

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.

Bernard 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-

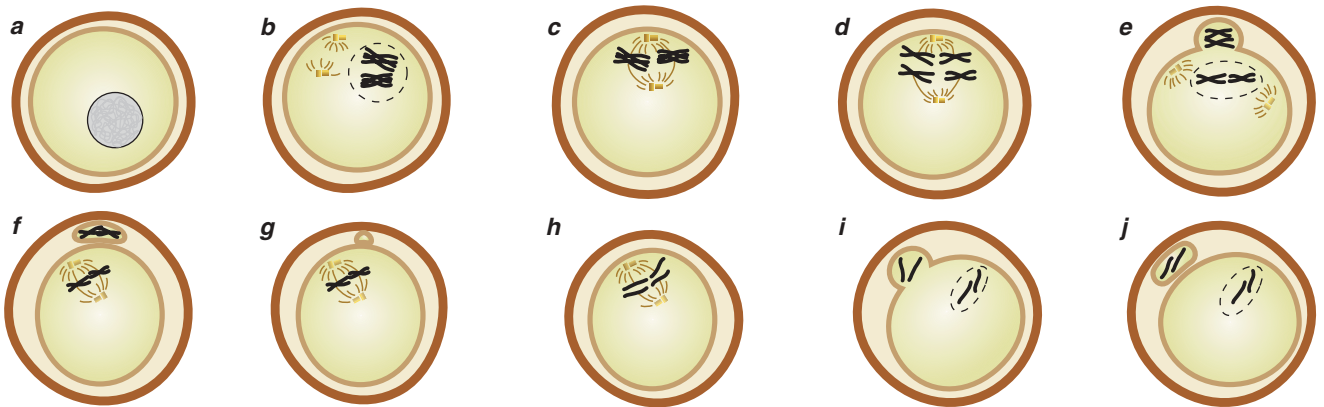
férenciation des cellules : les cellules germinales (qui sont les cellules souches des gamètes) ne sont pas plus favorables que les fibroblastes de la peau d'animaux adultes. De surcroît, nous avons montré, au laboratoire chez la souris, que l'efficacité du clonage n'est guère améliorée avec des cellules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

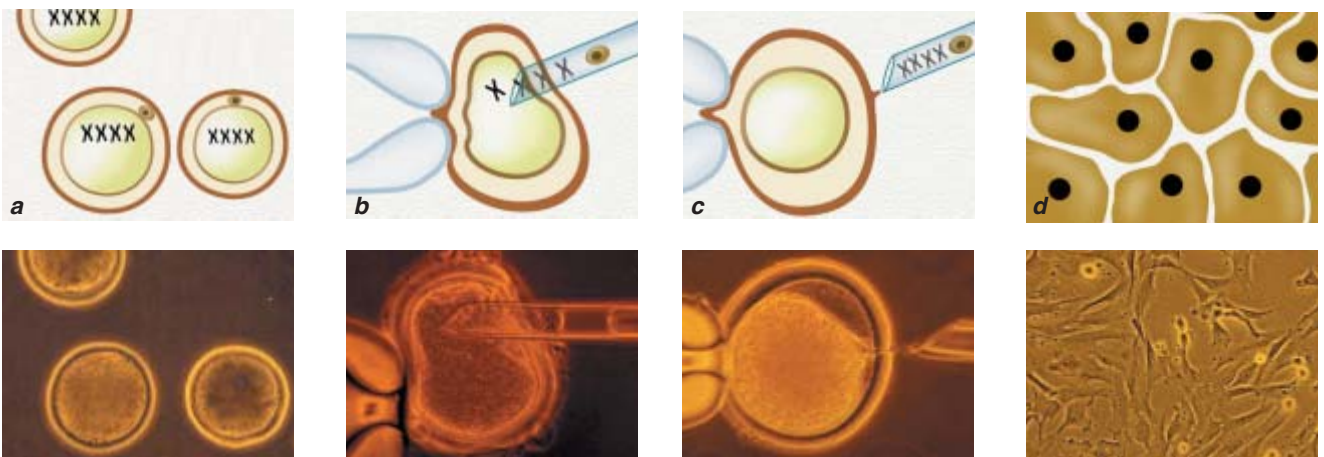
Et plus si affinités...

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-