

Nouvelles biotechnologies de la reproduction et perspectives d'applications en production animale

Y. HEYMAN

INRA Unité de Biologie du développement
78350 Jouy en Josas , France

Introduction

La reproduction chez les mammifères domestiques et en particulier les ruminants est de plus en plus maîtrisée avec l'utilisation de biotechnologies. La première d'entre elles, l'insémination artificielle, fait partie des pratiques courantes de l'élevage depuis plusieurs décennies. Plus récemment la transplantation embryonnaire, associée à la cryoconservation voire au sexage de l'embryon, a fait son entrée dans le domaine des productions animales et de la génétique, essentiellement pour multiplier des animaux d'élite et générer les futurs reproducteurs. Dans l'espèce bovine, près de 120 000 transplantations d'embryons ont été réalisées en Europe au cours de l'année 1997 (8). Cependant le transfert d'embryons est encore limité par deux facteurs importants qui sont d'une part le nombre relativement faible d'embryons que l'on peut obtenir in vivo après un traitement hormonal de superovulation, d'autre part la très grande variabilité de production entre femelles sélectionnées comme donneuses.

Deux nouvelles biotechnologies sont en train de progresser et vont encore faire évoluer l'activité de la transplantation embryonnaire: il s'agit d'une part de la production d'embryons in vitro par la technique de l'OPU-FV (Ovum Pick Up et Fécondation In Vitro), d'autre part le clonage embryonnaire ou somatique en vue d'obtenir des animaux génétiquement identiques. Nous allons nous limiter à ces deux technologies qui sont encore en grande partie du domaine de la recherche, et voir quelles sont les applications que l'on peut en attendre dans le domaine de l'élevage, mais aussi dans le domaine biomédical si le clonage est associé à la modification génétique des cellules par transgénése.

La production d'embryons in vitro: un atout pour la génétique

L'obtention d'embryons entièrement in vitro est maintenant réalisable chez les ruminants, en particulier bovins, ovins et caprins. Pour cela, des ovocytes prélevés dans des follicules à antrum, sont soumis à une maturation in vitro puis mis en présence des spermatozoïdes et enfin cultivés in vitro jusqu'au stade morula ou blastocyste requis pour leur transplantation dans l'utérus de la femelle receveuse. De nombreuses techniques ont été proposées et aboutissent maintenant à des rendements acceptables (6).

Des progrès spectaculaires ont été réalisés dans le prélèvement d'ovocytes sur l'animal vivant sous ponction échoguidée (OPU). Les sondes échographiques permettent de très bien visualiser la présence des

petits follicules à la surface de l'ovaire et la technique est au point pour récupérer de façon répétée les ovocytes sur le même animal, en l'absence de tout traitement hormonal que ce soit pendant le cycle ou bien même chez l'animal en début de gestation (4). Chez des vaches laitières en production, l'OPU réalisée 2 fois par semaine pendant plusieurs mois permet de prélever au total entre 100 et 150 ovocytes qui après maturation et fécondation in vitro aboutiront à l'obtention de 40 blastocystes environ. Dans ces conditions, l'OPU-FIV devient une sérieuse alternative à la superovulation. En effet un traitement de superovulation ne permet que la production de 5 embryons transplantables en moyenne sur une période de 2 mois. On peut donc estimer que le recours à l'OPU-FIV permettrait de tripler la descendance d'une vache génétiquement intéressante par rapport à la transplantation embryonnaire classique comme il est indiqué dans le tableau 1.

Il est également possible de féconder in vitro et cultiver individuellement des ovocytes jusqu'à l'obtention de blastocystes. On peut donc envisager de d'inséminer chacun des ovocytes prélevés lors d'une séance d'OPU avec des spermatozoïdes de taureaux différents et ainsi d'optimiser les accouplements in vitro "à la carte" jusqu'à l'obtention du nombre d'embryons nécessaire pour réaliser les objectifs définis dans le schéma de sélection (3).

L'utilisation d'ovocytes issus de jeunes femelles impubères pour la fécondation in vitro a été démontrée (11) mais les potentialités de développement à terme des embryons issus de tels ovocytes sont réduites et limitent encore leur application dans un schéma de sélection en vue de réduire l'intervalle de génération.

Du clonage embryonnaire au clonage somatique

Le transfert de noyaux issus des cellules d'un organisme, dans le cytoplasme d'ovules receveurs enucléés, permet de produire des animaux qui possèdent le même génome et constituent un clone. Depuis une dizaine d'années, les cellules de jeunes embryons au stade morula dont les noyaux sont encore totipotents, ont été greffés avec succès dans des ovules enucléés chez plusieurs espèces domestiques et ont abouti à la naissance de clones. C'est le cas des bovins, ovins, caprins, lapins et porcins (7) et l'on peut estimer que le rendement global du clonage embryonnaire est de l'ordre de 10% (il faut reconstituer 10 embryons par transfert de noyaux pour obtenir 1 jeune). Plus récemment, depuis l'annonce en 1996 de la naissance d'un clone de 2 agneaux issus de cellules fœtales de type fibroblastiques (1), les recherches se sont intensifiées et actuellement plusieurs types de cellules somatiques prélevées sur des animaux vivants sont utilisés (voir tableau 2). L'intérêt du clonage somatique est de pouvoir disposer de cellules issues d'un individu connu sur ses performances et non pas d'un embryon dont on ne peut qu'estimer le potentiel. Ces cellules somatiques prélevées à partir d'une simple biopsie, peuvent être multipliées in vitro, congelées voir modifiées génétiquement avant d'être utilisées comme source de noyaux. Globalement les rendements du clonage somatique ovin ou bovin sont

encore très faibles et le taux de noyaux transplantés qui aboutissent à la naissance d'un jeune est estimé entre 0,3 et 2% selon les équipes et le type cellulaire utilisé. On peut évaluer à une trentaine le nombre total de veaux nés de clonage somatique à travers le monde (tableau 2).

L'efficacité du clonage somatique est limitée par l'existence de mortalités foetales et périnatales relativement importantes. Ces effets à long terme du clonage seraient dus à des dérégulations des mécanismes de contrôle épigénétique des gènes qui se mettent en place au tout début du développement. Bien que le nombre d'observations sur des animaux issus de clonage somatiques soit encore faible, il importe de s'assurer de la normalité de tels animaux. Nous n'avons pas encore le recul nécessaire, mais une partie de ces animaux clones connaissent un développement tout à fait normal alors que d'autres peuvent présenter des syndromes post-nataux comme cela a été rapporté par certaines équipes chez le mouton ou la vache (10,17)

De nombreuses applications possibles

- Clonage et sélection.

La multiplication d'un animal par clonage permettra de mieux évaluer la connaissance de la valeur génétique des reproducteurs. Dans le cas des bovins laitiers, des calculs de simulation montrent que l'utilisation de clones embryonnaires femelles même limités à 5 individus par clone, permettrait d'augmenter les progrès génétiques obtenus dans des programmes de sélection intensifs intégrant déjà la transplantation embryonnaire (3). A plus long terme, le clonage somatique à partir de génotypes d'élites bien connus pourra avoir comme objectif la diffusion des gènes intéressants pour des caractères d'expression tardive comme ceux impliqués dans la résistance aux maladies ou la longévité de l'animal.

-Clonage et modèles Animaux:

Le fait de pouvoir disposer d'animaux génétiquement identiques est un atout important pour la recherche et l'expérimentation. Les exemples sont nombreux pour lesquels l'utilisation de clones permettrait la détection d'effets liés au traitement que ce soit pour les recherches en nutrition, reproduction ou immunologie. Le clonage peut améliorer la précision du dispositif expérimental tout en diminuant le nombre d'animaux nécessaires à cette expérimentation.

- Clonage et sauvegarde de races à très faible effectifs.

Pour un certain nombre d'espèces, domestiques ou sauvages, gravement menacées de disparition, le clonage somatique, à condition d'être utilisé à bon escient, pourrait contribuer au maintien de la diversité génétique. De toutes premières expériences réalisées en Nouvelle-Zélande ont permis de faire naître 4 femelles d'une race bovine dont il ne restait plus qu'un seul exemplaire ! (15). Ceci ouvre des perspectives

intéressantes pour intégrer le clonage dans les stratégies à mettre en oeuvre pour les programmes de sauvegarde (5).

-Clonage et transgénèse

La transgénèse consiste à intégrer dans le génome d'un embryon un gène étranger dans le but de faire produire à l'animal domestique des molécules d'intérêt pharmaceutique ou médical. Les techniques de transgénèse par microinjection d'ADN dans les pronoyaux de zygotes chez la vache, la brebis ou le porc sont encore très peu efficaces puisqu'il faut injecter entre 500 et 1000 embryons en moyenne pour donner naissance à un animal transgénique ! Par contre il est relativement plus facile de modifier génétiquement des cellules somatiques au cours de la culture in vitro, par transfection par exemple. Après isolement de ces cellules transfectées, il est possible de les utiliser comme source de noyaux pour le clonage et générer ainsi des animaux transgéniques . C'est cette approche associant clonage et transgénèse qui retient aujourd'hui toute l'attention des industriels. De nombreux projets sont en cours chez la brebis , la vache ou la chèvre pour utiliser l'animal domestique comme un biotransformateur efficace et lui faire produire des protéines étrangères d'intérêt médical dans le lait . On peut citer l'alpha antitrypsine pour traiter l'emphysème pulmonaire, la transferrine, l'albumine humaine ou des facteurs de coagulation du sang pour soigner les hémophiles.

Un autre objectif consiste à envisager la transgénèse ciblée pour intervenir de façon spécifique sur un gène et le remplacer ou l'inactiver . On pourra ainsi créer des animaux modèles de maladies humaines. Par exemple le lapin après inactivation du gène CFTR serait un très bon modèle d'étude de la mucoviscidose. De même par invalidation de certains gènes il deviendra possible de rendre compatibles les tissus animaux et humains pour des greffes d'organes (xénotransplantations) ou des thérapies cellulaires. Dans ce cadre, les recherches sur le modèle porc sont très actives dans le but de produire des organes (coeur, pancreas, rein) qui ne seraient pas rejetés après greffe.

Conclusion

Les applications potentielles des biotechnologies chez les animaux d'élevage sont très vastes , elles ont connu des avancées spectaculaires au cours des deux dernières années avec le clonage somatique adulte, mais elles nécessitent encore de nombreuses recherches à la fois fondamentales et appliquées avant d'être maîtrisées. Néanmoins l'évolution est en route et les techniques comme le clonage et la transgénèse vont devenir tout a fait complémentaires et ouvrir de nouveaux horizons non seulement dans le domaine de la zootechnie ou de la génétique animale mais surtout dans leurs applications en biomédecine .

References

- 1 Campbell K., Mc whir J., Ritchie W.A., Wilmut I., (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line . *Nature* 380 : 64-66.
- 2 Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J., Jerry J. Blackwell C., Ponce de Leon A. and Robl J.M. 1998 . Cloned transgenic calves produced from non quiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258.
- 3 Colleau J.J., Heyman Y. , Renard J.P.(1998) Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *INRA Prod. Anim* 11 (1) 41-56.
- 4 Den Daas N. and Merton S. (1994) In vitro embryo production: its use 10th AETE meeting, Lyon France, *Proceedings* pp 117-124.
- 5 FAO (1998) Lignes directrices pour la gestion des petites populations à risque, in "Initiatives pour la diversité des animaux domestiques, FAO (ed) , Rome, 229p
- 6 Hasler J.F., Henderson W.B., Hurtgen P.J., Jin Z.Q., Mc Cauley A.D., Mower S.A., Neely B., Shue L.S., Stokes J.E. Trimmer S.A. , 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43: 141-152.
- 7 Heyman Y. and Renard J.P. (1996) Cloning of domestic species. *Anim. Reprod. Sci.* 46: 871-880.
- 8 Heyman Y. (1998) Overall bovine embryo transfer activity in Europe, 14th AETE meeting, Venice, *Proceedings* p.61.
- 9 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.
- 10 Renard J.P., Chastant S., Chesné P., Richard C., Cordonnier N., Chavatte P. and Vignon X. (1999) Lymphoid hypoplasia and somatic cloning., *Lancet* 353 : (in press).
- 11 Revel F, Mermillod P., Peynot N., Renard J.P. and Heyman Y. (1995) Low developmental capacity of in vitro matured and fertilised oocytes from calves compared with that of cows *J. Reprod. Fertil.* 103: 115-120

- 12 Vignon X., Chesne P., LeBourhis D., Flechon J.E., Heyman Y., Renard J.P. (1998). Developmental potential of bovine embryos reconstructed from an enucleated matured oocyte fused with a cultured somatic cell. *C.R. Acad. Sci.* 321: 735-745.
- 13 Vignon X., LeBourhis D., Chesné P., Marchal J., Heyman Y., Renard J.P. (1999) Development of bovine nuclear transfer embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts. *Theriogenology* 51: 216.
- 14 Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K., Yanagimachi R. (1998) Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369.
- 15 Wells D., Misica P.M., Forsyth J.T., Berg M.C., Lange J.M., Tervit H.R., Vivanco W.H. (1999) The use of adult somatic cell nuclear transfer to preserve the last surviving cow of the Enderby island cattle breed. *Theriogenology* 51: 217.
- 16 Wells D., Misica P.M., Tervit H.R. (1999) Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol.Reprod.* 60: 996-1005.
- 17 Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell KHS. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells *Nature* 385: 810-813.
- 18 Zarkhatchenko V., Durcova-Hills G., Shemthaner W., Stojkovic M., Reichenbach H., Mueller S., Steinborn R., Wenigerkind H., Prella K, Wolf E., Brem G. (1999) Potential of fetal germ cells for nuclear transfer in cattle., *Mol. Reprod. Dev.* 52: 421-426.
- 19 Zarkhatchenko V., Shemthaner W., Prella K Stojkovic M., Brem G. , Wolf E. (1999) Nuclear transfer in the bovine embryo: developmental potential of cultured adult cells. *Theriogenology* 51: 218.

TABLEAU N° 1

Production d'embryons bovins in vitro par OPU-FIV, ou in vivo par superovulation.
Impact pour le transfert embryonnaire

	Animaux donneurs	Nb de collectes	Total par an	Nb moyen d'embryons par collecte	Nb total d'embryons par an	Taux de gestation	Nb veaux par femelle et par an
OPU-FIV	Vaches laitières	2 fois/semaine pendant 4 mois*	32	1,25	40	45%	18
collecte In Vivo	vaches laitières	2 traitements superovulation	2	5,0	10	50%	5

* ponctions effectuées pendant le début de la gestation

** collectes d'embryons avant la mise en reproduction

(d'après données INRA 1998)

TABLEAU N° 2

Clonage somatique: résultats obtenus avec différentes sources de noyaux

origine des cellules	espèce	nb de jeunes nés	efficacité globale	année (référence)
fibroblastes foetaux	brebis	2	1,2%	1996 (1)
	vache	> 10	1,28%	1998 (2)
peau (foetus)	vache	2	1%	1999 (13)
muscle (foetus)	vache	2	0.8%	1998 (12)
cellules germinales (foetus)	vache	1	0,6%	1999 (18)
glande mammaire (adulte)	brebis	1	0.3 %	1997 (17)
	vache	1	0,68%	1999 (19)
peau d'oreille (adulte)	vache	2	0,54%	1999 (10)
cellules granulosa (adulte)	vache	4	0.97%	1999 (15)
		10	1,3%	1999 (16)
cellules cumulus (adulte)	souris	> 100	0,94%	1998 (14)
	Vache	5	5,0%	1998 (9)
épithélium d'oviducte (adulte)	vache	3	2,0%	1998 (9)