

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