucléés offre un nouveau champ d'application à la biotechnologie que constitue le transfert d'embryons. Dans l'industrie de l'élevage bovin par exemple, plusieurs séries de cinq à dix veaux identiques (clones) ont déjà vu le jour. Toutefois moins de 10 % des embryons reconstitués sont capables de se développer à terme après transplantation dans une femelle receveuse. Des progrès sont indispensables si l'on veut que cette technologie puisse être source d'applications, par exemple pour la diffusion de génotypes sélectionnés sur des caractères peu héréditaires, et la création de nouveaux progrès génétiques. Ces progrès dépendent d'une meilleure compréhension de deux événements fondamentaux, liés entre eux, qui marquent le début du développement embryonnaire : l'effet du cytoplasme de l'ovocyte sur l'organisation du noyau et la programmation de l'activité des gènes qui est déjà engagée dans le noyau donneur avant son transfert.

Références

1. Speeman H. *Embryonic development and induction*. New York : Hafner publishing Co, 1938 : 210-1.
2. Briggs R, King TJ. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1952 ; 38 : 455-63.
3. Mc Grath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983 ; 220 : 1300-2.
4. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986 ; 320 : 63-5.
5. Willadsen SM. Cloning of sheeps and cow embryos. *Genome* 1989 ; 31 : 956-62.
6. Prather RS, First NL. Nuclear transfer in mammalian embryos. *Int Rev of Cytology* 1990 ; 120 : 169-89.
7. Heyman Y, Chesné P, Renard JP. Transplantation de noyaux et obtention de clones chez les mammifères domestiques. *Rec Méd Vét* 1991 ; 167 : 315-22.
8. Prather RS, Barnes FI, Sims et al. Nuclear transplantation in the bovine embryos : assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1987 ; 37 : 859-66.
9. Bondioli KR. Nuclear transfer in cattle. In : *Proc Int Symposium Anim Biotech*, Oct. 1991, Kyoto, Japan.
10. Ware CB, Barnes FL, Maki-Laurila M, First NL. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res* 1989 ; 22 : 265-75.
11. Chesné P, Le Bourhis D, Peynot N, Rao VH, Renard JP, Heyman Y. *In vitro* development to the blastocyst stage of cattle nuclear transfer embryos : effect of the age of recipient oocytes. 8^e Réunion AETE, 11-12 sept 1992 Lyon : Mérieux éd, 1992 : 138.
12. Heyman Y, Rao VH, Chesné P, Renard JP. Bovine nuclear transfer : embryo development is influenced by age of the recipient oocyte. 12th Int Congress on Animal Reprod, The Hague (Netherlands), 1992 ; 2 : 688-90.
13. Yang X, Jiang S, Kovacs A, Foote RH. Age dependent activation, enucleation and nuclear transfer of bovine oocytes matured *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod* 1991 ; suppl. 44 : 141 (abstract).
14. Smith LC, Wilmut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 1989 ; 40 : 1027-35.
15. Heyman Y, Chesné P, Rao VH, Marchal J, Camous S, Renard JP. Gestational profile of recipient heifers following transfer of *in vitro* produced cloned blastocyst. 8^e Réunion AETE 11-12 sept 1992 Lyon : Mérieux éd, 1992 : 164.
16. Seidel GE. Overview of cloning mammals by nuclear transplantation. IETS Symposium on cloning, Denver : Seidel éd, 1992 : 1-4.
17. Bromhall JD. Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature* 1975 ; 258 : 719-21.
18. Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988 ; 39 : 657-64.
19. Heyman Y, Chesné P, Renard JP. Reprogrammation complète de noyaux embryonnaires congelés, après transfert nucléaire chez le lapin. *CR Acad Sci Paris* 1990 ; 311, Série III : 321-6.
20. Collas P, Robl JM. Development of rabbit nuclear transplant embryos from morula and blastocyst stage donor nuclei. *Theriogenology* 1991 ; 35 : 190 (abstract).
21. Collas P, Balise J, Robl J. Influence of cell cycle of the donor nucleus on development of nuclear transfer rabbit embryos. *Biol Reprod* 1992 ; 46 : 492-500.
22. Heyman Y, Chesné P, Garnier V, Thuard JM, Renard JP. Le clonage embryonnaire chez les mammifères domestiques : du nouveau à l'INRA de Jouy-en-Josas. *BTIA* 1990 ; 56 : 33-6.
23. Laurie MS, Moor RM. Cytoplasmic control of the donor nuclear activity in sheep nuclear transplant embryos. *J Reprod Fert* 1991 ; suppl. 43 : 261-2 (abstract).
24. Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1989 ; 41 : 414-8.
25. Nagashima H, Saito S, Yamakawa H. Development of porcine nuclear transplant embryos from 8-16 cell stage donor nuclei. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 263.
26. Yong Z, Jianchen W, Jufen Q, Zhiming H. Nuclear transplantation in goats. *Theriogenology* 1992 ; 35 : 299 (abstract).
27. Wolfe BA, Kraemer DC. Interspecies nuclear transplantation. IETS symposium on cloning, Denver : Seidel éd, 1992 : 42-4.
28. Smith LC, Wilmut I, West JD. Control of first cleavage in reconstituted mouse embryos. *J Reprod Fert* 1990 ; 88 : 655-63.
29. Kono T, Kwon OY, Nakahara T. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J Reprod Fert* 1991 ; 93 : 165-72.
30. Adenot P, Szöllösi M, Geze M, Renard JP, Debey P. Dynamics of paternal chromatin changes in live one-cell mouse embryo after natural fertilization. *Mol Reprod Dev* 1991 ; 28 : 23-34.
31. Szollosi D, Czolowska R, Szollosi MS, Tarkowski AK. Remodeling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes. *J Cell Sci* 1988 ; 91 : 603-13.
32. Prather RS, Sims MM, Maul GG, First NL, Schatten G. Nuclear lamin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine embryogenesis. *Biol Reprod* 1989 ; 40 : 123-32.
33. Debey P, Renard JP, Coppey-Moisan M, Monnot I, Geze M. Dynamics of chromatin changes in live one-cell mouse embryos : a continuous follow-up by fluorescence microscopy. *Exp Cell Res* 1989 ; 183 : 413-33.
34. Adenot PG, Heyman Y, Chesne P, Rao VH, Renard JP. Relationship between kinetics of nuclear swelling and subsequent *in vitro* development of nuclear transplant rabbit embryos. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 185.
35. Ozil JP. The parthenogenetics development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile stimulation. *Development* 1990 ; 109 : 117-27.
36. Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Nuttallman PR, First NL. Processing of donated nucleus and timing of post-activation events differ between recipient oocytes 24 or 42h of age. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 224.
37. Heyman Y, Campion E, Chesne P, Renard JP. Cryoconservation of recipient oocytes for nuclear transfer in the rabbit species. *Cryo* 91, Louvain, 1991 (non publié).

38. Stice SL. Multiple generation bovine embryo cloning. IETS Symposium on cloning, Denver : Seidel éd, 1992 : 28-31.

39. Rao VH, Heyman Y, Chesné P, Renard JP. Multiplication of selected rabbit embryo by recloning of frozen stored nuclear transfer embryos. 8^e Réunion AETE, 11-12 sept 1992 Lyon : Mérieux éd, 1992 : 202.

40. Saito S, Strelchenko N, Niemann H. Bovine embryonic stem cell-like cell lines cultured over several passages. *Roux's Arch Dev Biol* 1992 ; 201 : 134-41.

41. Mœns A, Renard JP. Progress in the culture of rabbit embryonic cells. 12th Int Congress on Animal Reproduction, The Hague (Netherlands) 1992 ; 2 short communication n° 210 : 721-3.

42. Uoc NT, Nguyen BX, Ty LV, Chupin D, Beckers JF, Renard JP. Effect of œstradiol supplementation on superovulation in Swamp Buffaloes. *Theriogenology* 1992 ; 38 : 615-21.

43. Colleau JJ. Combining use of embryo sexing and cloning within mixed MOETs for selection on dairy cattle. *Genet Sel Evol* 1992 ; 24 : 345-61.

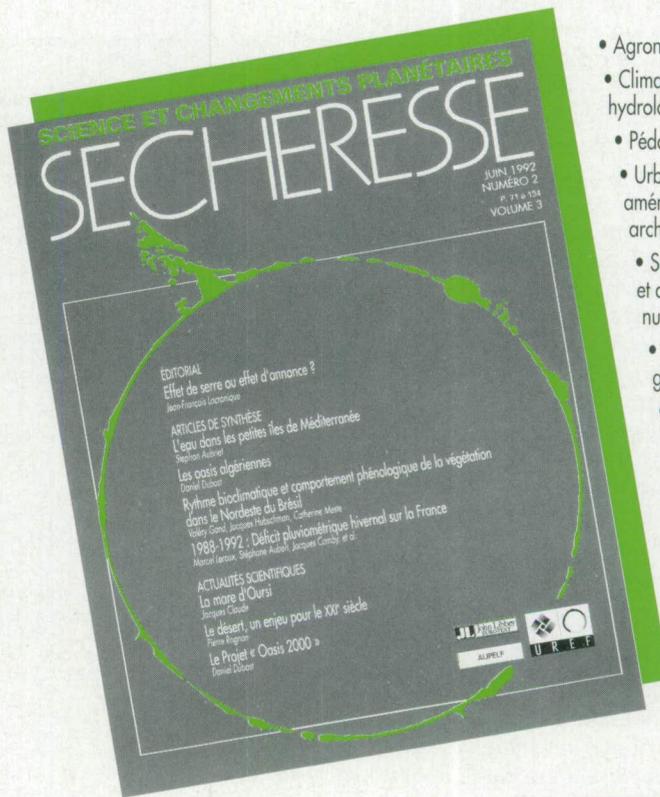
44. Westhusin ME, Pryor JH, Bondioli KR. Nuclear transplantation in the bovine embryo : a comparison of 5-day, 6-day, frozen thawed and nuclear transfer donor embryos. *Mol Reprod Dev* 1991 ; 28 : 119-23.

45. Clement-Sengewald A, Palma GA, Berg U, Brem G. Comparison between *in vitro* produced and *in vivo* flushed donor embryos for cloning experiments in cattle. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 196.

46. Willadsen SM, Janzen RE, McAlister RJ, Shea B, Hamilton G, McDermand D. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 1991 ; 35 : 161-70.

GL BALEMENT

TOUTES LES SCIENCES



- Agronomie, élevage, écologie
- Climatologie, météorologie, hydrologie, géographie
- Pédologie, géologie
- Urbanisme, aménagement du territoire, architecture rurale
- Santé de l'homme et de l'animal, nutrition
- Biologie, génie génétique
- Sciences de l'ingénieur
- Education, communication
- Droit international

(4 numéros/an)

JOHN LIBBEY EUROTTEXT

SÉCHERESSE TARIFS D'ABONNEMENT 1993 (1 an - 4 numéros)

	Particuliers	Institutions	Étudiants (1)
CEE	280 FF	480 FF	200 FF
Continent africain	140 FF	240 FF	100 FF
Canada	65 \$C	115 \$C	45 \$C
Autres pays	330 FF	520 FF	250 FF

Les frais de port sont inclus dans ces tarifs.
(1) Tarifs étudiants consentis sur présentation de la photocopie R° / V° de la carte d'étudiant en cours de validité.

Veuillez m'abonner au tarif : _____ FF

Je joins à l'ordre de John Libbey Eurotext
 un chèque bancaire un chèque postal

Nom de l'abonné _____

Spécialité _____

Adresse complète _____

Date _____ Signature _____

Adresser ce bulletin à :
John Libbey Eurotext, 6, rue Blanche - 92120 Montrouge