

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-

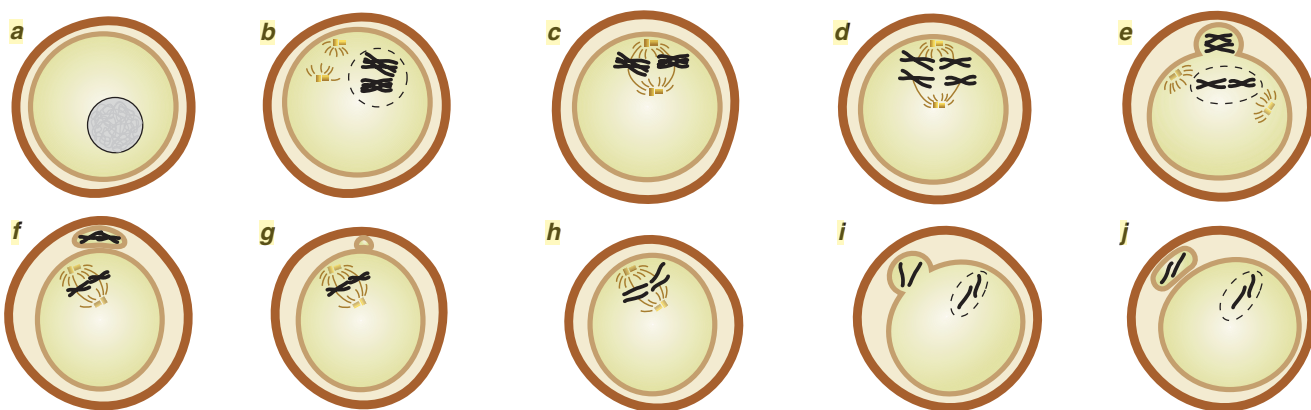
férenciation des cellules : les cellules germinales (qui sont les cellules souches des gamètes) ne sont pas plus favorables que les fibroblastes de la peau d'animaux adultes. De surcroît, nous avons montré, au laboratoire chez la souris, que l'efficacité du clonage n'est guère améliorée avec des cellules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

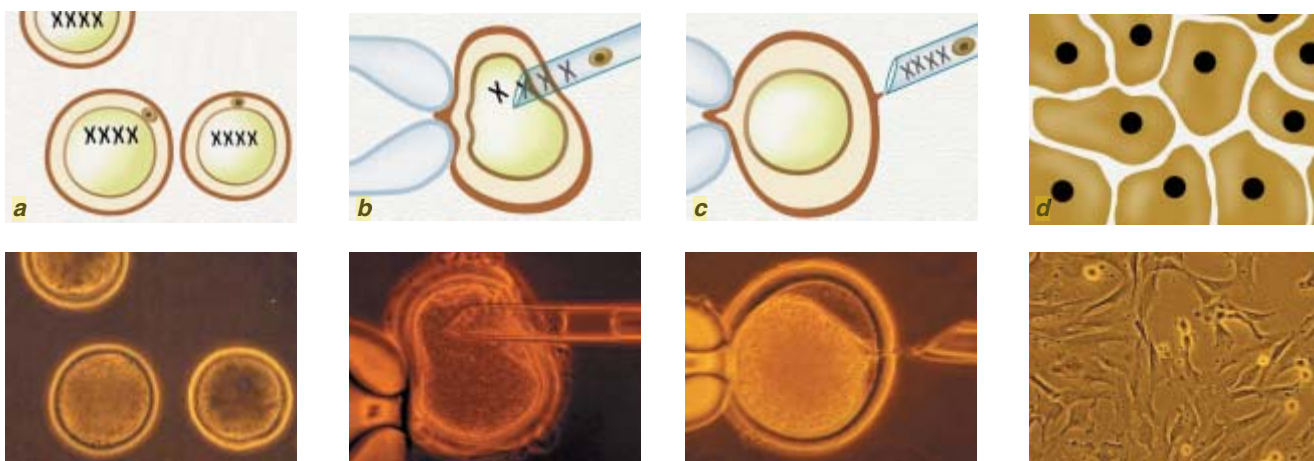
### Et plus si affinités...

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 répllication 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.

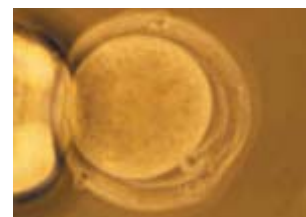
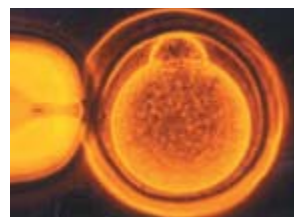
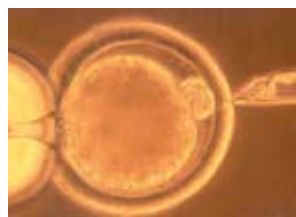
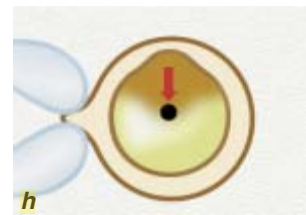
Cependant, la reprise du cycle cellulaire dans l'embryon est en principe suivie de l'expulsion du dernier globule polaire contenant un lot complet de chromosomes. Cette phase d'expulsion, qui est aléatoire chez la plupart des espèces dans les conditions expérimentales utilisées, peut être évitée par 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.

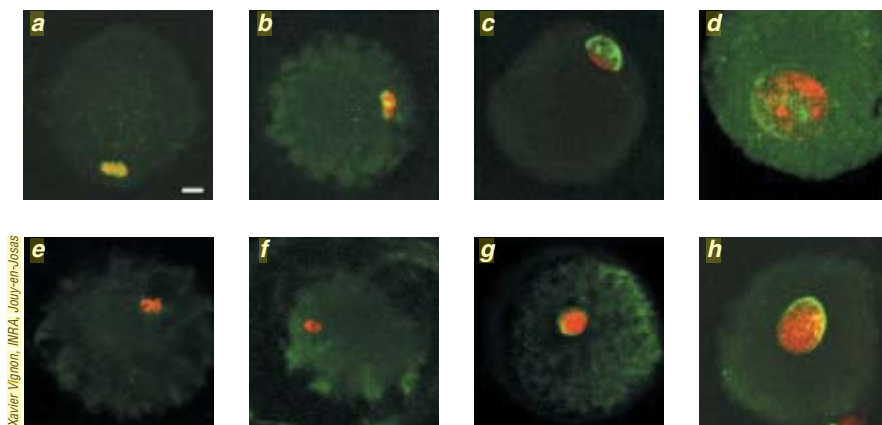
D'autres facteurs épigénétiques, telles des perturbations au moment de la reconstitution de l'embryon par la procédure de transfert de noyau (l'activation de l'ovocyte receveur), ou bien la mauvaise synchronisation entre le développement du fœtus cloné et son environnement utérin, pourraient également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



**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).**