

# Le clonage chez les mammifères

**S'**il est un mot qui traduit à lui seul l'avancement spectaculaire des biotechnologies de la reproduction chez les mammifères, c'est bien celui de clonage. L'annonce, en janvier 1997, par des chercheurs écossais, de la naissance du mouton Dolly issu d'un noyau de cellule de glande mammaire a fait brutalement sortir du laboratoire une technologie pourtant encore balbutiante. Une alternative se présentait à la reproduction sexuée considérée jusqu'alors comme la seule voie de reproduction pour les mammifères. D'emblée, les dérives de l'application du clonage à l'homme ont fait l'objet de nombreux débats et les recherches menées sur les animaux montrées du doigt. Ce que l'on appliquait aux mammifères domestiques n'allait-il pas inévitablement être aussi mis en œuvre chez l'homme ? Ne devrait-on donc pas interdire le clonage animal ? Le but de cet exposé est de mieux éclairer ces interrogations en faisant le point sur l'état d'avancement des recherches.

## Un clone, des clones

Commençons par définir ce qu'on entend exactement par le mot « clone ». La réponse n'est pas si simple, car l'usage a très rapidement évolué ces dernières années. Mais elle est instructive. Le mot clone vient du grec (*klon*) et désigne une petite branche ou une jeune pousse. Chez de nombreux végétaux les cellules embryonnaires présentes dans les bourgeons des branches de la plante adulte sont utilisées pour le marcottage et le bouturage, techniques maintenant étendues à la multiplication *in vitro* à partir de cellules somatiques en culture. Un clone désigne donc un ensemble d'organismes tous issus d'un organisme unique.

En biologie cellulaire et en microbiologie, c'est le sens que l'on donne à ce terme qui désigne une population de cellules dérivées d'une cellule unique. Par extension on parle aussi de clonage de molécules quand celles-ci sont multipliées à l'identique au sein de cellules en division, bactéries ou cellules eucaryotes. Mais il ne peut en être de même avec les animaux. À l'exception de certains d'entre eux, comme les éponges et les coraux, c'est la reproduction sexuée qui est exclusivement utilisée et chaque organisme est issu d'une cellule unique, l'œuf fécondé.

Pour obtenir un clone animal il faudra donc recourir à des artifices (figure 1). On peut d'abord dissocier les cellules issues des premières divisions de l'œuf fécondé. Cette technique est simple et s'inspire de ce qui se réalise, mais à l'état naturel, chez le tatou (*Dasyus hybridus*) dont l'embryon commence à se diviser en 8 à 12 bourgeons qui poursuivent ensuite leur développement aboutissant à autant de jeunes. Chez les mammifères, on aboutit très occasionnellement à la naissance de clones, mais avec un

**Tableau 1. Les applications potentielles du clonage animal\***

<b>Expérimentation animale</b>	Réduction du nombre d'animaux en expérimentation Détection d'effets liés à un traitement Mesure de la variabilité génétique additive de caractères complexes
<b>Création d'animaux transgéniques</b>	Production de protéines recombinantes dans le lait Production de cellules différenciées pour la thérapie cellulaire Production d'organes de porc pour la transplantation chez l'homme
<b>Sélection</b>	Création de lignées animales Diffusion de génotypes d'élite Aide au maintien de la diversité génétique

\* En dehors de la recherche en biologie fondamentale.

record : quatre veaux issus d'un seul embryon dissocié au stade huit cellules.

On peut aussi mimer ce qui se produit à l'état naturel chez les mammifères avec les jumeaux vrais quand l'embryon se sépare en deux masses de cellules. La scission de l'embryon de mouton ou de vache permet des taux de naissance gémellaire élevés, mais l'opération ne peut être renouvelée sur les demis (ou quarts)



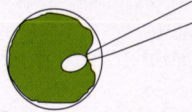
Type d'intervention	Principaux résultats
<b>Dissociation des blastomères</b> 	Quelques cas de quadruplés rapportés chez le mouton et la vache
<b>Scission de l'embryon</b> 	Plus du tiers des embryons biopsiés peuvent produire des jumeaux
<b>Transfert de noyau</b> 	Naissance du mouton Dolly et de plusieurs souris à partir de noyaux d'animaux adultes Efficacité faible : 1 à 2 % des embryons donnent un animal viable Naissance de veaux et moutons transgéniques à partir de cellules fœtales

Figure 1. Les différentes techniques de clonage animal.

**Jean-Paul Renard**

Directeur de recherche INRA,  
Unité de biologie du développement, INRA,  
78352 Jouy-en-Josas cedex, France.



d'embryons obtenus, car les cellules qui ont été séparées se trouvent déjà trop engagées dans le programme de développement.

Dans les deux cas que je viens de présenter, les animaux forment bien un clone puisqu'ils sont issus d'un seul œuf. La situation devient différente avec l'opération qui consiste à introduire un noyau étranger dans le cytoplasme d'un œuf non fécondé dont on a auparavant retiré le matériel nucléaire : on leurre le cytoplasme qui tente alors d'organiser le nouveau noyau pour lui redonner ses caractéristiques embryonnaires. Mais les ovocytes proviennent en général de femelles différentes et l'ADN des mitochondries n'est pas le même. Le clone qui en résulte constitue alors un ensemble d'organismes qui possèdent tous, mais seulement dans le noyau de leurs cellules, un ensemble de gènes identiques.

Mais que dire alors de Dolly qui est unique puisque sa mère, donneuse de cellules de la glande mammaire cultivées pendant plusieurs semaines puis congelées était morte depuis longtemps ! Force est de constater que les médias imposent une nouvelle définition du clone : un animal, même unique, issu de transfert de noyaux. Ce n'est apparemment plus l'ensemble d'organismes identiques que l'on veut maintenant nommer, que le mutant manipulé qui pourrait se cacher sous l'apparence d'un double.

## Une technique encore peu efficace

La technique de transfert de noyaux a connu au début des années 90, notamment avec l'espèce bovine, un engouement commercial de quelques années. Plusieurs compagnies privées ont, à cette époque, fait naître quelques centaines de veaux en utilisant comme source de noyaux des jeunes embryons de 32 à 64 cellules. Avec ce type de noyaux, nous avons montré que 10 % des embryons reconstitués pouvaient donner naissance à un veau. Pour pallier le petit nombre de noyaux disponibles par embryon, on peut réutiliser les embryons clonés pour un deuxième cycle de transfert nucléaire (reclonage), ceci sans diminution significative de l'efficacité, alors que ce n'est plus le cas avec un cycle ultérieur. Dans ces conditions 6 embryons sur 10 en moyenne sont susceptibles de donner un clone de 2 à 5 individus.

En utilisant des cellules en culture comme cellules donneuses de noyaux, on lève la limite imposée par le faible nombre de cellules de chaque embryon. Mais l'efficacité est beaucoup plus faible, comprise entre 0,3 et 2 % ! Les données sont toutefois encore peu nombreuses car ce n'est qu'au cours des deux dernières années que la reprogrammation de cellules somatiques différenciées, jusqu'alors considérée comme une impossibilité biologique, est devenue une réalité.

À ce jour seulement une vingtaine de moutons et une quinzaine de veaux issus de cellules fœtales cultivées, dont trois à l'INRA, sont nés dans le monde. Un seul mouton et une cinquantaine de souris sont issus de noyaux de cellules prélevées sur un animal adulte. Le clonage est donc encore avant tout aujourd'hui une activité de recherche.

Nous allons devoir résoudre des problèmes biologiques nouveaux, comme par exemple ceux liés à la mortalité élevée que nous observons tard pendant la gestation, et parfois bien après la naissance. Les récents résultats acquis chez la souris vont probablement contribuer à une compréhension plus rapide de ce phénomène qui révèle des effets à long terme du clonage. Mais cet aspect, *a priori* négatif, pourrait être riche d'enseignement pour

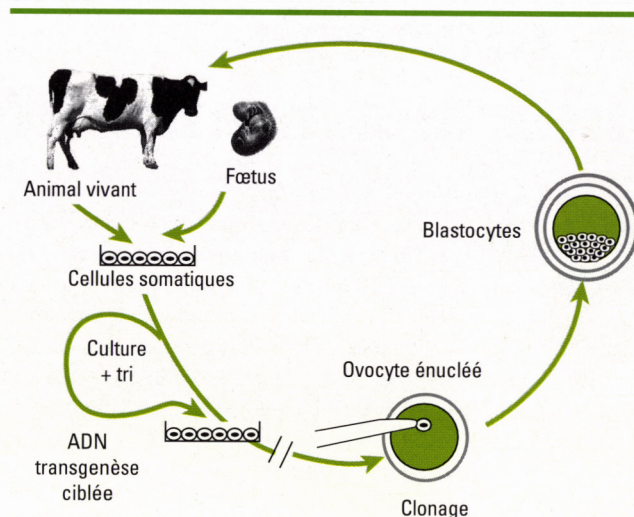


Figure 2. Clonage et transgénèse : une nouvelle combinaison de techniques qui pourrait permettre le façonnage génétique des mammifères domestiques.

des études de base sur les mécanismes de la différenciation et du vieillissement cellulaire.

## Des perspectives d'application nombreuses

Les chercheurs écossais ont aussi mis en pleine lumière une autre face de l'activité scientifique : celle de ses modes de financement. Car sans la firme privée Protein Pharmaceutical Limited, le mouton 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 ! Cette société ainsi que d'autres parient maintenant sur les applications du clonage dont quelques exemples sont présentés dans le *tableau 1*.

Les applications qui concernent l'utilisation des clones comme nouveaux modèles pour la recherche font l'objet de début d'expérimentations notamment pour déterminer la composante génétique de caractères complexes.

Celles qui concernent la sélection ne sont encore que potentielles et n'existeront réellement que lorsque des progrès substantiels auront pu être obtenus dans la maîtrise de la reprogrammation de l'activité du noyau transplanté. Toutefois, des études de modélisation permettent d'ores et déjà d'estimer les bénéfices du clonage en sélection, notamment pour la connaissance de la valeur génétique des reproducteurs, la diffusion de génotypes d'animaux de haute valeur génétique, ou la gestion génétique de populations de petits effectifs.

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 (*figure 2*). Une dizaine de veaux clonés et transgéniques ont vu le jour cette année dans le monde, dont un à l'INRA de Jouy.

Jusqu'à présent, les animaux d'élevage transgéniques étaient obtenus après micro-injection de l'ADN directement dans l'embryon au stade une cellule. Cette approche est aléatoire et ne garantit pas une expression correcte du transgène. Elle a été mise en œuvre pour produire des molécules à forte valeur ajoutée, plus de 150 molécules actuellement dans le monde, principalement à



**Tableau 2. Exemples de projets à court ou moyen terme faisant appel au clonage pour contrôler l'intégration d'un transgène**

Objectif	Exemple	Société	Pays
Production d'anticorps	BR96	Genzyme	États-Unis
Production de peptides	Insuline	Genzyme	États-Unis
Vaccins	Malaria	Genzyme	États-Unis
Nutraceutique (lait de vache)	Inactivation du gène $\beta$ -lactoglobuline	Pharming BV	Pays Bas
	Lipase	Astra Hässle	Suède
Sécurité alimentaire	Inactivation du gène prion	Roslin Inst.	Royaume Uni
Modèle de maladie (mucoviscidose)	Inactivation du gène CFTR	AFLM INRA INSERM	France
	Invalidation du gène $\alpha$ -(1,3) galactosyl-transférase	Roslin Inst.	Royaume Uni

partir du lait de lapine, de brebis, de chèvre ou de vache. C'est le cas par exemple pour le fibrinogène, dont les besoins sont de 150 kg pour un prix de revient au gramme de 6 000 francs environ, et du facteur IX impliqué dans le processus de coagulation du sang, dont le besoin mondial est de l'ordre de seulement 4 kg, mais pour un prix au gramme estimé à 220 000 francs !

Or, le transfert de noyaux transgéniques permet non seulement de disposer d'emblée de quelques exemplaires d'animaux génétiquement modifiés, mais aussi de mieux contrôler, lors de la période de culture, les conditions d'intégrations du transgène qui favorisent son expression.

De très nombreuses données sont maintenant disponibles pour définir des vecteurs ADN permettant d'atteindre cet objectif. On sait aussi, essentiellement à partir des résultats accumulés depuis quinze ans 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 de temps donnée. Mais pour cela, il faut trier les cellules dans lesquelles s'est produite une recombinaison homologue entre l'ADN étranger et le génome hôte. Ceci n'est possible, en pratique, que si l'on peut maintenir les cellules en culture pendant un temps suffisamment long.

Chez la souris, on dispose depuis quinze ans de lignées de cellules de type embryonnaire, les cellules ES, dont le pouvoir de multiplication est élevé. Ce n'est pas le cas avec les espèces domestiques. Nous tentons actuellement de contourner cet obstacle. Mais la compétition est rude, car la protection juridique des innovations contribue à la fois à stimuler les financements, surtout aux États-Unis, et à freiner les échanges scientifiques ! La création, en France, en association avec l'INRA, d'une société spécialisée dans la transgénèse chez les mammifères d'élevage, la société BioProtein Technologies, nous place dans cette compétition.

Le clonage pourrait servir alors d'abord à développer une seconde génération de produits, moins coûteux que dans les exemples précédents. C'est le cas pour l'albumine humaine dont les besoins

mondiaux sont de l'ordre de 400 tonnes par an, mais dont le prix de revient au gramme ne devrait pas excéder 25 francs.

Mais surtout, cette approche sera utilisée pour remplacer des gènes par des variants (allèles) plus performants ou procéder à l'inactivation (invalidation) sélective de ceux qui se révèlent délétères (tableau 2). Produire du lait dont la composition emprunte les qualités d'autres espèces, modifier les formes musculaires, inactiver le gène responsable de la présence du prion, augmenter le pouvoir de résistance à des agents pathogènes, rendre compatibles les tissus animaux et humains pour des greffes d'organes (xénotransplantations) ou des thérapies cellulaires, autant de projets actuellement en chantier de par le monde. Le seul intérêt de quelques-uns ou... la fantaisie suffisent-ils à alors décider des choix ?

## Conclusion : de l'animal à l'homme ?

Les données que nous venons de présenter montrent que, sans avoir à interdire le clonage animal, son encadrement est nécessaire : tant pour prévenir toute dérive chez l'homme que pour protéger les animaux eux-mêmes.

Les aléas inhérents à 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 condamnent à eux seuls, déjà sur le seul plan scientifique, toute tentative de clonage reproductif dans notre propre espèce.

Cette considération ne vaut pas pour les espèces animales compte tenu des succès et apports du clonage. Toutefois, les perspectives offertes par les mutagenèses contrôlées pourraient donner à l'homme un pouvoir sur les animaux domestiques plus large 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. 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. Nous tous, chercheurs et agronomes de cette assemblée, sommes je le crois concernés.

## Contrepoints *Agricultures*

### Vos réactions !

Chers lecteurs, nous attendons vos questions et commentaires sur les sujets abordés dans cette rubrique. N'hésitez pas à nous écrire. Nous ouvrirons, dès que vos lettres seront nombreuses, une rubrique « Courrier des lecteurs ».

### Adressez vos lettres à l'adresse suivante :

**John Libbey Eurotext, Cahiers Agricultures,**  
127, avenue de la République, 92120 Montrouge, France.

### Forum de discussion sur Internet

Réagissez autour des « Contrepoints Agricultures » : connectez-vous au site

**[www.refer.org/cahiers-agricultures](http://www.refer.org/cahiers-agricultures)**