

Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine: premiers résultats.

F.J. ECTORS, A. DELVAL, K. TOUATI, F. THONON, J.F. BECKERS et F. ECTORS

Centre de Recherches IRSIA-CERAD 2
Services d'Obstétrique et de Physiologie de la Reproduction
B41 Bât. de Radiologie + 1
4000 Sart-Tilman

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 de l'embryon ou du bouton embryonnaire en plusieurs parties. Cette approche est cependant limitée car l'on n'a jamais pu produire plus de 4 individus par embryon. C'est pourquoi depuis quelques années, de nombreuses 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'ovocytes énucléés, encore appelés cytoplastes. A l'heure actuelle, la greffe de noyau est devenue réalité. Elle a été réalisée pour la 1^{ère} fois chez les batraciens par Briggs et King (1952) qui ont réussi à implanter des noyaux de cellules embryonnaires de gre-

nouille dans des œufs dont le noyau avait été enlevé. Ces auteurs ont observé la naissance de têtards normalement constitués, 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 est plus compliquée car la période de totipotence du noyau embryonnaire est plus courte que chez les amphibiens. Elle a été réalisée pour la 1^{ère} fois : chez la souris par Mac Grath et Solter en 1983, chez les ovins par Willadsen en 1986 et chez les bovins par Prather et al. en 1987.

Actuellement, dans l'espèce bovine, la technique en est encore au stade expérimental, et si quelques succès sont enregistrés de par le monde (Tableau 1) le rendement global de l'opération est encore faible et ne dépasse pas 5 % à 10 % (Willadsen et al., 1991). Cependant, vu les avantages qu'une telle technique peut apporter à la sélection et à la multi-

RESUME

Le clonage par transfert de noyau fut réalisé pour la 1^{ère} 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. Néanmoins, 10 % des embryons reconstitués par transfert de blastomère et cultivés *in vitro* se développent jusqu'au stade blastocyste et ont donné lieu à des gestations.

Embryons donneurs	Développement in vitro		Naissances	Références
	morula/ blastocyste	%		
4-16 c.	23/185	12,0	2	Prather et al. (1987)
16 c.	92/493	18,6	/	Westhusin et al. (1991)
32-40 c.	84/375	22,0	/	Westhusin et al. (1991)
16-64 c.	280/1181	23,7	92	Bondioli (1991)
16-32 c.	10/102	9,8	/	Clement-Sengewald et al. (1992)
8-64 c.	/	/	101	Willadsen et al. (1991)
32 c.	19/96	19,8	/	Heyman et al. (1992)
32 c.	14/86	16,3	/	Heyman et al. (1992)

D'après Renard et Heyman (1992).

plication des animaux d'élite, nous avons entrepris d'importantes recherches dans ce domaine¹.

Matériels et méthodes

Les embryons donneurs

Les embryons donneurs ont soit été obtenus *in vitro* suivant le protocole décrit précédemment (Ectors et al, 1993), soit récoltés *in vivo* après superovulation des génisses ou vaches donneuses au moyen de 32 U Armour de pFSH additionnée de 40 % de pLH. Les embryons ont été récoltés soit par méthode non chirurgicale au jour 5 à 6 après l'insémination, soit par abattage et rinçage des oviductes et de l'utérus. 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 et Ectors (1991) pour le transfert direct.

Pour séparer les blastomères, l'embryon est maintenu par sa zone pellucide à l'aide d'une pipette, 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 est facilitée par l'emploi de PBS (phosphate buffered saline) dépourvu de CaCl₂ et de MgSO₄.

Les ovocytes receveurs

Les ovocytes immatures sont obtenus par ponction d'ovaires récoltés aux abat-

toirs. Seuls les follicules de 1 à 8 mm de diamètre sont ponctionnés, et les ovocytes entourés d'un cumulus oophorus dense et homogène, sont placés en maturation dans un milieu TCM 199 bicarbonate additionné de 20 % de sérum de vache en proœstrus, de 0,27 mM de pyruvate de sodium, de 0,5 µg/ml de pFSH, de 5 µg/ml de pLH, de 100 UI/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine. Après 24 heures, les complexes ovocytes-cumulus sont exposés pendant 4 minutes à l'action d'une solution d'hyaluronidase (Sigma: H-3506), à la concentration de 1 mg/ml, afin de dissocier le cumulus oophorus. Les dernières cellules de la corona sont éliminées par aspirations successives au travers d'une pipette calibrée.

a) Énucléation de l'ovocyte (Figure 1)

Une fois dénudés, les ovocytes sont sélectionnés en fonction de la présence du premier globule polaire. Ils sont ensuite exposés à un agent déstabilisateur du cytosquelette (cytochalasine B, Sigma: C-6762; 7,5 µg/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 de 110 µm et diamètre intérieur 25 µm) et d'une pipette d'aspiration plus fine (diamètre extérieur 30 µm, diamètre intérieur 20 µm) reliée à un microinjecteur de type Narishigé IM 5b. L'absence de noyau est contrôlée par incubation momentanée (10 minutes) des ovocytes avec un colorant (Hœchst 33342; Sigma B-2261; 5 µg/ml) et exposition temporaire (< 10 secondes) à la lumière UV. Les ovocytes énucléés, ou cytoplastes, sont remis en culture dans leur milieu de maturation pour une durée de 15 à 17 h.

b) Transfert de blastomère (Figure 2)

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 Kvoults/cm pendant 50 mi-

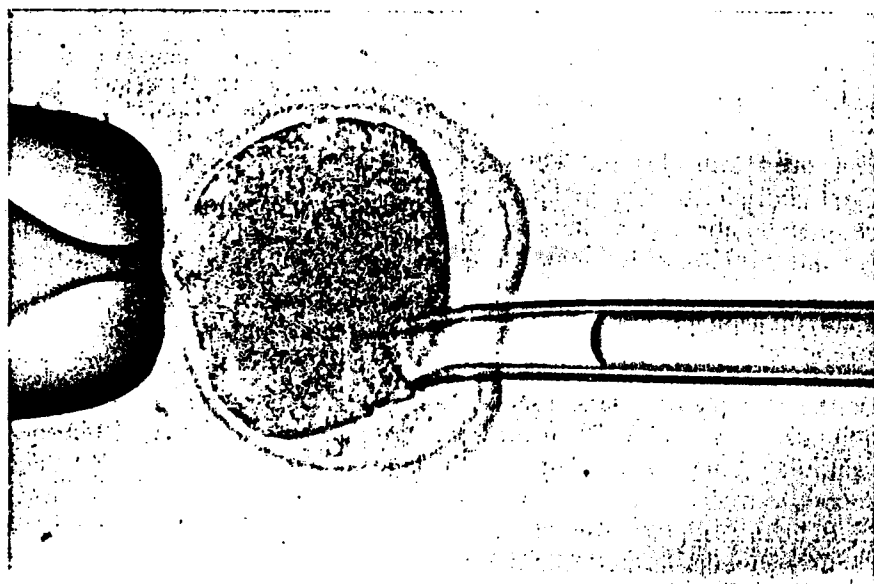


Figure 1

Énucléation de l'ovocyte (≅ 150 µm): vu la forte concentration en lipides du cytoplasme, le noyau de l'ovocyte n'est pas visible et l'énucléation est réalisée en aveugle par aspiration du globule polaire (G.P.) ainsi que du 1/3 de cytoplasme sous-jacent. Le noyau en métaphase est normalement situé à proximité du G.P. (grossissement : × 200).

¹ Ces recherches ont été réalisées sous les auspices de l'IRISA.

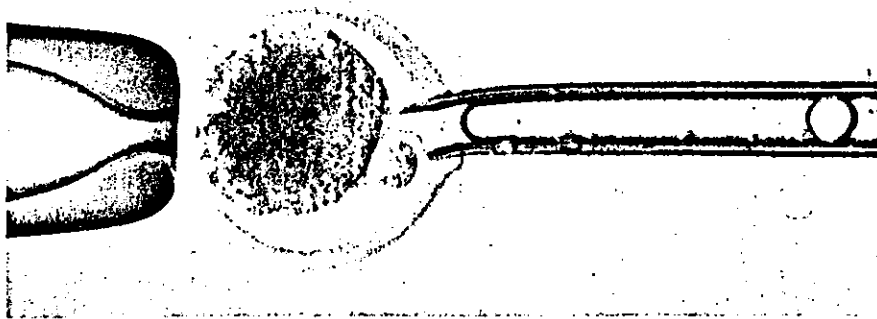


Figure 2
Transfert d'un blastomère dans l'espace périvitellin d'un ovocyte énucléé.
(Grossissement : $\times 200$).

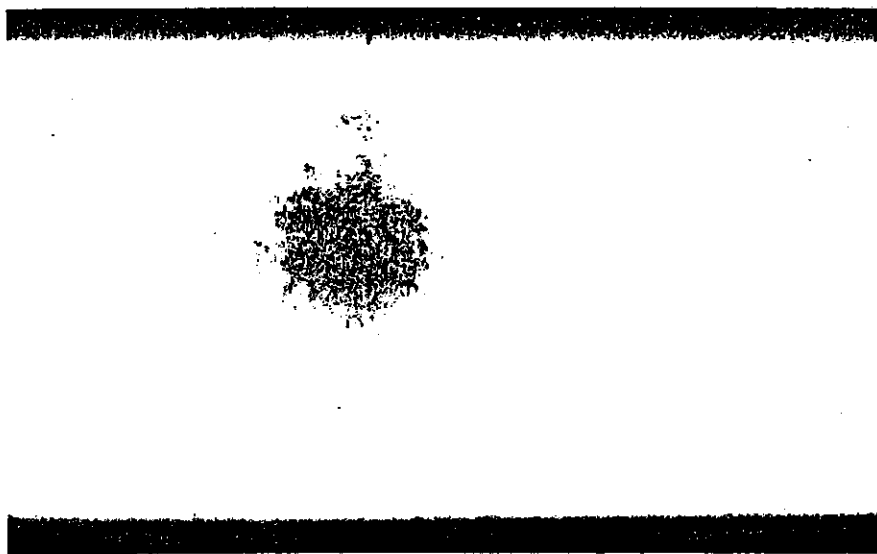


Figure 3
L'incorporation du noyau du blastomère dans le cytoplasme de l'ovocyte receveur nécessite la fusion de leurs membranes. Celle-ci est induite en soumettant le couple cytoplaste-blastomère à un champ électrique (une impulsion de 2,7 Kvolt/cm durant 50 microsecondes). Pour ce faire, l'embryon à reconstituer est placé entre deux électrodes parallèles distantes de 240 μm (traits noirs de la photo), de manière à ce que les membranes à fusionner soient disposées perpendiculairement au champ électrique. (Grossissement : $\times 200$).

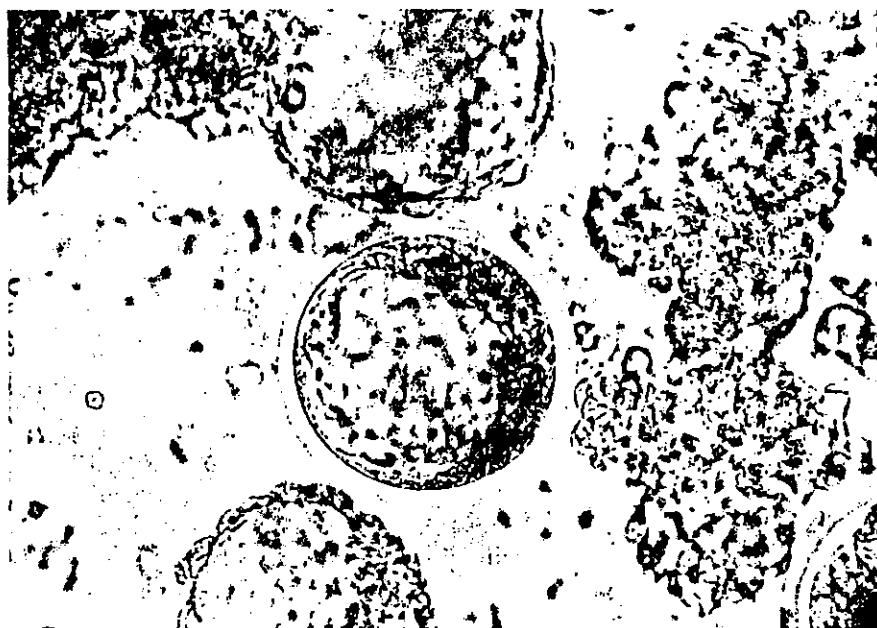


Figure 4
Blastocyste obtenu par clonage après sept jours de co-culture *in vitro* en présence de cellules épithéliales tubaires bovines (grossissement : $\times 200$). Les embryons bovins sont incapables de se développer *in vitro* au-delà du stade VIII cellules s'ils ne trouvent pas dans le milieu des facteurs protéiques sécrétés par les cellules de l'oviducte.

crosecondes), afin de provoquer la fusion des deux cellules et l'activation du cytoplaste (Figure 3). La chambre d'électrofusion est constituée de deux fils de platine de 100 μm de diamètre espacés de 240 μm . Elle est remplie d'un milieu non conducteur répondant à la composition suivante : mannitol (Sigma: M-1902; 0,28 M), CaCl_2 (0,01 mM) et MgSO_4 (0,1 mM). 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 létal pour les cellules.

Développement des embryons reconstitués (Figure 4)

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 Ménéz 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, et 7 jours en vue d'évaluer les pourcentages 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, et cela 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* (Tableau 2). Malgré des résultats assez décevants cette première partie du travail a permis de mettre au

TABLEAU 2

Résultats du clonage réalisé sans maturation prolongée des ovocytes, à partir d'embryons produits *in vitro*, et transfert des blastomères immédiatement après l'énucléation.

Le contrôle de celle-ci a été réalisé par fixation d'un échantillon, et a montré que 28,8 % des ovocytes n'étaient pas énucléés.

	%	Nb
Clivage	9,4	22/235
Stade VIII	3,4	8/235
Blastocyste	1,7	4/235

TABLEAU 3

Pourcentages de développement en fonction des différents types d'embryons donneurs.

Embryons donneurs	<i>in vivo</i> frais		<i>in vivo</i> congelés		<i>in vivo</i> frais	
	%	Nb	%	Nb	%	Nb
Taux de:						
Énucléation	71,0	406/572	64,0	98/153	72,1	101/140
Clivage	62,4	242/388	58,6	51/87	82,5	71/86
Stade VIII	20,1	81/388	12,6	11/87	31,4	27/86
Blastocyste	12,9	50/388	1,1	1/87	13,9	12/86

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 des 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 62,4 %; les pourcentages de stade VIII et de blastocyste restant respectivement de 20,1 et 12,9 %. 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* (Tableau 3).

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 8 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.

Dans nos conditions expérimentales, l'utilisation de donneurs congelés produits tant *in vivo* que *in vitro*, s'est toujours révélée fort décevante (Tableau 3).

Discussion

Les progrès accomplis en matière d'énucléation des ovocytes, de synchronisation des cycles cellulaires et de culture *in vitro* d'embryons nous ont permis de réaliser le clonage avec succès.

Les problèmes rencontrés dans la réalisation et le contrôle de l'énucléation ont été en grande partie résolus grâce à l'emploi du bisbenzimidazole (Hoechst 33342). Ce colorant se fixe spécifiquement et de manière réversible aux bases adénine et thymine de l'ADN. Westhusin et al (1992) ont montré que l'incubation avec ce colorant n'affecte pas la viabilité des embryons pour autant que l'exposition à la lumière ultraviolette soit contrôlée en intensité et en durée. L'introduction de cette vérification dans le protocole expérimental permet un contrôle strict de l'énucléation, et minimise les risques de polyploidie.

Une grande proportion des échecs du clonage par transfert de noyau s'explique par le manque de synchronisation des cycles cellulaires de l'ovocyte receveur et du blastomère donneur. Nous pouvons difficilement contrôler le cycle cellulaire des blastomères donneurs car, à partir du stade 16 cellules les divisions cessent d'être synchrones. L'aptitude des ovocytes receveurs à intégrer un noyau, quel que soit le stade de son cycle cellulaire, augmente en fonction de la durée de maturation. Heyman et al (1992) ont montré que les taux de clivage et de blastocyste sont plus élevés si l'on augmente la durée de maturation des ovocytes, soit 36 à 41 heures au lieu de 26 à 34 heures. Cette amélioration des résultats peut s'expliquer ou par une augmentation de la compétence des ovocytes, ou par une meilleure synchronisation des cycles cellulaires. En effet, une étude parallèle réalisée en collaboration avec le Professeur Koulisher montre que 24,2 % (22/91) des ovocytes sont encore en métaphase I au terme de la période normale de maturation *in vitro* de 25 heures (Kou-

lisher et al, 1993). D'autre part, la réduction du MPF minimise l'importance de la synchronisation des cycles cellulaires du cytoplaste receveur et du blastomère donneur (Prather et al, 1992; Campbell et al, 1993). En effet, après la maturation, l'ovocyte est arrêté en phase M de son cycle cellulaire par une forte concentration en MPF (Gerhart et al, 1984) qui est responsable de l'entrée de la cellule en division (Masui et Markert, 1971). Il s'ensuit que le transfert d'un blastomère dans un cytoplaste riche en MPF va être suivi du dédoublement de son génome. Seuls les blastomères au stade G1, c'est-à-dire n'ayant pas encore commencé à se diviser, sont donc transférables et donneront lieu à un développement embryonnaire normal. La prolongation du séjour des ovocytes dans leur milieu de maturation avec comme corollaire la réduction de la concentration ovocytaire en MPF, nous a permis de contourner le problème de la synchronisation des cycles cellulaires et d'utiliser les blastomères quel que soit le stade de leur cycle de division.

Le développement des embryons reconstitués doit être conduit jusqu'au stade blastocyste, afin de permettre leur transfert chez des receveuses synchrones. Théoriquement, trois possibilités de développement sont accessibles: le transfert temporaire dans des hôtes intermédiaires, la coculture avec des cellules épithéliales d'oviducte, ou le milieu conditionné par ces mêmes cellules. La technique du transfert dans un hôte intermédiaire a été abandonnée car cette méthode, bien qu'offrant les taux de développement les plus élevés, est lourde du point de vue technique et occasionne la perte d'un grand nombre d'embryons suite à la perforation de la zone pellicule. En effet, les contractions tubaires provoquent l'expulsion de l'amas cellulaire par le pertuis laissé lors des micromanipulations. Dans nos conditions expérimentales, l'utilisation des milieux conditionnés n'a pas été retenue car cette méthode nous a fourni des embryons constitués d'un nombre réduit de blastomères (Ectors et al, 1993). Nous avons préféré la troisième possibi-

lité, à savoir le développement des embryons en co-culture en présence de cellules épithéliales flottantes. Le contact entre ces dernières et l'embryon mime assez fidèlement les conditions présentes dans l'oviducte, tout en évitant les détériorations de l'embryon suite aux contractions tubaires. L'efficacité de ce type de co-culture a été démontrée aussi bien pour la production d'embryons *in vitro*, le développement d'embryons micromanipulés et de morulas donneuses de blastomères (Tableau 3).

La possibilité d'utiliser les embryons produits *in vitro* comme donneurs de blastomères est un acquis important car elle augmente de façon considérable l'efficacité du clonage en permettant la production d'un grand nombre d'embryons donneurs, une meilleure programmation du travail et surtout d'utiliser les embryons re-

constitués comme donneurs pour un second cycle.

En conclusion, les données présentées dans cet article montre l'état d'avancement de la recherche en Belgique sur le clonage par transfert de blastomère. Ces constatations démontrent que la production d'embryons bovins par clonage n'est pas encore parfaitement définie, pour que la méthode acquière son développement optimal, certaines limitations devront être surmontées, notamment en ce qui concerne la maturation des ovocytes et la synchronisation des cycles cellulaires. En attendant, la méthode devient accessible aux généticiens dans la gestion des schémas de sélection, et il faudra en tenir compte pour l'orientation future des programmes de multiplication des individus, des races ou des espèces d'intérêts zootechniques ou écologiques.

SUMMARY

In 1987, Prather et al. have performed the first embryo cloning by nuclear transfer in the bovine species. Since, many researchers tried 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; the maturation and the activation as the development and freezing of the cloned embryos need to be more investigated. An increase in embryonic mortality is also observed after transfer in a recipient cow. Nevertheless, 10% of the cloned embryos develop *in vitro* to the blastocyst stage and give pregnancies after transfer.

BIBLIOGRAPHIE

- BONDIOLI K.R. Nuclear transfer in cattle. *Proc. Int Symposium Anim. Biotech.*, Oct. 1991, Kyoto Japan.
- BRIGGS R., KING T.J. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1952, 38, 455-463.
- CAMPBELL K.I.S., RITCHE W.A., WILMUT I. Disappearance of maturation promoting factor activity and the formation of pronuclei in electrically activated *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 1993, 33, 199.
- CLEMENT-SENCEWALD A., PALMA GA, BERG U., BREM G. Comparison between *in vitro* produced and *in vivo* flushed donor embryos for cloning experiments in cattle. *Theriogenology*, 1992, 37, 196.
- ECTORS F.J., THONON F., DELVAL A., FONTES R.S., TOUATI K., BECKERS J.F. and ECTORS F. Comparison between culture of bovine embryos *in vitro* versus development in rabbit oviducts and *in vivo*. *Liv. Prod. Sci.*, 1993, 36, 29-34.
- GERHART L., WU M., KIRSCHNER M. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.*, 1984, 98, 1247-1255.
- HEYMAN Y., CHESNE P., RAO V.H., MARCHAL J., CAMOUS S., RENARD J.P. Gestional profile of recipient heifers following transfer of *in vitro* produced cloned blastocyst. 8e Réunion AETFÉ 11-12 sept 1992 Lyon: Mérieux éd, 1992, 164.
- HEYMAN Y., CHESNE P., RENARD J.P. Transplantation de noyaux et obtention de clones chez les mammifères domestiques. *Rev. Méd. Vét.*, 1991, 167, 315-322.
- KOULISCHER L., ECTORS F.J., JAMMAR M., HERENS C., BECKERS J.F. Chromosome studies of bovine oocytes matured *in vitro*. Accepted for oral presentation in VIII World Congress on In Vitro Fertilization and Alternate Assisted Reproduction, 15 September 1993, Kyoto.
- MASSIP A., VAN DER ZWALMEN P., MULNARD J., ZWIJSEN W. Atypical hatching of a cow blastocyst leading to separation of complete twin half blastocysts. *Vet. Rec.*, 1983, 112, 301.
- MASUI Y., MARKERT C.L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. exp. Zool.*, 1971, 177, 129-146.
- Mc GRATH J., SOLTER D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 1983, 220, 1300-1302.
- PRATHER R.S., BARNES F.L., SIMS M.M., ROBL J.M., EYESTONE W.H., FIRST N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryos: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 1987, 37, 857-866.
- PRATHER R.S., STUMPF T.T., RICHARDS L.F. Reprogramming the nucleus and synchronizing it with the cytoplasm. Proceedings of the symposium on cloning mammals by nuclear transplantation 26-28, 15 January 1992, Fort Collins.
- RENARD J.P., HEYMAN Y. La multiplication par clonage : un nouvel outil pour la sélection animale. *Cahiers Agricultures*, 1992, 1, 309-316.
- TOUATI K., ECTORS F. Congélation de demi-embryons par la méthode au glycérol-sucrose et transfert direct: premiers résultats. *Ann. Méd. Vét.*, 1991, 135, 287-289.
- WESTHUSIN M.E., PRYOR J.H., BONDIOLI K.R. Nuclear transplantation in the bovine embryo: a comparison of 5-day, 6-day, frozen thawed and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 1991, 28, 119-123.
- WESTHUSIN M.E., LEVANDUSKI M.J., SCARBOROUGH R., LOONEY C.R., BONDIOLI K.R. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows. *J. Reprod. Fert.*, 1992, 95, 475-480.
- WILLADSEN S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 1986, 320, 63-65.
- WILLADSEN S.M., JANZEN R.E., McALISTER R.J., SHEA B., HAMILTON G., McDERMAND D. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, 1991, 35, 161-170.