

LE CLONAGE PAR TRANSFERT DE NOYAU DANS L'ESPÈCE BOVINE : PREMIERS RÉSULTATS

par

F. ECTORS, correspondant,
F. J. ECTORS, A. DELVAL, F. THONON, J. F. BECKERS

Introduction

Le clonage ou l'obtention d'un grand nombre d'individus génétiquement identiques est une pratique courante en production végétale. Dans le domaine animal, sur base de la formation naturelle de vrais jumeaux par clivage de l'embryon aux stades précoces (Massip *et al.* 1983), les premiers essais de multiplication ont eu recours à la section du bouton embryonnaire en plusieurs parties. Cette approche est cependant limitée car l'on ne peut produire plus de 4 individus par embryon. C'est pourquoi, depuis de nombreuses années, d'importantes recherches ont été entreprises chez les mammifères domestiques en vue de la mise au point du clonage par transfert de noyau.

Cette technique nécessite la séparation des blastomères constituant l'embryon donneur et leur greffe dans le cytoplasme d'un ovocyte énucléé. A l'heure actuelle, la greffe de noyau est devenue réalité. Elle a été réalisée pour la première fois chez les batraciens par Briggs et King (1952). Ceux-ci ont réussi à implanter des noyaux de cellules embryonnaires de grenouille dans des œufs dont le noyau avait été enlevé. Ils ont observé la naissance de têtards, mais le pourcentage de réussite devenait de plus en plus faible au fur et à mesure qu'ils utilisaient des cellules embryonnaires plus âgées. Tout se passait comme si ces dernières étaient déjà trop différenciées pour permettre l'expression des gènes nécessaires au développement de l'embryon.

Chez les mammifères, l'opération devient plus compliquée car la période de totipotence du noyau embryonnaire est plus courte que chez les amphibiens. Elle a été réalisée, pour la première fois, chez les ovins par Willadsen en 1986 et chez les bovins par Prather *et al.* en 1987.

Actuellement, chez cette espèce, la technique en est encore au stade expérimental, et si quelques succès sont enregistrés de par le monde,

le rendement global de l'opération est encore faible car il ne dépasse pas 5 % à 10 % (Willadsen *et al.* 1991). Cependant, vu les avantages qu'une telle technique pouvait apporter à la sélection et à la multiplication des animaux d'élite, nous avons entrepris des recherches dans ce domaine grâce à d'importants subsides accordés par l'IRSIA.

Matériels et méthodes

Les embryons donneurs

Les embryons donneurs ont été obtenus soit par abattage des animaux et rinçage des oviductes et de l'utérus, soit par récolte non chirurgicale au 5^e ou 6^e jour après l'insémination. Les vaches donneuses ont été superovulées au moyen de 32 U Armour de pFSH, additionnée de 40 % de pLH. Les embryons donneurs ont été utilisés immédiatement ou ont été congelés en vue de leur utilisation ultérieure suivant la technique de congélation décrite par Touati K. et Ectors F. (1991) pour le transfert direct.

Pour séparer les blastomères, l'embryon est maintenu par sa zone pellucide à l'aide d'une pipette de maintien, tandis qu'une aiguille dilacère la zone pellucide jusqu'à obtenir la sortie de l'amas cellulaire. Celui-ci est ensuite disloqué par aspirations successives dans la pipette de maintien de manière à isoler les différents blastomères qui le constituent. Cette opération se déroule dans un milieu pauvre en Ca^{++} et en Mg^{++} .

Les ovocytes receveurs

Les ovocytes immatures sont obtenus par ponction d'ovaires récoltés aux abattoirs. Seuls les follicules de 1 à 8 mm de diamètre sont ponctionnés, et les ovocytes entourés d'une corona radiata dense et homogène, sont placés en maturation dans un milieu TCM 199 bicarbonaté, additionné de 20 % de sérum de vaches en chaleur, de 0,27 mM de pyruvate de sodium, de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de pFSH, de 100 UI/ml de pénicilline et de 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine. Après 24 heures, les complexes ovocytes-cumulus sont exposés pendant 4 minutes à une solution contenant 1 mg/ml d'hyaluronidase (Sigma : H-3506) afin de dissocier le cumulus. Les dernières cellules de la corona sont éliminées par pipettages successifs au travers d'une pipette calibrée.

Techniques de micromanipulation

a) Enucléation de l'ovocyte

Une fois dénudés, les ovocytes sont sélectionnés en fonction de la présence du premier globule polaire. Ils sont ensuite exposés à un inhibiteur du cytosquelette (cytochalasine B, Sigma : C-6762 ; 7,5 $\mu\text{g/ml}$) et énucléés par aspiration de leur globule polaire ainsi que du 1/4 de cytoplasme sous-jacent. Cette opération se déroule au moyen d'une pipette de maintien (diamètre extérieur 110 microns et diamètre intérieur 25 microns) et d'une pipette d'aspiration plus fine (diamètre extérieur 30 microns, diamètre intérieur 20 microns) reliée à un microinjecteur de type Narishigé IM-5b. L'enucléation est contrôlée par exposition temporaire (10 minutes) des ovocytes à un colorant spécifique de l'ADN (Hoechst 33342 ; Sigma B-2261 ; 5 $\mu\text{g/ml}$). Les ovocytes énucléés, ou cytoplastes, sont remis en culture dans leur milieu de maturation pour une durée de 15 à 17H.

b) Transfert de blastomère

Les blastomères isolés sont introduits dans l'espace périvitellin des ovocytes énucléés au moyen d'une pipette d'injection reliée au microinjecteur. Immédiatement après la micromanipulation, les couples cytoplaste-blastomère sont soumis à un champ électrique (une impulsion de 2,7 kVolts/cm pendant 50 micro-secondes), afin de provoquer la fusion des deux cellules et l'activation du cytoplaste. La chambre d'électrofusion est constituée de deux fils de platine de 100 microns de diamètre, espacés de 250 microns. Elle est remplie d'un milieu non conducteur (pauvre en ions) dont l'osmolarité est assurée par la présence de mannitol (Sigma : M-1902 ; 50 g/l) et d'ions Ca^{++} (0,01mM) et Mg^{++} (0,1mM). Ces ions sont nécessaires à l'activation de l'ovocyte. Tous les autres sels ont été éliminés du milieu d'électrofusion car leur présence entraîne l'apparition d'un courant plus intense qui se révèle léthal pour ces cellules.

Développement des embryons reconstitués

Les embryons reconstitués sont développés *in vitro* en présence de cellules épithéliales flottantes provenant d'oviductes bovins (co-culture). La co-culture est réalisée en gouttes de 50 μl de Ménézo B2, recouvertes d'huile minérale (Sigma : M-3516). Les embryons sont cultivés à 39° C dans une atmosphère de 5 % de CO_2 , saturée en eau. La culture est examinée après 3, 5 et 7 jours en vue d'évaluer les pourcen-

tages de clivage, de stade VIII et le taux de blastocystes. Les embryons ainsi obtenus peuvent, soit servir de donneurs pour un second cycle de micromanipulation après 5 jours de culture, soit être transférés dans des receveuses synchrones après 7 jours de développement.

Résultats

Dans un premier temps, pour des raisons de facilité et d'économie, nous avons débuté nos recherches en utilisant des ovocytes et des embryons donneurs produits *in vitro*. Malgré les résultats assez décevants : 9,4 % de clivage, 3,4 % de stade VIII et 1,7 % de morula, cette première partie du travail a permis de mettre au point les différents milieux de maturation et de culture, de tester les paramètres de l'électrofusion et enfin de contrôler l'énucléation.

Suspectant une viabilité moindre pour les embryons produits *in vitro*, nous avons continué nos recherches en utilisant des embryons donneurs produits *in vivo*. Cette modification, associée aux perfectionnements apportés à la méthode, nous a permis d'augmenter de manière sensible les taux de fusion et de clivage qui atteignent respectivement 86,9 % et 61,9 % ; les pourcentages de stade VIII et de morula-blastocyste restant aux environs de 10 %.

Forts de ces résultats, nous avons testé à nouveau l'utilisation d'embryons donneurs produits *in vitro* et les résultats obtenus rejoignent ceux enregistrés avec les embryons donneurs produits *in vivo*, soit 9,8 % pour 12,1 % d'embryons transférables.

Cet acquis est très important car il permet d'augmenter de façon considérable l'efficacité du clonage avec la possibilité de disposer d'un grand nombre d'embryons donneurs, de programmer le travail et surtout d'utiliser les embryons reconstitués comme donneurs pour un second cycle. Les blastocystes obtenus sont viables puisque sur 12 transferts portant sur 19 embryons obtenus à partir de donneurs frais, nous enregistrons 6 gestations dont 2 sont âgées de plus de 6 mois. Un embryon a également été obtenu à partir d'un donneur congelé. Celui-ci, après transfert, a donné lieu à une gestation qui s'est malheureusement soldée par un avortement.

Discussion

Si les résultats du clonage sont comparables à ceux obtenus par la fécondation *in vitro* en ce qui concerne les taux de clivage, les pourcentages de stade VIII et de blastocystes sont par contre beaucoup plus faibles.

Il ne semble pas que l'électrofusion doive être mise en cause car le pourcentage de fusion est très élevé et le taux de clivage très acceptable. Par contre, le pourcentage d'embryons reconstitués évoluant jusqu'au stade de 8 cellules est beaucoup plus faible, soit 18,1 % contre 42,6 % lors de la fécondation *in vitro*. Pour expliquer ces échecs, plusieurs éléments peuvent entrer en ligne de compte à savoir la maturation et l'activation ovocytaire, ou encore le milieu de culture dans lequel l'embryon est appelé à se développer.

La maturation cytoplasmique rend le cytoplasme apte à collaborer avec le génome mâle et à assurer le développement embryonnaire jusqu'à l'activation du nouveau génome embryonnaire. Il faut noter que ces modifications importantes surviennent dans un temps très court et, de ce fait, exigent un environnement parfaitement défini tant du point de vue chimique qu'hormonal.

De nombreuses équipes s'emploient à l'étude de la maturation ovocytaire en utilisant des techniques différentes, en vue de tester la synthèse protéique du cytoplasme : soit des antisérums, soit des précurseurs radioactifs.

En collaboration avec l'équipe du Prof. Koulischer, nous avons procédé à l'étude caryotypique des ovocytes maturés *in vitro*. Cette étude a révélé qu'au total 36,9 % des ovocytes n'avaient pas subi une maturation nucléaire normale : 20,2 % étaient bloqués en métaphase I et 16,7 % présentaient des anomalies nucléaires. Si l'on tient compte du fait que ces résultats ne portent que sur les ovocytes en métaphase, l'on peut affirmer qu'approximativement la moitié des échecs enregistrés après clonage sont dus à des maturations nucléaires anormales qui pourraient être attribuées à une mauvaise sélection des complexes cumulus-ovocyte, basée uniquement sur des critères morphologiques. Une partie de ces ovocytes pourrait provenir de follicules trop petits (inférieurs à 3 mm) et être incapables de reprendre ou d'achever leur méiose. Une autre partie pourrait provenir de follicules ayant subi la dominance et être en voie d'atrésie.

Avant la fécondation, le métabolisme de l'ovocyte est au repos. La fixation du spermatozoïde à sa surface induit son activation, c'est-à-

dire l'augmentation de son métabolisme avec début de synthèse protéique et de la segmentation.

L'ovocyte peut également être activé indépendamment du spermatozoïde par toute une série de traitements chimiques et physiques tels l'électrofusion qui, tout en provoquant la fusion des membranes du blastomère et du cytoplaste, provoque l'activation. Celle-ci, induite artificiellement, n'est réalisée correctement que dans un faible pourcentage des cas. Ces échecs s'expliquent soit par un stimulus dont l'efficacité est loin d'être optimale, soit encore par l'incapacité de l'ovocyte à répondre correctement au stimulus activateur.

Les défauts enregistrés de la maturation ovocytaire et les erreurs possibles lors de la reconstitution de l'embryon n'expliquent pas à elles seules le faible pourcentage de gestations obtenu après clonage. Il faut aussi incriminer les conditions de développement *in vitro* de l'embryon, qui ne semblent pas être optimales. En effet, la viabilité des embryons après co-culture est moindre que celle des embryons *in vivo* ou obtenus après passage dans l'oviducte de lapine (Ectors F. J. *et al.* 1993).

Pour réussir le clonage, il faut non seulement une maturation ovocytaire adéquate mais encore une synchronisation parfaite entre les cycles cellulaires du cytoplasme receveur et du blastomère donneur. Campbell *et al.* (1993) ont montré récemment l'importance de la teneur en MPF du cytoplaste au moment de la fusion et ils en arrivent à la conclusion qu'il faut respecter un intervalle de 6 à 9 heures entre l'activation du cytoplaste et la fusion du blastomère. Cet intervalle serait nécessaire à la diminution de la concentration intracellulaire en MPF.

Lorsque l'on analyse le déroulement de la gestation et que l'on procède à l'examen des veaux nouveau-nés provenant d'embryons clonés, l'on constate parfois un allongement du temps de gestation, une augmentation anormale du poids des veaux ainsi qu'un accroissement du pourcentage de malformations qui peut atteindre 7 %. Ces conditions valent aussi bien pour les embryons obtenus par FIV que ceux issus du clonage, ce qui semble indiquer que la cause doit en être recherchée dans les conditions de maturation ovocytaire. Ces constatations démontrent que la production d'embryons bovins par maturation, fécondation et développement *in vitro*, et à plus forte raison par clonage, est loin d'être parfaitement définie. La plus grande prudence s'impose donc quant à l'application sur le terrain de pareilles techniques. Il est impératif de poursuivre les recherches de manière à pouvoir maîtriser par-

faitement les différentes étapes de la technique et en particulier celle de la maturation ovocytaire. C'est à ces conditions que la fécondation *in vitro* et le clonage pourront demain participer aux progrès de la sélection et à la multiplication des animaux d'élite.

RÉSUMÉ

Le clonage par transfert de noyau fut réalisé pour la première fois chez les bovins par Prather et collaborateurs en 1987. Vu l'importance économique de ce mode de multiplication, de nombreuses équipes de recherche affinent la technique et étudient sa mise en application sur le terrain. Alors que l'énucléation de l'ovocyte receveur, l'injection et la fusion du blastomère donneur se réalisent avec succès, la maturation ovocytaire, la culture et la congélation de l'embryon reconstitué posent encore de nombreux problèmes. De plus, l'embryon reconstitué est plus fragile et l'on constate une augmentation sensible de la mortalité embryonnaire après transfert chez la receveuse.

SUMMARY

In 1987, Prather *et al.* have performed the first embryo cloning by nuclear transfer in the bovine species. Since, many researchers try to develop and to apply the technique. While the enucleation of the recipient oocyte, the injection of the donor blastomere and the fusion procedure are now well controlled, on the other hand, maturation and activation as the development and freezing of the cloned embryos need to be more investigated. The cloned embryo is more fragile. An increase in embryonic mortality is observed after transfer in a recipient cow.

(Centre de Recherches IRSIA-CERAD 2, Services d'Obstétrique et de Physiologie de la Reproduction, Université de Liège.)

BIBLIOGRAPHIE

- BRIGGS R. & T. J. KING. *Proc. natl. Acad. sci. USA*, 38 : 455-463 (1952).
 CAMPBELL K. H. S., W. A. RITCHIE & I. WILMUT. *Theriogenology*, 33 : 199 (1993).
 ECTORS F. J., F. THONON, A. DELVAL, R. S. FONTES, K. TOUATI, J. F. BECKERS & F. ECTORS. *Livestock production science*, 36 : in press, (1993).
 GANDOLFI F., A. TIZIANA, L. BREVINI & R. M. MOOR. *J. reprod. fert., Suppl.* 38 : 107-115 (1989).
 HEYMAN Y., P. CHESNÉ & J. P. RENARD. *Recueil de Médecine vétérinaire*, 167 : 315-322 (1991).
 MASSIP A., P. VAN DER ZWALMEN, J. MULNARD & W. ZWIJSEN. *Vet. rec.*, 112 : 301 (1983).
 PRATHER R. S., F. L. BARNES, M. M. SIMS, J. M. ROBL. W. H. EYESTONE & N. L. FIRST. *Biol. reprod.*, 37 : 857-866 (1987).
 RENARD J. P. & Y. HEYMAN. *Cahiers agriculture*, 1 : 309-316 (1992).
 TOUATI K. & F. ECTORS. *Ann. Méd. vét.*, 135 : 287-289 (1991).

VOELKEL S. A. & Y. X. HU. *Theriogenology*, 37 : 1117-1131 (1992).

WILLADSEN S. M. *Nature*, 320 : 63-65 (1986).

WILLADSEN S. M., R. E. JANZEN, R. J. McALISTER, B. SHEA, G. HAMILTONET & D. McDERMAND. *Theriogenology* : 35 161-170 (1991).

Discussion

M. J. J. Hoet. — J'ai beaucoup apprécié l'originalité de vos travaux et les techniques que vous avez employées.

Quelle est l'origine des malformations congénitales chez les animaux rendus diabétiques ? Le retard de croissance et les malformations congénitales qui peuvent y être associées sont attribuées au retard de l'implantation du blastocyste. L'environnement maternel semble conditionner ce retard.

La deuxième question est en rapport avec le gain de poids des veaux.

M. F. Ectors. — Jusqu'à présent, nous n'avons pas trouvé d'explication valable aux diverses anomalies rencontrées tant après maturation, fécondation et développement *in vitro* qu'après clonage. Dans le cas précis du clonage, l'asynchronisme entre les cycles cellulaires de l'ovocyte et du blastomère peut être à l'origine des anomalies décrites dans la littérature.

M. R. Lambotte. — Je félicite M. Ectors pour l'importance de son travail et la qualité de sa présentation. Je voudrais faire deux remarques :

je suis frappé par l'analogie entre les 15 % d'anomalies chromosomiques et les 15 à 17 % de fausses couches spontanées pour aberrations chromosomiales que nous observons en clinique humaine ;

le clonage est strictement interdit dans l'espèce humaine par tous les comités éthiques, ce que l'on comprend à l'heure actuelle.

Je voudrais toutefois, de manière prospective, signaler que ce clonage pourrait se révéler intéressant dans les cas de Turner (XO), où le patrimoine ovulaire est extrêmement réduit, voire nul. Aussi, l'hyperstimulation ovarienne, dans le cadre de la « fivete », associée au clonage, pourrait augmenter les chances de grossesse chez ces patientes actuellement infécondes. Vos travaux ne manqueront pas de nous faciliter la tâche.

M. F. Ectors. — Il est certain qu'un nombre élevé de mortalités embryonnaires précoces est dû à des anomalies du caryotype. Mais, à côté de ces anomalies nucléaires, l'on a peut-être souvent oublié l'importance de la maturation cytoplasmique ovocytaire. Il est absolument indispensable que l'ovocyte subisse une maturation parfaite pour pouvoir assurer les premiers développements embryonnaires.

Si, comme vous venez de le dire, il est évidemment exclu d'appliquer le clonage à l'espèce humaine, il n'est pas impossible qu'un jour une telle technique puisse rendre des services dans le traitement de certains cas de stérilité.