

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 différentes de celles observées après altération expérimentale de cette empreinte, chez la souris.

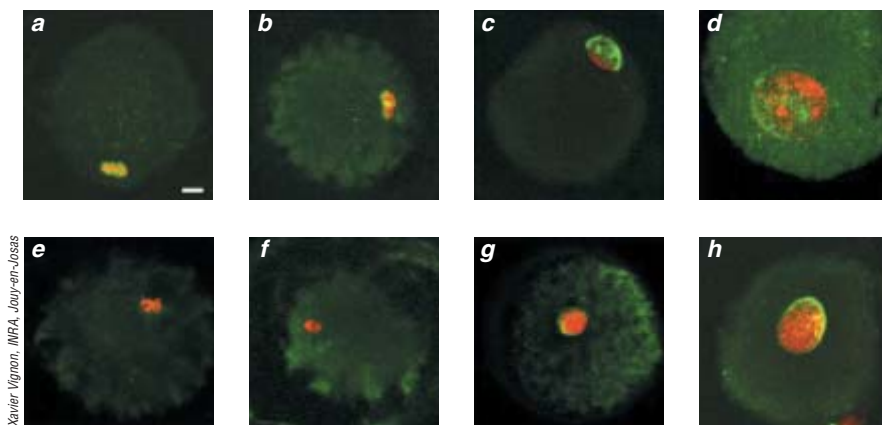
D'autres facteurs épigénétiques, telles des perturbations au moment de la reconstitution de l'embryon par la procédure de transfert de noyau (l'activation de l'ovocyte receveur), ou bien la mauvaise synchronisation entre le développement du fœtus cloné et son environnement utérin, pourraient également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

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 clarification 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.