

Rappelons le principe de l'émission stimulée. Quand n photons occupent un état excité, la probabilité pour qu'un nouveau photon rejoigne cet état est multipliée par n . Donc, plus il y a de photons déjà excités, plus la probabilité d'exciter un photon supplémentaire est grande. La probabilité d'exciter n photons obéit à la loi statistique de Poisson.

Si l'on applique le principe de l'émission stimulée à la vibration des noyaux atomiques, la probabilité d'exciter le deuxième phonon vaut donc deux fois la probabilité d'exciter le premier. Or, d'après les mesures expérimentales, elle vaut, non pas deux, mais quatre fois la probabilité d'exciter le premier phonon! Cette excitation superstimulée est restée un mystère pendant plusieurs années.

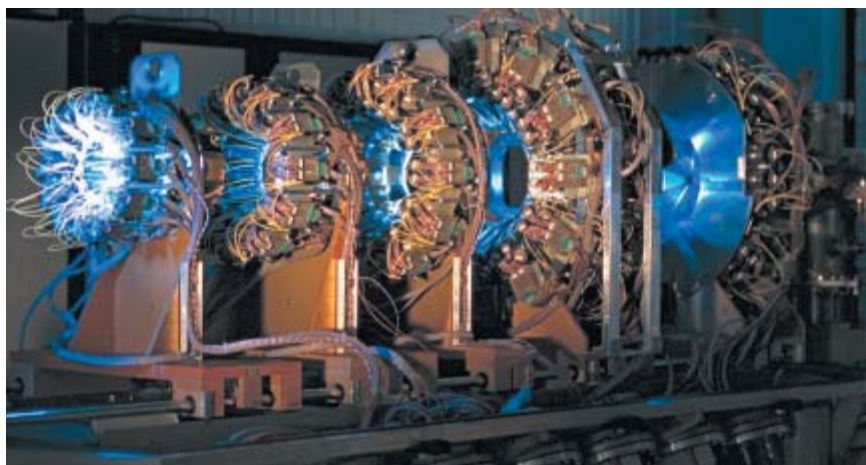
Des superstimulations

Ce mystère vient d'être résolu par les physiciens du GANIL et leurs collègues de Séville, en Espagne, et de Catane, en Italie.

Le calcul quantique de l'évolution d'un oscillateur harmonique, auquel on applique une force, est connu. La solution correspond à une transformation galiléenne de l'état fondamental, c'est-à-dire que le paquet d'onde initial – le nuage de probabilité de présence – est simplement déplacé lors de la résonance, mais sa forme reste inchangée. Cet état correspond à l'excitation des phonons avec des probabilités poissonniennes. Le nombre moyen de phonons excités est proportionnel au déplacement du nuage, induit par la force. En clair, plus on excite, plus le nuage est déplacé, et plus les phonons sont nombreux.

Les valeurs moyennes de position et d'impulsion obéissent à des équations, dites équations d'Ehrenfest, identiques aux équations classiques du mouvement. C'est l'un des rares cas où, à cause de la symétrie de l'oscillateur, la mécanique classique et la mécanique quantique sont équivalentes. L'existence de la loi de Poisson est caractéristique de cette équivalence.

Dans le cas des résonances géantes, la position serait une mesure de la déformation, et l'impulsion représenterait la vitesse de la déformation. Or, les résonances géantes n'obéissent pas à la loi de Poisson, puisqu'expérimentalement, la probabilité d'excitation du deuxième phonon est deux fois plus élevée que celle calculée d'après



8. LE SYSTÈME INDRA détecte les protons et toutes les particules chargées.

cette loi (superstimulations). Le modèle des oscillateurs harmoniques quantiques se révèle insuffisant. La résonance géante n'est donc pas un oscillateur harmonique pur.

Nous avons introduit des anharmonicités dans le modèle de l'oscillateur. Dès lors, la solution quantique diffère de la solution classique. La simple translation en position et en vitesse de l'état fondamental n'est plus une solution exacte. Le paquet d'onde s'élargit et change d'allure pendant son mouvement. Pour déterminer la dynamique exacte, il faut alors non seulement connaître l'évolution de la valeur moyenne de la position et de l'impulsion, mais aussi celle de la forme du paquet d'onde. Ce point constitue la grande révolution de la mécanique quantique : imposer de décrire le mouvement d'une particule, non seulement par la valeur moyenne de sa position et de son impulsion, mais aussi par la forme de l'onde associée.

La largeur du paquet d'onde provient des fluctuations quantiques. Elle augmente en présence d'anharmonicités et modifie la probabilité d'excitation. Si le champ externe est en outre non linéaire, c'est-à-dire si sa force dépend du nombre de phonons déjà excités, alors la probabilité d'exciter des états à deux phonons augmente. Le modèle que nous avons élaboré justifie que la probabilité d'exciter le deuxième phonon vaut quatre fois la probabilité d'exciter le premier, à cause des fluctuations quantiques et des non-linéarités.

Toutefois, pour valider ce modèle, nous venons de commencer au GANIL une campagne de mesures qui vise à détecter le troisième phonon d'un noyau de calcium excité, grâce à l'un des détecteurs de particules chargées les plus performants aujourd'hui (voir l'encadré de la page 37). Nous découvrirons si la vibration demeure harmonique et si l'émission superstimulée est encore plus forte.

Philippe CHOMAZ, Yorick BLUMENFELD et Jean-Antoine SCARPACI sont chercheurs respectivement au GANIL (Grand accélérateur national d'ions lourds), laboratoire CEA-DSM, CNRS IN2P3, à Caen, et à l'Institut de physique nucléaire, à Orsay.

C. VOLPE et Ph. CHOMAZ, *Multiple Collective Vibrations and Nonlinear Dynamics in Mean-Field Approaches*, in *Physical Review Letters*, vol. 83, p. 1119, 1999.

T. AUMANN, P.F. BORTIGNON et H. EMLING, *Multiphonon Giant Resonances in Nuclei*, in *Annu. Rev. Nucl. Part. Sci.*, vol. 48, 1998.

J. RITMAN et al., *First Observation of the Coulomb-excited Double Giant Dipole Resonance in ^{208}Pb via Double-gamma Decay*,

in *Physical Review Letters*, vol. 70, p. 533, 1993.

J.-A. SCARPACI et al., *Signature of a Two-phonon State Through its Proton Decay Pattern*, in *Physical Review Letters*, vol. 71, p. 3766, 1993.

R. SCHMIDT et al., *Electromagnetic excitation of the double giant dipole resonance in ^{136}Xe* , in *Physical Review Letters*, vol. 70, pp. 1767-1770, 1993.

S. MORDECHAI et F. MOORE, *Double Giant Resonances in Atomic Nuclei*, in *Nature*, vol. 352, p. 393, 1991.

Ph. CHOMAZ et N. FRASCARIA, *Multiple phonon excitation in nuclei : experimental results and theoretical description*, in *Physical Report*, vol. 252, n° 5 et 6, 1995.

Le clonage : état de l'art

JEAN-PAUL RENARD • XAVIER VIGNON

Objet de curiosité ou source d'inquiétude, le clonage animal par reprogrammation d'une cellule adulte est un outil que les biologistes maîtrisent de mieux en mieux, mais le taux de réussite reste faible.

En 1997, le clonage, c'est-à-dire la multiplication d'embryons génétiquement identiques sans recours à une fécondation, fait une entrée fracassante : c'est la naissance de Dolly, une brebis clonée. Pourquoi Dolly a-t-elle suscité tant de débats, alors que le clonage existe depuis les années 1950 ? Parce que Dolly est issue de la fusion d'un ovule, ou ovocyte, dont on a retiré le noyau, et du noyau d'une cellule adulte prélevée sur sa sœur-mère ; auparavant, le clonage s'effectuait par scission d'un embryon composé de deux cellules, ou par division d'embryons plus tardifs. Dolly innovait, car, jusqu'à elle, on pensait qu'un noyau de cellule adulte ne pouvait être remis dans un état embryonnaire ou « reprogrammé » pour s'engager dans un cycle de divisions aboutissant à la production d'un embryon, puis d'un jeune viable. En d'autres termes, pour le clonage, le noyau d'une cellule spécialisée (une cellule de peau, un globule blanc...) sert à former une cellule dite totipotente, c'est-à-dire capable de produire tous les types cellulaires d'un organisme.

Aujourd'hui, le clonage est appliqué chez un nombre croissant d'espèces animales : pour ce faire, on retire le matériel génétique d'un ovocyte prêt à être fécondé, ou d'un œuf en tout début de développement, et on le remplace par le matériel génétique d'une cellule prélevée sur l'animal à cloner. L'œuf composite commence à se diviser ; il est implanté dans l'utérus d'une mère porteuse, où il se développe comme un embryon normal, donnant un fœtus, puis un jeune animal.

Initialement développée chez les amphibiens, cette technique est depuis quelques dizaines d'années appliquée aux mammifères. En étu-

diant la transplantation des noyaux, les biologistes du développement ont précisé les événements qui se produisent lorsque le noyau d'une cellule plus ou moins spécialisée est reprogrammé pour induire un développement embryonnaire.

L'attrait de l'utilisation d'un autre type de cellules donneuses que les cellules embryonnaires dans les expériences de transfert de noyau ne se limite pas à la biologie du développement et à la compréhension des phénomènes de différenciation ou de vieillissement : on peut modifier l'information génétique contenue dans ces noyaux pour donner naissance, par une technique de transgénèse, à des animaux génétiquement modifiés.

Depuis Dolly, on a réussi le clonage à partir de cellules différenciées de quatre autres espèces de mammifères : la souris, la chèvre, la vache et le porc. Simultanément, on a constaté que les animaux clonés ont un développement fœtal et prénatal souvent anormal. Chez d'autres animaux, tels le lapin, le rat, le chien ou le singe, aucune naissance n'a encore été obtenue par transfert de noyau de cellule différenciée.

Ces résultats montrent que, malgré des progrès techniques tangibles, le clonage par transfert de noyau a des limites que nous allons détailler et qui

ne seront, sinon repoussées, du moins expliquées qu'après de nouvelles recherches.

Le développement embryonnaire précoce est d'abord commandé par des facteurs cytoplasmiques maternels, puis, après un temps propre à chaque espèce, par l'expression des gènes de l'embryon lui-même : l'information génétique contenue dans le noyau des cellules donneuses, initialement spécialisées, est utilisée pour contrôler le développement du nouvel embryon. Pour que les différentes étapes aient lieu, le noyau doit retrouver son état de noyau embryonnaire : on dit qu'il est reprogrammé

La reprogrammation du génome

Les changements observés dans le noyau donneur après la reconstitution des embryons indiquent qu'il réagit à son nouvel environnement cytoplasmique. Par exemple, une fois greffé dans un ovocyte énucléé, la taille du noyau augmente et son enveloppe se modifie ; les histones, les protéines responsables du repliement de l'ADN se déplacent ; la transcription (la copie de l'ADN en ARN) s'interrompt.

Ainsi, des changements dans les noyaux donneurs avant le transfert, ou les caractéristiques mêmes de ces noyaux (les types de cellules dont ils sont issus et les stades du cycle cellulaire dans lesquels ils sont au moment du transfert), conditionnent le déroulement de ces transformations. Les caractéristiques des ovocytes receveurs sont aussi importantes que celles des noyaux donneurs.

Les ovocytes résultent d'une double division cellulaire, nommée méiose, de cellules germinales, qui divise par deux le nombre de chromosomes des cellules. Pendant cette



Q. Zhou, INRA, Jouy-en-Josas

1. CES DEUX SOURIS sont des clones obtenus à l'INRA de Jouy-en-Josas à partir d'ovocytes et de cellules adultes.

division, qui se déroule au sein d'une coque protectrice, la zone pellucide, un ovocyte se forme, ainsi que deux globules polaires. Ces derniers, qui renferment des chromosomes surnuméraires, sont éliminés à la fin de la méiose (voir la figure 3).

Les ovocytes pris au stade de la deuxième métaphase, l'une des phases de la méiose, sont les plus favorables au clonage par transfert de noyau. Ils proviennent d'ovaires prélevés sur des animaux, d'origine et d'âge variables, et deviennent matures *in vivo*, ou après culture *in vitro* au laboratoire, selon les espèces. Les conditions de maturation sont mieux connues pour certaines espèces (vache, mouton) que pour d'autres (porc, chien). L'énucléation est pratiquée par micro-aspiration de l'ensemble des chromosomes, qui sont rassemblés en une plaque dite métaphasique, et du globule polaire. Ces manipulations influent sur la réussite du clonage, car elles modifient parfois le cytoplasme receveur, en l'activant plus rapidement.

Un bon ovocyte

Cette activation entraîne l'ensemble des processus biochimiques qui reproduisent les événements liés à la fécondation. Grâce à des oscillations de la concentration cytoplasmique en cal-

cium, l'activité du facteur nommé MPF (pour *Maturation Promoting Factor*), qui bloque les ovocytes au niveau de la deuxième métaphase est diminuée : les ovocytes évoluent ainsi vers un état interphasique propice au développement. Le facteur MPF est un complexe protéique qui, une fois activé par une kinase (une enzyme qui apporte un groupement phosphate), entraîne la dissolution de l'enveloppe du noyau et la condensation des chromosomes. Dans la plupart des cas, le noyau donneur est transféré dans le cytoplasme receveur par une fusion de la cellule donneuse avec l'ovocyte. Cette fusion est aisément obtenue par une très brève impulsion électrique. Le noyau peut aussi être directement injecté dans le cytoplasme.

La brève stimulation électrique contribue à l'activation de l'ovocyte receveur, surtout lorsqu'il est dans un état proche de l'interphase. Cependant, quand l'ovocyte receveur est en métaphase II, ou que l'on injecte le noyau, ces stimulations électriques sur l'ovocyte sont insuffisantes pour le développement embryonnaire : on recourt alors à une incubation de l'ovocyte en présence d'inhibiteur de phosphorylation ou d'inhibiteur de la synthèse protéique après le transfert du noyau ; ces inhibiteurs participent à l'activation, car ils évitent que l'activité du MPF n'augmente.

Pour le clonage, on utilise des impulsions électriques qui déclenchent des flux intracellulaires de calcium dont les variations participent au développement de l'embryon ; on peut aussi avoir recours à des composés chimiques qui inactivent le MPF, mais la totale innocuité de la procédure sur le développement ultérieur n'est pas démontrée. Outre la qualité de l'ovocyte, et les techniques de stimulation qui jouent un rôle important dans le développement de l'embryon, le clonage dépend des cellules donneuses.

Celles-ci proviennent de cellules en culture ou sont prélevées sur un tissu vivant. Selon l'application envisagée, elles sont des fibroblastes fœtaux (ces cellules peu différenciées sont à l'origine du tissu conjonctif) ou des cellules de tissus adultes, où différents stades de différenciation coexistent. Les seuls essais de clonage à partir de cellules complètement différenciées ont été effectués, sans succès à ce jour, sur la souris, avec des cellules nerveuses et des cellules de Sertoli adultes (des cellules des testicules). De même, chez la vache, nous n'avons pas obtenu de gestation à terme en utilisant, comme cellules donneuses de noyaux, des kératinocytes de l'épiderme. En revanche, les cellules prises dans un tissu en croissance, fœtal ou adulte, et dont



2. CES VACHES sont toutes des clones. Elles ont été obtenues à l'INRA de Jouy-en-Josas. Les six veaux (à droite) sont tous issus de cellules cultivées après le prélèvement d'une biopsie sur l'oreille de l'une des trois grandes vaches (la troisième à partir de la gauche), qui sont elles mêmes des clones.

Bertrand Nicolas, INRA, Jouy-en-Josas

une partie est encore peu différenciée, donne des animaux viables.

Dans la plupart des tissus biologiques, différents stades de différenciation cellulaire coexistent, mais on ne peut les distinguer : on ne peut donc prouver qu'un animal cloné résulte de l'usage d'un type donné de cellule différenciée. Cependant, les cellules complètement différenciées de granulosa (ces cellules entourent les ovocytes, dans les ovaires) sont aisément identifiables : le succès de leur utilisation dans des expériences de clonage chez la vache et chez la souris montrent donc bien que des noyaux de cellules différenciées redeviennent parfois totipotents. Ainsi, les résultats obtenus chez plusieurs espèces de mammifères (voir la figure 6) montrent que l'efficacité du clonage dépend peu de l'état de dif-

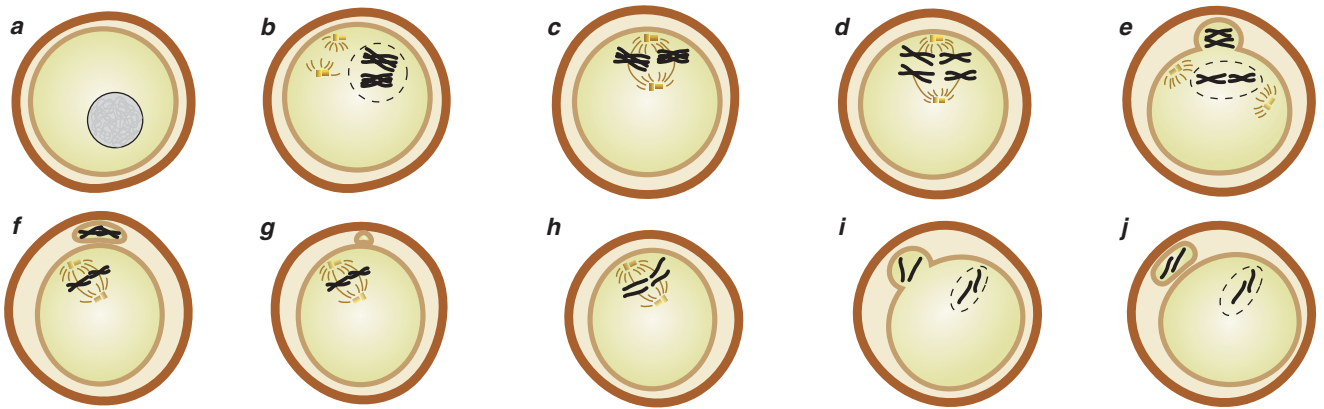
férenciation des cellules : les cellules germinales (qui sont les cellules souches des gamètes) ne sont pas plus favorables que les fibroblastes de la peau d'animaux adultes. De surcroît, nous avons montré, au laboratoire chez la souris, que l'efficacité du clonage n'est guère améliorée avec des cellules souches embryonnaires.

Cette variabilité des types cellulaires à l'origine d'animaux viables témoigne de l'importante plasticité du noyau des cellules engagées dans une voie de différenciation et permet d'imaginer le clonage à partir de cellules de tissus abondants et facilement accessibles, tels la peau ou le sang. Cependant, si de nombreux animaux ont été obtenus à partir de fibroblastes, un seul, un bovin, a été obtenu à partir d'une cellule sanguine, un globule

blanc. Ce résultat, par ailleurs étonnant puisqu'il pose la question de la réversibilité du réarrangement des gènes des immunoglobulines, requiert une confirmation.

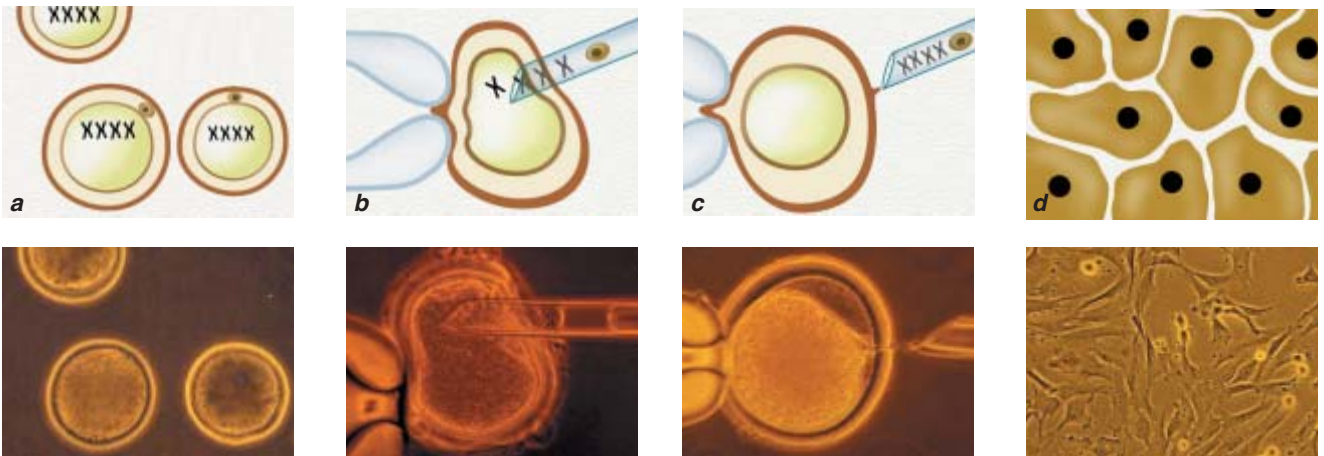
Et plus si affinités...

La plupart des travaux utilisent des fibroblastes mis en culture pendant plusieurs semaines et le plus souvent stockés à l'état congelé après une dizaine de jours environ. Le maintien de ces cultures pendant plusieurs mois, jusqu'à l'entrée des cellules en sénescence, ne compromet pas l'aptitude des noyaux à être reprogrammés : celle-ci ne dépend pas du temps de culture *in vitro* des cellules. Nous avons obtenu des bovins viables avec des cellules proches de la sénescence.



3. LA MÉIOSE se déroule en deux cycles, à l'issue desquels le nombre de chromosomes d'un ovocyte est divisé par deux. L'ovocyte est entouré d'une zone de protection dite *pellucide* (en marron). Dans un ovocyte en interphase (a), après avoir été dupliqué, l'ADN du noyau se condense en tétrades, c'est-à-dire que les chromosomes sont en paires et dédoublés (b). Lors de la première métaphase (c), ces tétrades se rassemblent sur le plan équatorial avant d'être séparées par le rétrécissement de microtubules

pendant la première anaphase (d). La cellule se coupe alors en deux de façon asymétrique (e) et entraîne la formation d'un premier globule polaire (f) qui contient la moitié des chromosomes dédoublés. L'ovocyte est en deuxième métaphase (g). Après activation ou fécondation, les microtubules séparent ensuite les chromosomes dédoublés (h) et un second globule polaire se forme lorsque l'ovocyte se scinde (i). Ce globule polaire reste au sein de la zone pellucide (j), puis dégénère.



4. L'OBTENTION D'UN CLONE nécessite diverses manipulations illustrées ici par des schémas (en haut) et les photographies correspondantes (en bas). On prélève un ovocyte « receveur » et une cellule « donneuse » de matériel génétique, par exemple, une cellule de peau

nommée fibroblaste. On stimule la maturation des ovocytes receveurs dans un milieu de culture jusqu'à l'entrée en métaphase II (a). Puis, le globule polaire et les chromosomes de l'ovule sont aspirés à l'aide d'une micropipette tandis qu'une pipette maintient l'ovocyte immo-

Chez le bovin, l'âge du donneur ne semble pas non plus influencer sur le développement des embryons obtenus : des taureaux âgés de 17 et 21 ans ont été clonés avec succès. De plus, aucun animal produit par transfert de noyau et vivant à l'heure actuelle ne présente de signe apparent de vieillissement, quel que soit le type de cellule dont il est issu : ainsi, les phénomènes d'érosion des télomères (l'extrémité des chromosomes) qui accompagnent le vieillissement biologique des cellules ne semblent pas être accélérés chez les animaux issus d'un clonage. Des études chez le bovin, ont montré qu'à l'inverse de chez Dolly, les télomères des clones n'étaient pas plus courts que ceux des animaux normaux.

Quand on transplante un noyau dans un ovocyte, l'activité élevée du MPF entraîne la dissolution de la membrane nucléaire et la condensation des chromosomes. Au moment de l'activation de l'ovocyte, l'activité du MPF chute et la membrane du noyau se reforme, puis la synthèse de l'ADN commence (voir la figure 5). Dès lors, si le noyau utilisé n'était pas diploïde (les chromosomes sont en paires) au moment de la transplantation, l'embryon aurait un nombre de chromosomes anormal. Il convient donc d'utiliser des cellules donneuses diploïdes avec les cytoplasmes en «métaphase». On peut alors transplanter un noyau, soit avant la réplification de l'ADN dans un cytoplasme en métaphase II, soit à n'importe quel moment de l'interphase dans un cytoplasme lui-même en interphase. Le noyau poursuivra son cycle sans perdre

son enveloppe et sans qu'il n'y ait condensation de ses chromosomes.

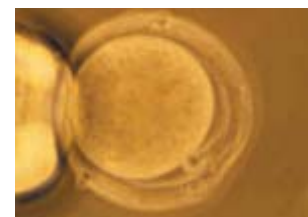
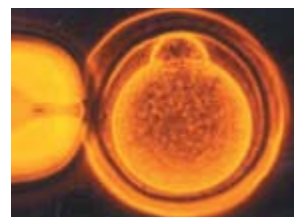
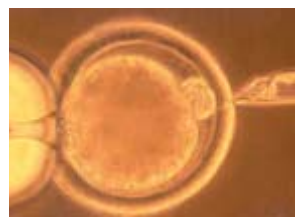
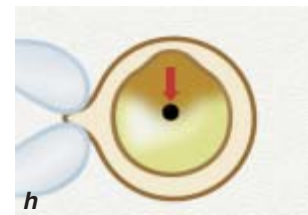
Cependant, la reprise du cycle cellulaire dans l'embryon est en principe suivie de l'expulsion du dernier globule polaire contenant un lot complet de chromosomes. Cette phase d'expulsion, qui est aléatoire chez la plupart des espèces dans les conditions expérimentales utilisées, peut être évitée par incubation de l'embryon en présence de cytochalasine, une molécule qui inhibe la polymérisation des microfilaments au cours de la période d'activation. Cette expulsion peut aussi être utilisée pour éliminer la moitié des chromosomes de sorte que le noyau résultant sera diploïde. C'est le cas chez la souris où l'expulsion d'un globule polaire, après l'activation, fournit des embryons ayant un nombre de chromosomes normal après transfert de noyaux en métaphase (tétraploïdes), dans des ovocytes eux-mêmes en métaphase II.

Ainsi, les premiers mammifères clonés à partir de cellules somatiques l'ont été avec des cellules quiescentes après une période de culture en milieu appauvri : l'ADN de ces cellules qui ne se divisent pas n'est pas dupliqué ; la diploïdie est respectée. Toutefois, des expériences effectuées chez la souris avec des noyaux en métaphase, ou chez le bovin avec des noyaux non synchronisés, indiquent que cet état du noyau donneur n'est pas le seul qui soit compatible avec l'obtention d'un développement à terme. Par exemple, chez le bovin, nos études indiquent que l'état de quiescence des cellules donneuses n'est pas requis pour le développement des embryons clonés.

Plus que la phase du cycle dans laquelle se trouve le noyau, l'état de la chromatine du noyau serait déterminant dans les mécanismes de reprogrammation. Des noyaux de globules rouges d'amphibiens, dont l'ADN est empaqueté sous une forme inactive typique d'une cellule totalement différenciée, sont activés après un remodelage dans des extraits d'œuf de crapaud et après un traitement biochimique qui facilite les échanges entre le noyau et son environnement. Par une approche similaire, chez le bovin, nous avons amélioré sensiblement le développement *in vitro* d'embryons clonés en prétraitant le noyau donneur avant de le transférer dans un ovocyte en interphase, de façon à ce que son ADN puisse être plus rapidement et plus longuement accessible aux facteurs ovocytaires.

Les limites du clonage

Par ailleurs, on a récemment réussi le clonage somatique du porc grâce à une méthode en deux étapes : le noyau est remodelé dans un ovocyte en métaphase, puis, quand il s'est convenablement transformé, il est transféré dans un ovule fécondé dont on a supprimé le noyau. Aujourd'hui, le perfectionnement du clonage passe par la compréhension des remodelages de la chromatine et des chromosomes d'un noyau introduit dans un cytoplasme embryonnaire : l'activité du génome doit bien être reprogrammée pour qu'il fonctionne comme un génome embryonnaire. Il n'est pas sûr toutefois que cette reprogrammation implique une «remise à zéro» complète.



bile (b) : il ne reste alors plus que le cytoplasme à l'intérieur de la zone pellucide (c). Un fibroblaste (d) est aspiré dans la micropipette, et injecté sous la zone pellucide (e) : il s'accroche à la membrane de l'ovocyte (f). Après l'injection, le couple ovocyte-fibroblaste est sou-

mis à un choc électrique (g) qui facilite la fusion de la cellule donneuse et de l'ovocyte énucléé (h). Le noyau du fibroblaste, avec tous ses gènes, pénètre dans le cytoplasme de l'ovule. En quelques heures, la cellule qui a fusionné commence à se diviser.

Selon les méthodes employées et les espèces, un à deux tiers des embryons clonés avec des cellules somatiques se développent jusqu'au stade blastula quand apparaissent les premières différenciations cellulaires. Ce résultat est encourageant lorsqu'il est comparé aux proportions d'embryons issus de fécondation *in vitro* qui atteignent ce stade (en moyenne 60 pour cent chez la vache). Cependant, la seule preuve d'une reprogrammation complète reste le développement complet et normal d'un animal viable et fertile. À cet égard, bien qu'étant de plus en plus utilisé, le clonage a toujours une efficacité faible : de un à quatre pour cent seulement des embryons reconstitués avec des noyaux de cellules somatiques se développent à terme. Alors que les réussites d'implantation des embryons clonés transplantés sur une mère porteuse sont équivalentes à celles d'embryons non clonés, une majorité des pertes fœtales chez les moutons et chez les bovins a lieu au cours du premier tiers de la gestation, et avant la mi-gestation chez la souris.

Cette mortalité précoce est souvent associée à des anomalies du placenta. De surcroît, la mortalité tardive, lors du dernier tiers de la gestation ou après la naissance atteint parfois 50 pour cent. Les animaux ont alors une taille excessive, des organes, tels le foie, le cœur, les reins hypertrophiés, et sont quelquefois sujets à des détresses respiratoires, des troubles du rythme cardiaque ou des déficits immunitaires à la naissance.

On ignore la cause de cette surmortalité, mais elle prouve bien qu'on est loin de maîtriser la reprise de l'activité génétique. Ces échecs témoignent du manque de connaissances sur les mécanismes mis en jeu lors du clonage. Plutôt que de multiplier les naissances d'animaux obtenus par clonage somatique, les biologistes se concentrent aujourd'hui sur les phases clés de la reprogrammation d'un noyau de cellule différenciée en un noyau embryonnaire totipotent.

Les animaux de ferme sont de bons modèles expérimentaux pour l'analyse des anomalies du développement fœtal, car leur gestation est longue (neuf mois chez la vache). Certaines des anomalies du développement mentionnées précédemment sont aussi observées chez les embryons issus d'une fécondation *in vitro*. Décrits sous le terme de «syndrome du gros veau», ces anomalies semblent résulter d'une expression anormale de certains gènes dont le fonctionnement diffère selon qu'ils ont été apportés par le père ou par la mère, tel celui d'un facteur de croissance (on parle de gènes soumis à l'empreinte parentale). Elles proviennent aussi parfois des conditions de cultures *in vitro* qui précèdent la transplantation de l'embryon sur une mère porteuse. Ce résultat montre bien que, dès la fécondation, le développement résulte d'interactions entre l'activité du noyau et l'action du milieu environnant, nommée épigénèse.

Les données sur les animaux clonés sont rares, mais les effets à long terme rencontrés dans le cas du clo-

nage somatique ne sont sans doute que partiellement liés à des défauts d'empreinte parentale, car les anomalies diffèrent de celles observées après altération expérimentale de cette empreinte, chez la souris.

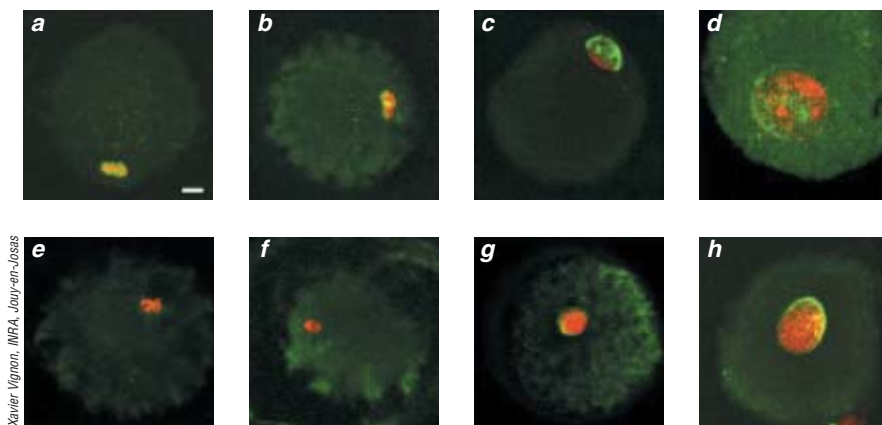
D'autres facteurs épigénétiques, telles des perturbations au moment de la reconstitution de l'embryon par la procédure de transfert de noyau (l'activation de l'ovocyte receveur), ou bien la mauvaise synchronisation entre le développement du fœtus cloné et son environnement utérin, pourraient également perturber à long terme le développement embryonnaire et fœtal.

La transgénèse

Lorsque ces inconvénients seront surmontés, le clonage de jeunes animaux à partir de cellules en culture sera complété par l'insertion d'un gène dans le noyau de ces cellules avant de les utiliser pour le clonage : les animaux ainsi génétiquement modifiés par transfert de noyau seront utiles pour la recherche ou pour l'obtention de protéines à usage thérapeutique. Un premier exemple est celui de moutons qui fabriquent un facteur de coagulation humain.

La technique classique d'obtention d'animaux transgéniques est la micro-injection d'ADN dans le noyau des embryons au stade de cellule unique. Largement utilisée ces dernières années pour la production de molécules thérapeutiques chez plusieurs espèces de mammifères domestiques, l'efficacité de cette méthode est cependant très variable. Chez plusieurs espèces dont la vache, jusqu'à 2 000 embryons sont nécessaires à l'obtention d'un veau transgénique, tandis que moins d'une centaine suffit par la voie du clonage.

En outre, la modification génétique de noyaux de cellules donneuses pendant une période de culture prolongée permet de cibler l'insertion d'un transgène ou de modifier précisément un gène. Pour cela, la construction moléculaire introduite contient des séquences d'ADN qui s'insèrent dans le gène endogène et le remplace. On effectue ainsi une transgénèse «propre» dans laquelle un gène peut être remplacé par un de ses variants naturels, ou inactivé. Ce type de modification est aujourd'hui à l'étude dans plusieurs laboratoires pour modifier finement certaines caractéristiques de production, telle la qualité du lait.



Xavier Vignon, INRA, Jouy-en-Josas

5. LE TRANSFERT D'UN NOYAU (la tache brillante) diffère selon que l'ovocyte (la forme arrondie sombre) est en interphase (en haut) ou en métaphase (en bas). Dans le premier cas, l'enveloppe nucléaire (en vert) est maintenue durant toutes les phases qui suivent la fusion avec l'ovocyte (de a à d). Dans le second cas, l'enveloppe nucléaire se dissout (e et f) après la fusion, puis se reconstitue (g et h) autour de la chromatine (en rouge). Le noyau commencera un nouveau cycle de division lorsque l'enveloppe nucléaire sera complète (la barre blanche représente dix micromètres).

L'inactivation d'un gène constitue un objectif important pour les industries pharmaceutiques qui utilisent des modèles animaux pour les pathologies humaines, et particulièrement pour les essais de thérapie génique. Par exemple, des lapins ou des moutons dont on aurait muté le gène impliqué dans la mucoviscidose seraient de bien meilleurs modèles de cette maladie humaine que la souris, puisque l'on pourrait expérimenter des approches thérapeutiques, telles des bronchoscopies, sur ces animaux de plus grande taille.

La naissance récente de moutons transgéniques issus du transfert de noyaux de fibroblastes dans lesquels un gène du procollagène (une protéine de soutien des tissus) a été inactivé est un premier

succès qui préfigure les applications de l'association entre le clonage et la transgénèse. Ces applications pourraient être étendues au porc.

Quels que soient les objectifs recherchés, la culture des cellules donneuses de noyaux est une étape importante de la technique associant clonage et transgénèse

De l'animal à l'homme?

L'intégration d'un fragment d'ADN exogène. Celle-ci est meilleure quand les cellules sont en division rapide, ce qui n'est plus le cas pour des cellules en présénescence. L'obtention de lignées de cellules embryonnaires, qui sont stables et se divisent rapidement pendant plusieurs mois de culture constitue l'une des voies qui aboutira à l'utilisation de la transgénèse chez les mammifères domestiques. Leur durée de vie serait suffisante pour effectuer toutes les étapes de la transgénèse.

«L'horreur du clone!» Ce cri et cette mise en garde du philosophe allemand Jünger Habermas à l'annonce de la naissance de Dolly traduit bien la réaction générale face à l'idée que le clonage puisse être un jour appliqué à l'être humain. Dès le 11 novembre 1997, dans une Déclaration universelle sur le génome humain, l'UNESCO a affirmé que «des

ESPÈCE ET TYPE DE CELLULES	JEUNES VIVANTS/ EMBRYONS TRANSPLANTÉS	EFFICACITÉ GLOBALE
OVINS Fibroblastes fœtaux génétiquement modifiés	7/67	1,4
BOVINS Cellules de peau d'adulte	9/191	1,6
SOURIS Cellules de follicule ovarien	8/287	1,5
CHÈVRES Cellules de fœtus transgénique	3/112	1,9
PORCS Fibroblastes fœtaux	1/110	0,2

6. CE TABLEAU récapitule, pour chaque espèce, les types de cellules «donneuses» de matériel génétique qui se sont révélées efficaces pour un clonage. L'efficacité globale rend compte de la proportion d'ovocytes qui, après un transfert de noyau, ont donné un jeune vivant après l'étape intermédiaire de la transplantation d'un embryon.

pratiques qui sont contraires à la dignité humaine, tel le clonage à des fins de reproduction, ne doivent pas être permises». Cet interdit est aujourd'hui toujours largement partagé, et même la très libérale *Société américaine pour la médecine reproductive* a reconnu que, s'il existait parfois de bonnes raisons pour recourir au clonage humain à des fins reproductives, aucun argument ne justifie son utilisation généralisée. Le clonage se présente donc comme une technique encadrée avant même d'être sortie des laboratoires. Son histoire montrera peut-être que cette technique a marqué une étape, dans l'accompagnement par la société, des progrès scientifiques dès leurs émergences.

Les peurs de voir un jour des bandes de «copies conformes» menacer la diversité biologique des espèces laissent place à des perspectives plus apaisées sur les apports de cette technique : par exemple, la création de modèles d'étude des maladies humaines ou de producteurs biologiques pour assurer, à partir d'un produit de sécrétion naturel, tel le lait, la synthèse de molécules complexes, tels des anticorps, à usages thérapeutiques.

Par ailleurs, le clonage aiderait au maintien des espèces menacées, tel le Gaur (*Bos gaurus*), ou qui ont déjà dis-

paru, telles les chèvres Bucardo, en Espagne (voir l'article de Robert Lanza, Betsy Dresser et Philip Damiani, pages 46 à 49).

Enfin, cette technique permettrait d'utiliser les cellules donneuses de noyaux pour effectuer des microchirurgies très fines, par exemple, pour remplacer, au sein de la même espèce, un gène par un de ses variants : les résultats seraient identiques à ceux d'une sélection classique de ces animaux par des croisements sur plusieurs générations, mais seraient beaucoup plus rapides.

Ces promesses sont-elles des menaces sur l'équilibre qui régit de longue date les relations entre l'homme et l'animal? Parce que le clonage pourrait nous donner un nouveau pouvoir de façonnage des races domestiques, voire des espèces sauvages, une cla-

rification de nos représentations de l'animalité s'impose pour éclairer les décisions concernant l'application du clonage à l'homme.

Jean-Paul RENARD et Xavier VIGNON sont biologistes à l'Unité de biologie du développement et biotechnologies, INRA, Jouy-en-Josas.

X. VIGNON, P. CHESNÉ, D. LE BOURHIS, J.E. FLÉCHON, Y. HEYMAN et J.-P. RENARD, *Aptitude au développement des embryons bovins reconstruits par fusion de cellules somatiques cultivées avec des ovocytes énucléés. Clonage somatique chez les bovins*, in *Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, n° 321, pp. 735-745, 1998.

J.-P. RENARD, S. CHASTANT, P. CHESNÉ, C. RICHARD, J. MARCHAL, N. CORDONNIER, P. CHAVATTE et X. VIGNON, *Lymphoid Hypoplasia Induced by Somatic Cloning*, in *The Lancet*, n° 353, pp. 1489-1491, 1999.

J.-P. RENARD, *Dans le labyrinthe, in Faut-il vraiment cloner l'homme?*, collection Forum Diderot, PUF, 1998.

J.-P. RENARD, *Clonage : les bases du débat*, in *Clonage et éthique, La Revue de la CFDT*, n° 14, pp. 3-18, 1998.

J.-P. RENARD, *Transfert de noyaux et différenciation cellulaire : l'apport du clonage à l'étude des cellules souches embryonnaires*, in *Bull. Acad. Nat. Méd.*, vol. 184, n° 6, pp. 1155-1168, 2000.