

Le clonage de l'animal et son apport en recherche vétérinaire

Animal cloning and its contribution to veterinary research

Par Jean-Paul RENARD⁽¹⁾ et Pascale CHAVATTE-PALMER⁽¹⁾
(mémoire présenté le 17 juin 2004)

RÉSUMÉ

Le clonage est une technique utilisée aujourd'hui essentiellement en recherche pour comprendre comment un noyau de cellules différenciées peut, une fois placé dans l'environnement cytoplasmique d'un ovule énucléé, acquérir à nouveau des propriétés de noyau embryonnaire. Le taux de développement à terme des embryons clonés est aujourd'hui toujours faible, inférieur à cinq pour cent. Il est toutefois maintenant bien établi que les clones peuvent se développer en adultes d'apparence physiologique normale, être fertiles et avoir la même durée de vie que des animaux obtenus par reproduction sexuée. Chez le bovin, largement utilisé comme modèle, des données récentes montrent que les performances zootechniques des clones sont semblables et pour certains caractères, moins variables que celles d'animaux issus de fécondation. Chez cette espèce, les échecs du clonage sont dus à des mortalités embryonnaires et fœtales précoces (premier tiers de la gestation) mais aussi tardives (pendant le dernier tiers de la gestation). Environ 30 % des clones présentent à la naissance un syndrome léthal complexe, le syndrome LOS, caractérisé notamment par un poids supérieur à la normale, des placentomes œdémateux en nombre réduit et des perturbations physiologiques se traduisant par des dysfonctionnements systémiques affectant soit le système cardiovasculaire, respiratoire ou immunitaire ou encore le fonctionnement hépato-rénal. Les animaux affectés par ce syndrome meurent en général dans les deux mois qui suivent la naissance. Les recherches en cours donnent une large place au suivi clinique des gestations de clones et aux études embryologiques. Elles montrent que ces perturbations ont souvent pour origine des dérégulations de la croissance des tissus et organes fœtaux. L'analyse moléculaire de ces perturbations épigénétiques devrait permettre de mieux connaître l'ontogenèse des grandes fonctions de l'organisme. L'étude des clones montre que le programme de développement qui permet la construction d'un organisme vivant complexe est à la fois robuste et flexible et que sa réinitialisation au moment où l'on introduit le noyau somatique dans le cytoplasme de l'ovule n'est sans doute pas requise.

Mots-clés : clonage, bovin, placenta, épigénèse, recherche vétérinaire.

(1) Unité de Biologie du Développement et Reproduction, INRA, 78352, Jouy en Josas, France.

SUMMARY

Cloning is a technique currently used mainly for research purposes, to understand how the nucleus of a differentiated cell can, once it has been placed into the cytoplasm of an enucleated ovule, can re-acquire the properties of an embryonic nucleus. The rate of full term development in cloned embryos is still low, only about 5 per cent of the reconstructed embryos. However, it is now well established that clones can develop into adults with a seemingly normal physiology, as fertile animals with the same life span as animals born from sexual reproduction. In cattle, widely used as a cloning model, recent data has shown that clones' zootechnic performances are similar, and in some instances less variable than those of animals born from a fertilised egg. In this species, cloning failures are due to early (first trimester of gestation) as well as late (last trimester of gestation) embryo and foetal mortality. Approximately 30% of clones are born with a complex lethal syndrome, known as the Large Offspring Syndrome (LOS), with a bodyweight greater than normal, placentomes in lower numbers and oedematous, and physiological disorders resulting in cardiovascular, respiratory, immune, or hepato-renal dysfunctions. Animals with this syndrome generally die within two months from birth. Current research focuses on the clinical follow-up of the gestation of clones and on embryological studies, which showed that such disorders often stem from a growth deregulation in the foetal tissues and organs. Molecular analysis of these epigenetic disorders should help understand better the ontogenesis of the body's main functions. The study of clones shows that the programme which leads to the development of a complex living being is both robust and flexible, and that its reinitialising when introducing the somatic nucleus within the ovule cytoplasm is probably not required.

Keys words: cloning, cattle, placenta, epigenesis, veterinary research.

• INTRODUCTION

Le clonage désigne la technique qui consiste à introduire dans le cytoplasme d'un ovocyte préalablement énucléé, un noyau provenant d'une cellule somatique ou embryonnaire. Cette manipulation a été imaginée pour la première fois à la fin du dix-neuvième siècle à la suite de l'énoncé de la théorie du plasma germinal, postulant que des mécanismes irréversibles contrôlent la différenciation des cellules. Le clonage a donc d'emblée été considéré comme un moyen expérimental de mieux comprendre la nature des événements qui conduisent à la différenciation des cellules au sein d'un organisme complexe, comme par exemple celui des vertébrés. Cette technique n'a toutefois commencé à être utilisée avec succès qu'à partir du milieu du vingtième siècle (BRIGGS et KING, 1952), chez les amphibiens où elle a permis de démontrer qu'il était possible d'obtenir des grenouilles adultes à partir de noyaux de cellules embryonnaires ou larvaires. Mais ce n'est que récemment, avec la naissance de la brebis Dolly, qu'a pu être apportée la preuve qu'un noyau de cellule somatique prélevé sur un animal adulte pouvait, par clonage, donner naissance à un animal viable, se développant à son tour en adulte fertile (WILMUT *et al.*, 1997). Depuis, cette technique est considérée avec un mélange de fascination et de répulsion. La revue *Nature* a contribué à cette évolution en soulignant, sur la page de couverture du numéro annonçant la naissance de la brebis Dolly, que le transfert de noyaux ouvrait la voie à des troupes de « clones », alors que les auteurs de l'article n'avaient pas employé ce terme !

Aujourd'hui encore, la technique du clonage sert essentiellement à comprendre comment un noyau de cellule différenciée peut, une fois placé dans l'environnement cytoplasmique d'un ovule, acquérir à nouveau des propriétés de noyau embryonnaire et donc en quelque sorte inver-

ser le temps biologique qui jusqu'alors paraissait unidirectionnel (VOGELSTEIN, ALBERTS et SHINE, 2002). Les conséquences de cette manipulation pour le développement de l'embryon sont encore largement incomprises. Les facteurs de variations entre expériences sont nombreux et demeureront incontrôlés tant que ne seront pas mieux cernées la nature des relations entre la structure du noyau, profondément modifiée par le cytoplasme de l'ovule et sa fonction, étroitement dépendante d'un temps biologique réglé par de multiples horloges dont les architectures sont aujourd'hui encore quasiment totalement inconnues. Le clonage reste donc surtout une technique de recherche. Après une présentation de l'état des connaissances sur cette technique, ce mémoire tentera de montrer que le clonage a sa place dans la recherche vétérinaire. Car c'est bien la recherche qu'il faut d'abord interroger pour permettre dans un second temps le développement d'applications chez les mammifères d'élevage

• LES CLONES, « NOUVEAUX ANIMAUX »

La reproduction par clonage est devenue une réalité pour une dizaine d'espèces de mammifères (RENARD, 2003). Des travaux sont en cours chez le singe et le furet, mais jusqu'à présent sans succès. Quelle que soit l'espèce considérée, moins de 10 % seulement des embryons transplantés se développent en jeunes viables. Ce taux est faible au regard d'applications éventuelles en élevage. Il ne diffère pas selon que l'on utilise comme source de noyau des donneurs mâle ou femelle.

C'est chez le bovin que les clones sont les plus nombreux. Leur nombre est déjà supérieur à mille, mais il continue à augmenter surtout aux USA mais aussi au Japon où plus de 200 animaux adultes ont déjà été produits. L'efficacité de la technique, quoique toujours faible, a pu

commencer à être améliorée par une meilleure prise en compte des caractéristiques biologiques des ovocytes receveurs, et aussi par un tri soigneux des cellules donneuses de noyau au moment de leur utilisation. Mais ces progrès restent largement empiriques et les taux de mortalité qui surviennent après l'implantation demeurent élevés. Chez le bovin, le rendement de la technique, exprimé en nombre d'embryons transplantés qui se développent à terme, a plus que doublé (tableau 1) au cours de ces deux dernières années mais reste encore beaucoup trop faible pour des applications (autres que marginales) en élevage (FABER *et al.*, 2004). Le nombre de clones de mouton ou de chèvre est beaucoup plus faible, une centaine environ, et seulement quelques individus ont été obtenus chez les autres espèces.

	1998 - 1999	2003 - 2004
Développement <i>In vitro</i> (Blastos/reconstitués)	17,5 % (341/1954)	36,8 % (1027/2792)
Développement <i>In vivo</i> Veaux nés/transplantés	6,3 % (14/220)	15 % (222/1510)
Rendement global Veaux/100 noyaux	1,1 %	5,5 %

Tableau 1 : Évolution au cours des cinq dernières années du rendement de la technologie du clonage chez les bovins.

* (données fournies par CIBELLI, ZAKHARTCHENKO, GALLI, et INRA 1999)

** (données fournies par WELLS, FORSBERG, PAGE, INRA, 2003-2004)

Les données zootechniques que nous présentons concernent les bovins. Depuis la naissance en février 1998, à l'INRA, d'un premier clone bovin (VIGNON *et al.*, 1998), plus de 60 veaux ont été produits dans nos installations expérimentales dont une quarantaine de femelles et deux mâles qui ont atteint l'âge adulte. Nous disposons maintenant de plusieurs lots de 4 à 12 femelles issues de plusieurs donneuses de cellules présentes dans l'élevage. Ces lots de clones permettent de disposer d'autant de répliques d'un même génotype initial. Ils ont été intégrés dans une recherche qui vise à comparer leurs performances à celle d'animaux contemporains issus classiquement d'insemination artificielle.

La croissance

Les résultats (tableau 2) montrent que la croissance des

Type d'animaux	Clones lot A	Contrôles 1	Clones lot B	Clones lot C	Contrôles 2
âge	12 mois		15 mois		
nombre	n = 8	n = 10	n = 6	n = 9	n = 10
Gain moyen kg / jour	0,701 ± 0,064	0,804 ± 0,113	0,782 ± 0,041	0,711 ± 0,061	0,766 ± 0,089

Tableau 2 : Comparaison de la croissance pondérale moyenne (kg / jour) de lots de femelles clonées issues de trois donneuses (génotypes A, B, C) et de lots de femelles contemporaines contrôles du même élevage (n = nombre d'animaux par lot) (d'après HEYMAN *et al.*, 2004).

animaux clonés ne diffère pas de celle des témoins et varie de 0,7 à 0,8 kg/jour. Les différences de taux de croissance entre clones de même génotype sont plus faibles qu'entre animaux témoins, aboutissant à une quasi superposition des courbes de croissance individuelles au sein d'un même lot, comme illustré dans la figure 1 pour un des lots de clones actuellement élevés sur le domaine expérimental INRA de Bressonvilliers

Ces résultats sont observés alors que le poids moyen à la naissance des animaux clonés est significativement plus élevé et aussi plus variable que celui des animaux témoins (voir plus bas). Les mécanismes de croissance compensatrice associés au taux d'hormone de croissance circulante apparaissent donc réguler normalement le développement des animaux clonés (GOVONI *et al.*, 2002), au moins au delà de la période périnatale.

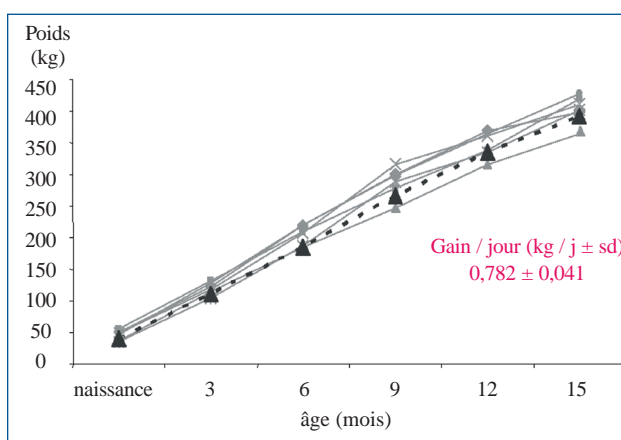


Figure 1 : Courbes de croissance individuelle d'un lot de 6 veaux clonés (d'après HEYMAN *et al.*, 2004).

La production laitière

En ce qui concerne la production laitière, on commence à disposer de données précises sur la quantité mais aussi la qualité du lait produit par les femelles clonées (WALSH *et al.*, 2003, HEYMAN *et al.*, 2004). Là encore, il ne semble pas que l'état de clone affecte cette production et les résultats confirment l'hypothèse d'une équivalence en substances avec le lait des vaches témoins. Nos travaux montrent en outre que la quantité de matière protéique et de matière grasse produites à partir du lait diffèrent moins entre vaches clonées (de même génotype) au cours de la première lactation qu'entre vaches témoins issues du même taureau ; la qualité bactériologique du lait estimée à partir du nombre moyen de cellules par millilitre, est la même que celle du lait des femelles témoins du même élevage (HEYMAN *et al.*, 2004).

La descendance

En l'état actuel des données, rien n'indique que le potentiel de reproduction des clones, estimé à partir de plusieurs critères comme l'âge à la puberté, la durée du cycle sexuel, les variations des taux de progestérone et de gonadotropines (LH et FSH), le diamètre du follicule préovulatoire ou le nombre moyen d'ovocytes fécondables recueillis après ponctions échographique guidées (OPU), soit affecté (HEYMAN *et al.*, 2004, TAMASSIA *et al.*, 2004). Après la 1^{re} insémination, le taux de non retour en chaleurs semble lui aussi normal (LANZA *et al.*, 2001). Nous avons en outre montré, après insémination d'un premier groupe de 10 femelles clonées avec du sperme de taureau non cloné, que le poids moyen des 10 veaux obtenus ($43,9 \pm 4,1$ kg) n'était pas différent de celui de 50 veaux témoins ($40,57 \pm 5,55$ kg) pour une même durée moyenne de gestation ($281,1 \pm 3,9$ jours). Enfin, trois génisses clonées accouplées avec un taureau cloné de l'élevage ont donné naissance à trois veaux maintenant âgés de un an et normaux (HEYMAN *et al.*, 2004). Au vu de ces données, la fertilité des clones peut donc aussi être *a priori* considérée comme normale.

Il y a encore peu de données disponibles sur la descendance de clones, c'est à dire sur les animaux issus par reproduction sexuée d'un ou de deux parents clonés. La gamétogénèse remanie profondément à la fois la structure du génome lors des échanges de séquences d'ADN qui se produisent au cours de la méiose (*crossing over*), et aussi son organisation fonctionnelle en effaçant les modifications épigénétiques apposées sur de nombreuses séquences de l'ADN au cours de l'embryogénèse précoce. Cet effacement est requis pour les gènes soumis à une empreinte parentale afin de permettre un fonctionnement différentiel de leurs allèles. La reproduction sexuée contribue donc bien à garantir l'intégrité du génome par les mécanismes spécifiquement mis en jeu lors de la gamétogénèse. L'idée communément admise aujourd'hui est donc que les descendants des clones doivent être génétiquement normaux. Ce pouvoir de la reproduction sexuée a bien été démontré chez la souris où des clones manifestant un phénotype d'obésité à la suite de défauts de reprogrammation des noyaux donneurs, ont tous produit des descendants normaux (TAMASHIRO *et al.*, 2002). Mais il y a des limites à ce pouvoir ! Il a ainsi pu être montré que des modifications épigénétiques provoquées au tout début de l'embryogénèse par une simple exposition des embryons à des conditions de culture non optimales pouvaient occasionnellement subsister à la génération suivante et devenir des épimutations transmissibles d'une génération à l'autre (ROEMER *et al.*, 1997). Même si ces événements d'épimutations sont sans doute rares, ils doivent être étudiés soigneusement dans le cas du clonage. Les différences d'épigénèse ou de fréquences de mutations ponctuelles entre clones adultes de même génotype sont encore très peu connues et devraient être déterminées avant un recours éventuel à ces clones comme reproducteurs en élevage. Le fait que le clonage répété de souris sur plusieurs générations (6 générations, WAKAYAMA *et al.*, 2000) se traduise par

une réduction progressive du taux d'animaux d'apparence normale obtenus, suggère l'accumulation de défauts de reprogrammation à chaque cycle de clonage. On ne sait pas si tous ces défauts peuvent être corrigés lors du passage du génome dans la lignée germinale. Il importe donc de disposer de données génétiques plus fines sur la descendance d'animaux clonés. Ces recherches sont en cours chez la souris, et nous avons commencé à les mettre en œuvre chez le bovin (DE MONTERA *et al.*, 2004).

De cet ensemble de données, on peut conclure que les clones, quand ils atteignent l'âge adulte, peuvent avoir une apparence physiologique et une fertilité normales. Compte tenu du recul insuffisant dans le temps, on ne peut toutefois pas encore dire si leur durée de vie sera en moyenne la même que celle des animaux issus de reproduction sexuée. Néanmoins, nous avons montré chez la souris que contrairement à une idée répandue, les clones pouvaient avoir une durée de vie elle aussi normale (ZHOU *et al.*, 2001 et nos données non publiées).

Les différences

De fait, c'est en s'intéressant au début de la vie postnatale des clones qu'on met en évidence des différences pratiquement systématiques avec les témoins. Ces différences concernent le poids des animaux à la naissance et surtout leur taux de survie.

Chez la plupart des espèces, les clones naissent avec un poids supérieur à la normale. Ce phénomène est particulièrement marqué chez le bovin : il avait été observé dans cette espèce dès les tout premiers succès du transfert de noyaux, avant la naissance de Dolly, en utilisant des noyaux embryonnaires (blastomères) isolés peu après la fécondation à partir d'embryons en cours de division (WILSON *et al.*, 1995). Ce phénomène qui se traduit par un poids moyen supérieur de 20 % à celui des veaux issus d'insémination artificielle est désigné maintenant sous le nom de « syndrome du gros veau » ou LOS (Large Offspring Syndrom en anglais). De fait, il est aussi observé après transfert d'embryons cultivés *in vitro*, notamment chez le mouton (SINCLAIR *et al.*, 1999). Il constitue une constante des données des équipes s'intéressant au clonage somatique chez les bovins (KATO *et al.*, 1998; HEYMAN *et al.*, 2002 ; WELLS, 2003). Un exemple de la distribution des poids à la naissance de veaux clonés et de veaux issus d'insémination artificielle, tous de race Holstein, est présenté dans la [figure 2](#).

Le poids moyen des veaux clonés (50 femelles) est significativement plus élevé que celui des 68 veaux femelles contemporains issus d'insémination (valeur respectives, $49,27 \pm 10,98$ kg et $40,57 \pm 5,55$ kg). La répartition des poids individuels est aussi significativement plus étendue et varie de 24 à 79 kg pour les clones, alors qu'elle s'étend de 27 à 50 kg pour les veaux témoins. En pratique, on considère qu'un veau présente le syndrome LOS quand son poids à la naissance est deux fois supérieur à la déviation standard du poids des veaux témoins (YOUNG, SINCLAIR et WILMUT, 1998).

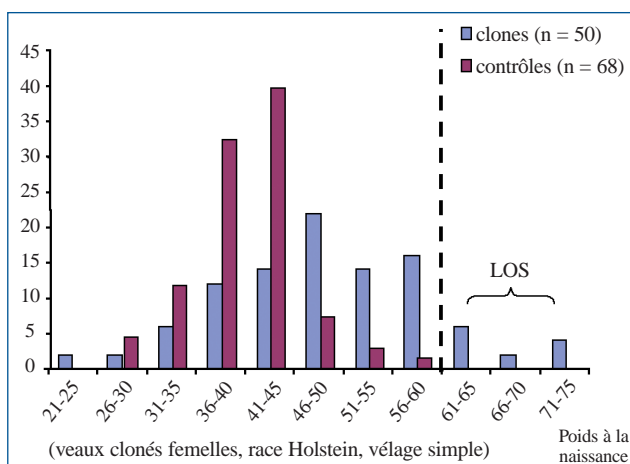


Figure 2 : Distribution du poids à la naissance des veaux issus de clonage ou de fécondation in vivo (IA).

Dans l'exemple présenté, ce syndrome concerne donc un clone sur sept. Ce phénomène peut apparaître secondaire, surtout si on considère comme cela été indiqué plus haut que les mécanismes de croissance compensatrice estompent ces différences avant l'âge adulte. Mais ces différences disparaissent-elles pour autant ? Rien n'est moins sûr ! En effet, le poids moyen des descendants des 10 premières femelles clonées (sur 50) mises à la reproduction dans notre élevage ($43,9 \pm 4,1$ kg), bien que non significativement différent de celui des témoins contemporains ($40,57 \pm 5,55$ kg, voir ci dessus) tend à être légèrement supérieur et en quelque sorte intermédiaire par rapport au poids moyen des mères clonées à leur naissance ($49,27 \pm 10,98$ kg). Le syndrome LOS pourrait donc révéler l'existence de dysfonctionnements plus complexes lorsque ces clones deviennent adultes.

En ce qui concerne le taux de survie des clones, la différence par rapport aux animaux issus de reproduction sexuée est importante. Au cours des 6 premiers mois qui suivent la naissance le taux de mortalité des premiers est supérieur à 30%, alors qu'il est inférieur à 10 % pour les seconds (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2004). Des taux semblables sont rapportés par toutes les équipes (LANZA *et al.*, 2001; PACE *et al.*, 2002, WELLS, 2003) et sont souvent plus importants encore chez la souris où le poids du placenta est fréquemment deux fois plus élevé que la normale (WAKAYAMA et YANAGIMACHI, 1999; OGONUKI *et al.*, 2002). Chez cette espèce, il apparaît clairement que ce phénomène dépend du génotype de l'animal donneur et dans une moindre mesure du type cellulaire utilisé (OGURA *et al.*, 2002). Chez le bovin, environ 25 % des mortalités surviennent dans les deux à trois jours après la mise bas. Au delà de un an, le taux de mortalité semble rester plus élevé que la normale mais il n'existe pas de données comparant précisément son évolution à celle d'animaux témoins contemporains. Ces résultats sont actuellement en cours d'obtention dans notre laboratoire Une observation importante réalisée à partir d'une soixantaine de femelles clonées et de 13 de leurs descendants semble indiquer que les cas de mortalité au delà de trois ans seraient plus fréquents chez les clones que chez leurs descendants (WELLS *et al.*, 2004).

Les différences en terme de poids à la naissance et taux de survie, que l'on observe régulièrement entre animaux clonés et animaux témoins révèlent l'existence d'effets à long terme du transfert de noyaux. Elles sont la partie visible de désordres beaucoup plus graves qui se produisent tout au long de la gestation et conduisent le plus souvent à des arrêts de développement avant la mise-bas. En tentant de comprendre l'origine de ces échecs, on réalise alors que les relations entre le génome et son environnement sont beaucoup plus complexes qu'on ne le croyait jusqu'alors.

• LES ÉCHECS DU CLONAGE, UNE SOURCE DE CONNAISSANCES FONDAMENTALE EN EMBRYOLOGIE

Quelle que soit l'espèce considérée, l'efficacité de la technique de transfert de noyaux, exprimée à partir du taux d'embryons reconstitués qui se développent en jeunes viables, est faible, de l'ordre de 1 à 5 % seulement.

Chez la souris, moins de 2 % des embryons reconstitués à partir de noyaux somatiques se développent en jeunes viables, mais ce taux n'est au mieux que de 5 % quand on utilise des noyaux de cellules embryonnaires non différenciées (RIDEOUT *et al.*, 2000). Par contre le génotype des cellules donneuses et leur condition de mise en culture, même pour une courte période, sont des facteurs importants de succès.

Dès son introduction dans le cytoplasme de l'ovocyte, le noyau somatique va subir des modifications importantes de son organisation. Mis en présence d'un cytoplasme d'ovocyte non activé, son enveloppe nucléaire est rapidement désorganisée. La chromatine est exposée aux facteurs de l'ovocyte et l'activité de synthèse du génome est réprimée, au moins partiellement, comme en atteste la disparition assez rapide des nucléoles. L'exposition du noyau étranger au cytoplasme de l'ovocyte est aussi marquée par des modifications biochimiques complexes comme l'acétylation des histones (les protéines de la chromatine, associées à l'ADN) ou des changements de l'état de méthylation de l'ADN qui favorisent la formation d'une structure chromatinienne compacte et inactive (BIRD et WOLFFE, 1999). Ces modifications épigénétiques participent à la réorganisation fonctionnelle du noyau en modifiant la conformation de l'ADN dont les séquences deviennent accessibles aux facteurs de transcription et fonctionnelles, ou au contraire masquées et inactives

Au cours du développement normal, la structure répressive à partir de laquelle se réalisera un contrôle étroit de l'expression de gènes spécifiques devient de plus en plus précise au fur et à mesure des premières divisions de l'œuf fécondé. Elle conduit à l'expression différentielle des gènes requise pour la réalisation des premières différenciations cellulaires. C'est au cours de cette période de division de l'œuf (la période de clivage) que s'initie normalement l'activité du génome zygotique. Chez la souris, cet événement survient au stade deux cellules et nous avons montré que la période de clivage de l'œuf correspond bien à une sorte de maturation progressive sur plusieurs jours, de la chromatine

qui précède l'apparition des premières différenciations cellulaires au stade blastocyste (THOMPSON *et al.*, 1995).

Les noyaux des cellules somatiques ont en général un niveau de méthylation élevé mais une activité méthyltransférase faible, alors que les noyaux des cellules embryonnaires ont un niveau de méthylation faible mais sont activement et différenciellement méthylés après la formation du blastocyste (REIK, DEAN et WALTER, 2001). Nous avons montré que dans le cas des embryons bovins clonés, les noyaux somatiques conservent un niveau de méthylation élevé pendant plusieurs divisions, mais sont déméthylés brutalement à partir du stade morula et non progressivement à chaque clivage, comme au cours du développement normal (BOURC'HIS *et al.*, 2001). Ces différences dans le profil de méthylation qui surviennent dès la période de clivage de l'embryon pourraient contribuer à l'apparition plus tardive des patrons anormaux de méthylation de régions spécifiques du génome observées à la naissance chez des veaux clonés (KANG *et al.*, 2001).

L'altération de gènes soumis à l'empreinte parentale fournit une autre piste pour étudier l'origine précoce des anomalies rencontrées après la naissance. Des données moléculaires chez la souris indiquent que l'environnement de l'embryon précoce peut directement induire une expression biallélique de certains de ces gènes (souris, DOHERTY *et al.*, 2000 ; mouton, YOUNG *et al.*, 2000). En comparant l'ADN de souris clonées, il a été observé des anomalies de méthylation dans certaines séquences répétées, présentes dans les régions promotrices de nombreux gènes (îlots CpG), associées à des différences de niveau d'expression de gènes soumis à empreinte parentale

(HUMPHERYS *et al.*, 2001; OHGANE *et al.*, 2001). Les syndromes observés avec les clones sont toutefois plus variés et différent de ceux décrits chez la souris après modifications ciblées de ce type de gènes.

Après clonage, une proportion élevée des embryons clonés (20 à 60 % selon les auteurs), est capable de se développer normalement jusqu'au stade blastocyste. Ce stade, atteint quelques jours après la fécondation (3,5 jours chez la souris, 7 jours chez le bovin), marque la période du développement à partir de laquelle s'établissent les premières différenciations cellulaires. Pourtant, bien que leur apparence soit identique à celle de blastocystes issus d'une fécondation normale (tant en ce qui concerne le nombre total de cellules que la proportion de celles qui donneront l'ectoderme primitif), moins de 10 % des blastocystes clonés seront capables de se développer en jeunes viables après transplantation dans une femelle receveuse. Chez la souris et le bovin, ce taux est environ 4 à 5 fois plus faible que celui obtenu avec des blastocystes issus de fécondation *in vitro*. La réalisation des premiers événements de différenciation de l'embryon ne révèle donc que très partiellement le potentiel de développement *in vivo* de l'embryon cloné.

A priori, une des premières difficultés quand on a recours à un noyau somatique est donc de tenter d'obtenir une répression de l'activité des gènes, de façon à permettre la seule activité des gènes normalement exprimés au début de l'embryogenèse. Ainsi le programme de développement peut être normalement engagé. Or on constate que l'on peut obtenir un début de développement d'apparence tout à fait normale, même quand la répression des gènes soma-

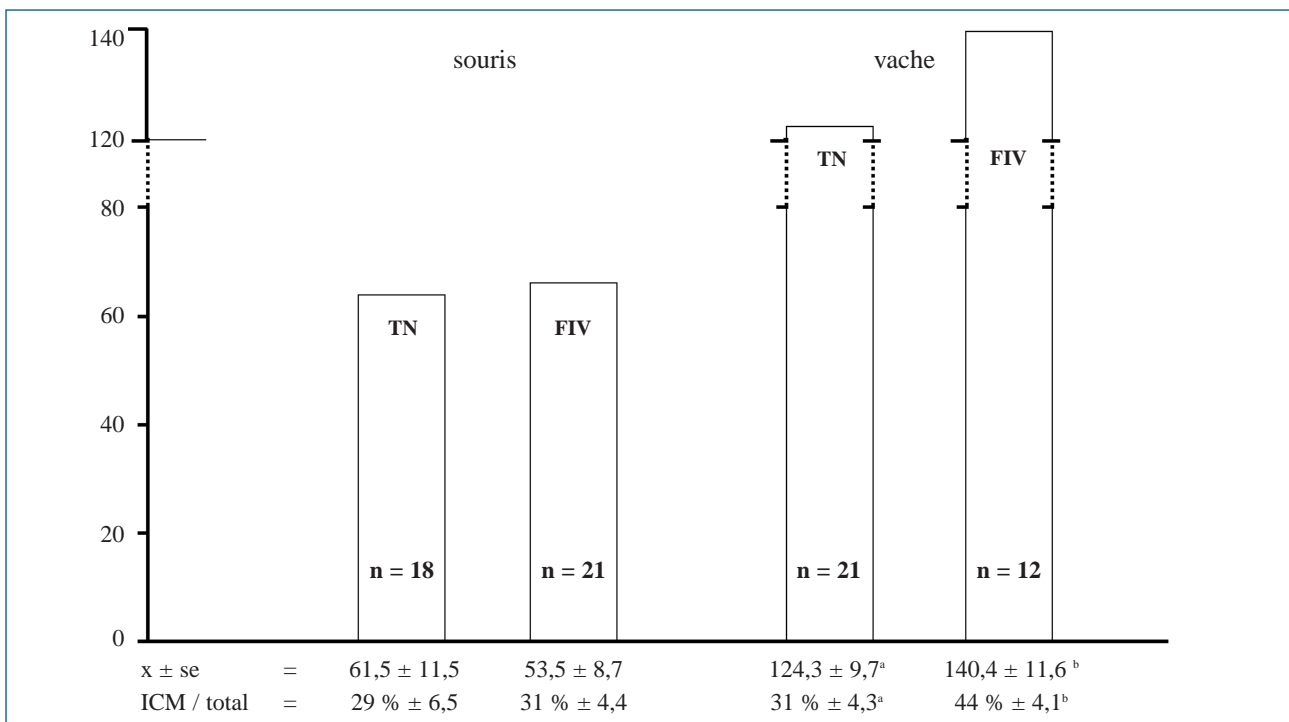


Figure 3 : Comparaison chez deux espèces, la souris et le bovin, de la distribution du nombre total et du taux de cellules à l'origine de l'embryon proprement dit (MCI, masse cellulaire interne) au stade blastocystes après clonage (TN, transfert de noyaux) ou fécondation *in vitro* (FIV), (d'après ZHOU *et al.*, 2001).

tiques n'est pas réalisée (GAO *et al.*, 2003). Comme le montrent les résultats présentés dans la figure 3, le taux de développement jusqu'au stade blastocyste et le nombre moyen de cellules à ce stade ne diffèrent pas de ceux obtenus après fécondation *in vitro* (ZHOU *et al.*, 2001 et nos données non publiées chez le bovin).

Ce n'est que plus tard, au moment où les axes du futur fœtus se mettent en place (période de la gastrulation) que des anomalies du développement commenceront à apparaître, qui conduiront en quelques jours chez la souris à une mortalité très importante puisqu'elle concerne plus de 80 % des embryons (JOUNEAU et RENARD, 2003). Cette période coïncide avec l'implantation de l'embryon, c'est à dire l'établissement de relations fonctionnelles avec l'organisme maternel, qui conduisent à la formation puis à la différenciation du placenta.

Chez la souris, nous venons de montrer (JOUNEAU *et al.*, article soumis) que les premières conséquences embryologiques des perturbations induites par des défauts de reprogrammation des noyaux, concernent la croissance des tissus embryonnaires au tout début de la période postimplantatoire. Le potentiel de différenciation du tissu à partir duquel se forme le fœtus, l'épiblaste, n'est pas affecté. Par contre, son potentiel de croissance l'est ainsi que celui d'un des tissus qui participera à la formation des annexes, l'endoderme viscéral. L'expression anormale de plusieurs gènes placentaires a été décrite à la naissance de souris clonées, mais on ne sait pas encore dans quelle mesure ces perturbations ont un effet sur la viabilité à long terme (après la naissance) des clones (HUMPHERYS *et al.*, 2002 ; Ogonuki *et al.*, 2002). Cet organe a un rôle clé dans l'ontogenèse des premières grandes fonctions de l'organisme comme la circulation sanguine, essentielle pour la croissance et la poursuite de la différenciation du fœtus (ROSSANT et CROSS, 2001). Il apparaît être directement en cause dans le taux élevé de mortalité observé au cours de la gestation. Chez les bovins, les défauts de développement du placenta sont bien aussi l'une des principales causes de la faible efficacité du clonage (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002a).

Ainsi, l'analyse des données de recherche suggère donc que les embryons clonés qui sont capables de se développer à terme sont ceux qui ont pu guérir des stigmates qui leur ont été infligés au cours du développement préimplantatoire et surtout peut-être fœtal. Leur histoire est différente de celle des embryons (et fœtus) issus de reproduction sexuée. Ces données jettent un éclairage nouveau sur les interactions moléculaires et cellulaires qui contribuent au développement de l'embryon. Chez les ruminants, notamment le bovin, la durée de la gestation est longue (9 mois), ce qui permet de suivre beaucoup plus facilement que chez la souris l'évolution du fœtus cloné. En outre, l'embryon proprement dit commence à acquérir son plan de développement seulement deux semaines après la fécondation (lors de la gastrulation) pour s'implanter une semaine plus tard (20^e jour) ; chez la souris, ces deux événements sont quasiment concomitants et surviennent rapi-

dement entre le 4^e et le 6^e jour (5,5 jours) après la fécondation. On peut donc chez le bovin, beaucoup mieux que chez la souris, faire la part des événements qui régulent le début de la morphogenèse de ceux qui dépendent des relations avec l'organisme maternelle, *via* le placenta. Le bovin apparaît ainsi comme un modèle de choix pour étudier non seulement l'ontogenèse des défauts du clonage mais aussi celui de certaines physiopathologies régulièrement constatée à la naissance des clones.

• LE CLONAGE, UNE VOIE

Une des caractéristiques du clonage est le taux élevé de pertes embryonnaires et fœtales qui se produisent après transfert *in vivo* d'embryons d'apparence initiale pourtant normale (au stade blastocyste). Chez la vache et le mouton, ces pertes embryonnaires sont observées surtout au cours du premier trimestre de la gestation mais aussi très tardivement pendant la période périnatale. Elles sont apparemment surtout associées à des défauts de vascularisation du placenta, (HILL *et al.*, 2000; DE SOUSA *et al.*, 2001) et d'expression des gènes de classe 1 du système majeur d'histocompatibilité (HILL *et al.*, 2002).

Les fœtus clonés présentent fréquemment, à partir du 6^e mois de gestation, certaines des caractéristiques du syndrome LOS décrit précédemment. Ce syndrome représente plus du tiers des cas cliniques. Les animaux ont certes une taille et un poids supérieurs à la normale mais aussi leurs placentas (les placentomes) apparaissent oedémateux, en nombre réduit mais avec une taille plus grande que ceux d'un placenta dérivé d'embryons produits *in vivo*. Pour une partie d'entre eux, ce syndrome est associé à des difficultés respiratoires et à une faiblesse générale qui conduit à leur mort dans les dix jours après la naissance. L'autopsie des animaux clonés morts durant cette période révèle que plusieurs de leurs organes comme le cœur, le rein et le foie sont plus gros que ceux d'animaux témoins euthanasiés au même âge, alors que les poumons sont moins développés (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002a). L'étude histologique du foie de 6 fœtus ou clones morts-nés, diagnostiqués par échographie comme des cas de LOS, montre pour cinq d'entre eux des formes de stéatose avancée, alors que l'histologie est normale pour deux clones qui ne manifestaient pas les signes de ce syndrome après euthanasie à leur naissance (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2004). Bien que le nombre de fœtus observés soit encore faible, les caractéristiques très marquées des cellules hépatiques et leur ressemblance avec celles des clones mort-nés atteints de LOS, suggèrent que des perturbations plus ou moins graves dans la régulation du métabolisme des acides gras surviennent fréquemment au cours de la gestation des clones. Le fait que la concentration en leptine soit plus élevée en moyenne chez les clones à la naissance est un argument à l'appui de cette hypothèse (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002b).

Les autres anomalies observées dès la fin de la gestation chez les animaux clonés sont très diverses. Leur distribution, pour 18 cas de mortalité périnatale constatée à

l'issue de 58 gestations suivies pendant deux ans dans l'élevage de l'INRA (domaine de Bressonvilliers), est présentée dans la figure 4.

Parmi ces anomalies on retrouve des insuffisances cardiaques associées à un ventricule gauche très volumineux et une hypertension pulmonaire qui provoque des détresses respiratoires graves (HILL *et al.* 1999). Du fait de la faiblesse générale du veau, ces symptômes peuvent être considérés comme des manifestations du syndrome LOS dont la

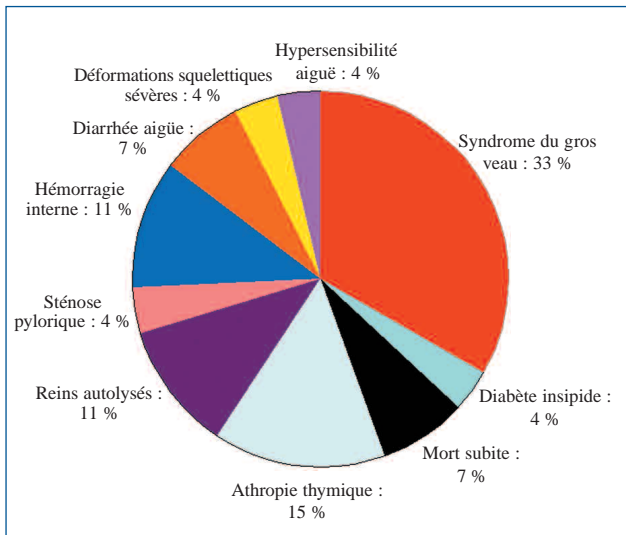


Figure 4 : Distribution des causes de mortalité des clones bovins (adapté de CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2004).

fréquence concernerait alors près de la moitié des clones à partir du dernier trimestre de gestation. Nous avons aussi observé des cas de dysfonctionnement rénal, avec des autolyse sur 2 fœtus de plus de six mois. À l'autopsie de 15 veaux mort-nés, 4 avaient des reins anormalement volumineux. Dans deux autres cas, des clones ont pu survivre malgré un taux d'urée et de créatinine très élevé pendant les quatre premiers jours après la naissance (nos données non publiées). Les images échographiques des reins semblaient normales et l'analyse urinaire indiquait un syndrome néphrotique qui a régressé en quelques jours de traitement symptomatique. Ces dysfonctionnements pourraient trouver leur origine dans des défauts de formation de l'allantoïs (hydroallantoïs, WINTOUR, LAURENCE et LINGWOOD, 1986). Une autre manifestation de ces défauts pourrait être la présence fréquente de vaisseaux ombilicaux de diamètre élevé, rendant nécessaire, après la rupture du cordon, une résection chirurgicale pour réduire les risques d'hémorragie, puis d'infection au niveau du cordon ombilical des clones (GIBBONS *et al.*, 2002; HEYMAN *et al.*, 2002; RHIND *et al.*, 2003). L'hypothèse d'une hypertension placentaire à l'origine des anomalies ombilicales ne peut pas non plus être écartée et elle n'a pour l'instant pas été examinée.

Enfin, au cours de la période critique des trois à quatre premiers mois après la naissance, les clones peuvent être fréquemment sujets à différentes infections alors que les animaux contemporains du même élevage mais issus de fécondation ne sont pas atteints (WELLS *et al.*, 1998 ;

VIGNON *et al.*, 1998; LEWIS *et al.*, 2000). Ces infections pourraient être favorisées par des déficiences plus ou moins prononcées du système immunitaire. Nous avons montré que le clonage pouvait induire une aplasie thymique chez les clones (RENARD *et al.*, 1999) et des défauts de développement du thymus sont retrouvés chez environ 15 % des clones qui meurent après la naissance (KUBO, 2002 et nos données non publiées).

Enfin, nous avons montré, dans une étude impliquant 22 clones, que le taux circulant d'IGF-II, le produit d'expression d'un gène soumis à empreinte parentale, était transitoirement plus élevé chez les clones à la naissance. Chez les animaux qui survivent, ce taux redevient normal après deux semaines. Par contre, ni les taux circulants d'IGF-I, ni les taux d'IGFBP estimés par western blots ne diffèrent significativement de ceux d'animaux témoins. Ces observations confirment l'existence de dérégulations de la croissance des clones au cours de leur vie fœtale. Ces dérégulations sont au moins en partie dues à des altérations dans le profil d'expression de gènes soumis à empreinte (YOUNG *et al.*, 2001). Elles concernent surtout la croissance de certains tissus fœtaux et en cela, évoquent les perturbations qui surviennent en cas de déséquilibre nutritionnel de la mère, perturbations qui altèrent les fonctions d'échanges placentaires (BARKER *et al.*, 2002). Pour un même génotype donneur, ces perturbations diffèrent d'un clone à l'autre, certains étant gravement affectés alors que les autres, soit environ la moitié des gestations qui arrivent à terme, sont d'apparence physiologique normale dès la naissance. La comparaison des caractéristiques physiologiques d'animaux clonés de même génotype devrait ainsi permettre d'évaluer avec précision l'importance des effets épigénétiques dans les caractéristiques phénotypiques des animaux.

• CONCLUSION

La technique de transfert de noyau montre que le cytoplasme de l'ovule peut induire des modifications dans le fonctionnement d'un génome, qui conduisent à la restauration de l'état totipotent du noyau différencié. Cet état totipotent marque le retour à un état embryonnaire fonctionnel compatible avec le développement complet d'un organisme aussi complexe qu'un mammifère. Pour cela le génome subit des modifications épigénétiques qui induisent un profil d'expression différent des gènes, transmissible d'une mitose à l'autre, sans pour autant modifier les séquences de l'ADN. En ce sens, les activités du noyau somatique ont bien été « reprogrammées ».

Le concept de programme a été forgé il y a plus de 40 ans par François Jacob et Jérôme Monod pour désigner la séquence d'informations requise pour les synthèse protéiques, séquence à la fois prédéterminée dans le génome et dépendante du temps. Le transfert de noyaux démontre la réversibilité de ce programme et renvoie au contrôle du temps pendant le développement d'un organisme vivant. Cette technique souligne aussi le rôle critique de l'environnement cytoplasmique, poussant à définir le concept de reprogrammation de façon plus précise,

comme « la dominance moléculaire d'un type de cellule sur une autre, qui aboutit à la réorganisation des molécules du noyau de la seconde par celles du cytoplasme de la première » (la cellule dominante, l'ovule énucléé, WESTERN et SURANI, 2002). Cette définition rigoureuse laisse toutefois ouverte la question de savoir si une reprogrammation complète des activités du noyau implique son retour dans le même état structural que celui du noyau embryonnaire immédiatement issu de la fusion des deux noyaux parentaux. En d'autre terme, si l'horloge doit être remise à zéro. C'est un point essentiel car il met en question le recours même à l'image de « programme », largement utilisée en informatique pour désigner un ensemble d'opérations qui doivent être réinitialisées totalement pour pouvoir être déroulées à nouveau.

Avec le clonage, on réalise que l'organisme en développement manifeste un pouvoir d'adaptation bien plus large que ce que l'on croyait jusqu'alors. Le « programme » qui permet la construction d'un organisme vivant complexe est à la fois robuste et souple et sa réinitialisation au moment où l'on introduit le noyau somatique dans le cytoplasme de l'ovule n'est sans doute pas requise. Les génomes des clones issus des noyaux du même animal donneur sont donc amenés à fonctionner de façon différente au sein de chaque organisme en construction et cela dès le début du développement embryonnaire. Dire que les clones sont « génétiquement identiques », c'est en quelque sorte ne tenir compte que de l'ordre des bases le long de la molécule d'ADN et ne pas prendre en compte la façon dont cet ADN va fonctionner. Cela revient à réduire considérablement le pouvoir d'auto-organisation du vivant. Car les différences entre clones qui se manifestent surtout après l'implantation dans une femelle porteuse sont bien dues à des différences de fonctionnement de leurs génomes.

La longue durée de la gestation des ruminants, et surtout le fait que chez ces espèces, les premières différenciations au sein de l'embryon s'ordonnent (au moment de la gastrulation) avant l'établissement de relations fonctionnelles avec la mère lors de l'implantation (et non concomitamment comme chez la souris), font des ruminants de bons modèles pour analyser l'effet de l'environnement maternel sur la croissance d'un organisme déjà constitué. Les données cliniques sur les clones bovins et la possibilité chez l'espèce bovine de suivre sur le même animal le profil de variation de nombreux paramètres physiologiques, ont contribué à démontrer que les clones ne peuvent pas être des « copies conformes » puisque le fonctionnement de leur génome est modifié au cours de la gestation par les régulations épigénétiques. Ces régulations sont étroitement dépendantes, à des étapes critiques du développement, de l'activité métabolique des tissus en croissance, et le placenta joue un rôle décisif dans ce contrôle. Ces données montrent l'importance de la nutrition maternelle (et donc fœtale) dans le développement normal. Elles devraient contribuer à mieux comprendre l'origine gestationnelle de nombreuses physiopathologies.

Enfin, si les clones issus des cellules d'un même animal donneur ne sont pas génétiquement identiques, ni avec le génome de l'animal donneur, ni même entre eux, peuvent-ils seulement être considérés comme « normaux » (WILMUT, 2002) ? La réponse à cette question appelle un examen critique du concept de normalité et renvoie à une analyse philosophique fondamentale car « dans la mesure où des êtres vivants s'écartent du type spécifique, sont-ils des anormaux mettant la forme spécifique en péril, ou bien des inventeurs sur la voie de formes nouvelles » (CANGUILHEM, 1966) ?

BIBLIOGRAPHIE

- BARKER DJ, ERIKSSON JG, FORSEN T, OSMOND C. (2002) Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int. J. of Epidemiology*, **31**, 1235-1239.
- BIRD AP, WOLFFE AP (1999) Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell*, **99**, 451-454.
- BOURC'HIS D, LE BOURHIS D, PATIN D, NIVELEAU A, COMIZZOLI P, RENARD JP, VIEGAS-PEQUIGNOT E (2001) Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol.*, **11**, 1542-1546.
- BRIGGS R, KING TJ (1952) Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **38**, 455-463.
- CANGUILHEM, G. (1966) In : *Le normal et le pathologique*, Presse Universitaire de France (éd.), collection « Quadrige », pp 88-89.
- CHAVATTE-PALMER P, CONSTANT F, GUILLOMOT M, HEYMAN Y, RICHARD C, RENARD JP (2002a) Fetal and placental growth perturbations in cloned cattle. *Placenta*, **23**, A15.
- CHAVATTE-PALMER P, HEYMAN Y, RICHARD C, MONGET P, LEBOURHIS D, KANN G, CHILLIARD Y, VIGNON X, RENARD JP (2002b). Clinical, hormonal and hematological characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol. Reprod.*, **66**, 1596-1603.
- CHAVATTE-PALMER P, REMY D, CORDONNIER N, ISSENMAN H, LAIGRE P, HEYMAN Y, MIALOT JP (2004) Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning and stem Cells*, **6**, 94-100.
- DE MONTERA B, BOULANGER L, TAOURIT S, RENARD JP, EGGAN A. (2004) Genetic identity of clones and methods to explore DNA. *Cloning Stem Cells*, **6**, 133-139.
- DE SOUSA PA, WALKER S, KING TJ, YOUNG LE, HARKNESS L, RITCHIE WA, TRAVERS A, FERRIER P, WILMUT I (2001). Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol. Reprod.*, **65**, 23-30.
- DOHERTY AS, MANN MR, TREMBLAY KD, BARTOLOMEI MS, SCHULTZ RM (2000) Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod.*, **62**, 1526-1535.
- FABER DC, FERRE LB, METZGER J, ROBL M, KASINATHAN P (2004) Agro-Economic Impact of Cattle Cloning. *Cloning Stem Cells*, **6**, 198-207
- GAO S, CHUNG YG, WILLIAMS JW, RILEY J, MOLEY K, LATHAM KE (2003) Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei. *Biol. Reprod.*, **69**, 48-56.
- GIBBONS J, ARAT S, RZUCIDLO J, MIYOSHI K, WALTENBURG R, RESPESS D, VENABLE A, STICE S (2002) Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, **66**, 895-900.
- GOVONI KE, TIAN C, KAZMER GW, TANEJA M, ENRIGHT BP, RIVARD AL, YANG X, ZINN SA (2002) Age-related changes of the somatotropic axis in cloned Holstein calves. *Biol.Reprod.*, **66**, 1293-1298.
- HEYMAN Y, CHAVATTE-PALMER P, LEBOURHIS D, CAMOUS S, VIGNON X, RENARD JP (2002) Frequency and occurrence of late gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol.Reprod.*, **66**, 6-13.
- HEYMAN Y, RICHARD C, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, LAZZARI G, CHAVATTE-PALMER P, VIGNON X, GALLI C (2004) Zootechnical performance of cloned cattle and offspring. *Cloning Stem Cells*, **6**,111-120.
- HILL JR, BURGHARDT RC, JONES K., LONG CR., LOONEY CR, SHIN T, SPENCER TE., THOMPSON JA, WINGER QA, WESTHUSIN ME (2000) Evidence for placental abnormality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.*, **63**, 1787-1794.
- HILL JR, ROUSSEL AJ, CIBELLI JB, EDWARDS JF, HOOPER NL, MILLER MW, THOMPSON JA, LOONEY CR, WESTHUSIN ME, ROBL JM, STICE SL (1999) Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies), *Theriogenology*, **51** (8), 1451-1465
- HILL JR, SCHLAFER DH, FISHER PJ, DAVIES CJ (2002) Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biol. Reprod.*, **67**, 55-63
- HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, HOCHEDLINGER K, RIDEOUT WM3RD, BINISZKIEWICZ D, YANAGIMACHI R, JAENISCH R (2001) Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, **293**, 95-97.
- HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, FRIEDMAN A, HOCHEDLINGER K, YANAGIMACHI R, LANDER ES, GOLUB TR, JAENISCH R (2002) Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12889-12894.
- JOUNEAU A, RENARD JP (2003) Reprogramming in nuclear transfer. *Current opinion in Genetics and Development*, **13**, 1- 6.
- KANG YK, KOO DB, PARK JS, CHOI YH, CHUNG A S, LEE KK, HAN YM (2001) Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature Genetics*, **28**, 173-177.
- KATO Y, TANI T, SOTOMARU Y, KUROKAWA K, KATO J, DOGUSHI H, YASUE H, TSUNODA Y (1998) Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, **282**, 2095-2098.
- KUBO M, (2002) Pathology of diseases in calves cloned by nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, **4**, 281.
- LANZA RP, CIBELLI JB, FABER D, SWEENEY RW, HENDERSON B, NEVALA W, WEST MD, WETTSTEIN PJ. (2001) Cloned cattle can be normal and healthy. *Science*, **294**, 1893-1894.
- LEWIS IM, PEURA T, OWENS JL, RYAN MF, DIAMANTE MG., PUSHETT DA., LANE MW, JENKIN G., COLEMAN PJ, TROUNSON AO (2000) Outcomes from novel simplified nuclear transfer techniques in cattle. *Theriogenology*, **53**, 233.
- Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Tanemura K, Suzuki O, Nakayama H, Doi K, Ohtomo Y, Satoh M (2002) Early death of mice cloned from somatic cells. *Nature Genetics*, **30**, 253-254.

- OGURA A, INOUE K, Ogonuki N, LEE J, KOHDA T, ISHINO F (2002) Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. *Cloning Stem Cells*, **4**, 397-405.
- OHGANE J, WAKAYAMA T, KOGO Y, SENDA S, HATTORI N, TANAKA S, YANAGIMACHI R, SHIOTA K (2001) DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis*, **30**, 45-50.
- PACE MM, AUGENSTEIN ML, BETTHAUSER JM, CHILDS LA, EILERTSEN KJ, ENOS JM, FORSBERG EJ, GOLUEKE PJ, GRABER DF, KEMPER JC. (2002) Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol. Reprod.*, **67**, 334-339.
- REIK W, DEAN W, WALTER J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, **293**, 1089-1093.
- RENARD JP (2003) Clonage de l'animal et transgénèse. In : *De la transgénèse animale à la thérapie chez l'homme*. Rapport sur la science et la technologie N°14, Académie des Sciences, Éditions Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 29-51.
- RENARD JP, CHASTANT S, CHESNÉ P, RICHARD C, MARCHAL J, CORDONNIER N, CHAVATTE P, VIGNON X (1999) Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *The Lancet*, **353**, 1489-1491.
- RHIND S., KING TJ, HARKNESS LM, BELLAMY C, WALLACE W, DESOUSA P, WILMUT I. (2003) Cloned lambs - lessons from pathology. *Nature Biotech.*, **21**, 744-745.
- RIDEOUT WM 3rd, WAKAYAMA T, WUTZ A, EGGAN K, JACKSON-GRUSBY L, DAUSMAN J, YANAGIMACHI R, JAENISCH R (2000) Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nature Genetics*, **24**, 109-110.
- ROEMER I, REIK W, DEAN W, KLOSE J (1997) Epigenetic inheritance in the mouse. *Curr Biol.*, **7**, 277-280.
- ROSSANT J, CROSS JC (2001) Placental development: lessons from mouse mutants. *Nature Review in Genetics*, **2**, 538-548.
- SINCLAIR KD, MC EVOY TG, MAXFIELD EK, MALTIN CA, YOUNG L, WILMUT I, BROADBENT PJ, ROBINSON JJ (1999) Aberrant fetal growth and development after *in vitro* culture of sheep zygotes. *J. Reprod. Fertil.*, **116**, 177-186.
- TAMASHIRO KL, WAKAYAMA T, AKUTSU H, YAMAZAKI Y, LACHEY JL, WORTMAN MD, SEELEY RJ, D'ALESSIO DA, WOODS SC, YANAGIMACHI R (2002) Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nature Medicine*, **8**, 262-267.
- TAMASSIA M, NUTTINCK F, MAY-PANLOUP P, REYNIER P, HEYMAN Y, CHARPIGNY G, STOJKOVIC M, HIENDLERER S, RENARD JP, CHASTANT-MAILLARD S (2004) *In vitro* embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biol. Reprod.*, **71** (2), 697-704.
- THOMPSON EM, LEGOUY E, CHRISTIANS E, RENARD JP. (1995) Progressive maturation of chromatin structure regulates HSP70.1 gene expression in the preimplantation mouse embryo. *Development*, **121**, 3425-3437.
- VIGNON X, CHESNÉ P, LEBOURHIS D, FLÉCHON JE, HEYMAN Y, RENARD JP (1998) Developmental potential of bovine embryos reconstructed with enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **321**, 735-745.
- VOGELSTEIN B, ALBERTS B, SHINE K (2002) Genetics. Please don't call it cloning! *Science*, **295**, (5558), 1237.
- WAKAYAMA T, SHINKAI Y, TAMASHIRO KL, NIIDA H, BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, OGURA A, TANEMURA K, TACHIBANA M, PERRY AC, COLGAN DF, MOMBAERTS P, YANAGIMACHI R (2000) Cloning of mice to six generations. *Nature*, **407**, 318-319.
- WAKAYAMA T, YANAGIMACHI R (1999) Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics*, **22**, 127-128.
- WALSH MK, LUCEY JA, GOVINDASAMY-LUCEY S, PACE MM, BISHOP MD (2003) Comparison of milk produced by cows cloned by nuclear transfer with milk from non-cloned cows. *Cloning Stem Cells*, **5**, 213-2219.
- WELLS DN (2003) Cloning in livestock agriculture. *Reproduction Suppl.*, **61**, 131-150.
- WELLS DN, FORSYTH JT, MCMILLAN V, OBACK B (2004) The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells*, **6**, 101-110.
- WELLS DN, MISICA PM, TERVIT HR, VIVANCO WH (1998) Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of Enderby Island cattle breed. *Reprod. Fertil. Dev.*, **10**, 369-378.
- WESTERN PS, SURANI MA (2002) Nuclear reprogramming: alchemy or analysis? *Nature Biotechnology*, **20**, 445-446.
- WILMUT, I. (2002) Are there any normal cloned mammals? *Nature Medicine*, **8**, 215-216.
- WILMUT I, SCHNIEKE AE, MCWHIR J, KIND AJ, CAMPBELL KHS (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, **385**, 810-813.
- WILSON JM, WILLIAMS JD, BONDIOLI KR, LOONEY CR, WESTHUSIN M, MCCALLA DF (1995) Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer and natural mating. *Anim. Reprod. Sci.*, **38**, 73-83.
- WINTOUR EM, LAURENCE BM, LINGWOOD BE (1986) Anatomy, physiology and pathology of the amniotic and allantoic compartments in the sheep and cow. *Aust. vet. J.*, **63**, 216- 410.
- YOUNG LE, FAIRBURN HR. (2000) Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. Review. *Theriogenology*, **53**, 627-648.
- YOUNG LE, FERNANDES K, MCEVOY TG, BUTTERWITH SC, GUTIERREZ CG, CAROLAN C, BROADBENT, PJ, ROBINSON JJ, WILMUT I, SINCLAIR KD (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics*, **27**, 153-154.
- YOUNG LE., SINCLAIR KD, WILMUT I (1998) Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, **3**, 155-163.
- ZHOU Q, JOUNEAU A, BROCHARD V, ADENOT P, RENARD JP (2001) Developmental potential of mouse embryos reconstructed from metaphase embryonic stem cell nuclei. *Biol.Reprod.*, **65**, 412-419.