

Clonage par greffe de blastomère : naissance du premier veau

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

Centre de recherche IRSIA-CERAD II
Service d'Obstétrique et de Physiologie de la Reproduction
Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège
4000 Sart-Tilman

Manuscrit déposé le 01/10/1993.

Dans l'espèce bovine, la sélection et la multiplication des animaux d'élite constitue un travail de longue haleine et d'un succès souvent précaire du fait que par des méthodes naturelles on ne peut espérer plus d'un veau par vache et par an. Un progrès décisif a été réalisé avec la mise à la disposition des éleveurs des techniques telles que l'insémination artificielle, la superovulation et la transplantation embryonnaire. Si cette dernière est actuellement entrée dans la pratique courante, il n'en reste pas moins vrai qu'elle présente des limites et qu'elle conserve un caractère aléatoire. En effet, un traitement de superovulation suivi d'une récolte d'embryons peut être réalisé quatre à cinq fois par an et par vache; il permet d'espérer un nombre moyen de 5 embryons par récolte (données statistiques AETE, 1993), mais régulièrement les résultats sont variables voir nuls sans qu'aucune explication ne puisse être avancée.

Depuis quelques années, grâce à l'avènement des techniques de reproduction *in vitro*, il est possible de produire des embryons en grand nombre à partir d'ovaires prélevés aux abattoirs (Ectors et al, 1993a).

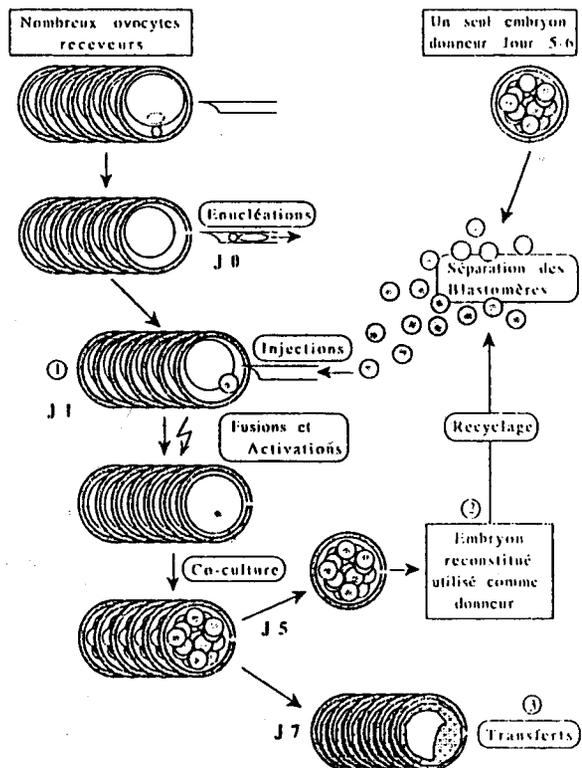


Figure 1 :
Schéma général du clonage.

Après séparation des blastomères provenant de l'embryon donneur, ceux-ci sont injectés dans l'espace périvitellin des ovocytes énucléés (1). La greffe du noyau du blastomère donneur dans le cytoplasme ovocytaire est consécutive à la fusion de leurs membranes, celle-ci est provoquée par une impulsion électrique. Les embryons reconstitués sont cultivés *in vitro* en présence de cellules tubaires (co-culture). Au 5ème jour de leur développement, l'un d'entre eux peut servir d'embryon donneur pour un second cycle de clonage (2), tandis que les autres sont cultivés jusqu'au 7ème jour en vue de leurs transferts dans des receveuses synchrones (3).

Une nouvelle étape a été franchie grâce à la mise au point du clonage par greffe de blastomère (Prather et al, 1987). Celui-ci permet de produire des veaux identiques à partir d'embryons provenant de parents de valeur zootechnique ou génétique élevée.

Le clonage consiste en un mode artificiel de reproduction asexuée. Il est réalisé par transfert de blastomères issus de l'embryon donneur dans l'espace périvitellin d'ovocytes préalablement énucléés. La fusion des membranes de l'ovocyte et du blastomère est réalisée en plaçant ces deux cellules dans un champ électrique. Grâce à cette fusion, le noyau du blastomère est greffé dans le cytoplasme de l'ovocyte. Outre la fusion des membranes, l'impulsion électrique induit également l'activation du cytoplasme ovocytaire, c'est-à-dire le démarrage de l'activité mitotique de l'oeuf. Les embryons reconstitués sont alors développés *in vitro* en co-culture en présence de cellules épithéliales tubaires bovines. Au 5ème jour de leur développement, une partie des embryons reconstitués peut servir de donneurs pour un second cycle de clonage, les autres étant cultivés jusqu'au 7ème jour en vue de leurs transferts dans des receveuses synchrones (voir figure 1). Un matériel et méthode plus détaillé a été décrit précédemment (Ectors et al, 1993b).

Le premier veau résultant du transfert à frais d'un embryon micromanipulé est né le 25/08/93 (voir figure 2). Ce veau n'a présenté aucune



Figure 2 :
Mannitol, le premier veau issu du clonage par greffe de blastomère, né par césarienne le 25 août 1993.

anomalie, et est né après une gestation de 288 jours. Son poids était de 40 Kg à la naissance. Sa croissance est normale.

Précédemment, nous avons montré que nous obtenions régulièrement plus de 12% de blastocystes après un cycle de micromanipulations (Ectors et al, 1993b), et depuis quelques mois, nous produisons régulièrement 5 à 6 embryons identiques à partir d'un seul donneur. Ces embryons ont été transférés à frais sur des receveuses synchrones. Les nais-

sances du premier clone de plusieurs veaux identiques sont attendues pour le mois de Décembre 1993. En fonction de ces derniers résultats, nous nous attachons dès à présent au développement d'un second cycle de clonage; un des embryons issus du premier cycle de micromanipulations est actuellement utilisé, au cinquième jour de son développement, comme donneur pour un deuxième cycle, les autres étant transférés dans des receveuses synchrones deux jours plus tard.

REFERENCES

AEETE : données statistiques nationales d'activité de transfert embryonnaire dans l'espèce bovine en Europe pour l'année 1992. Lyon 10 et 11 Septembre 1993.

ECTORS F.J., THIONON F., DELVAL A., FONTES R.S., TOUATI K., BECKERS J-F, 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.

ECTORS F.J., DELVAL A., TOUATI K., THIONON F., BECKERS J-F, ECTORS F. Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine : premiers résultats. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, 137, 427-431.

PRATHER R.S., BARNES E.L., SIMS M.M., ROBL J.M., EYESTONE W.L., FIRST N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryos: assessment of the donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 1987, 37, 857-866.