



Bénéfices et risques liés aux applications du clonage des animaux d'élevage

Septembre 2005

Membres du groupe de travail

Membres du comité d'experts spécialisé "Biotechnologie" :

Thomas HAERTLE
Louis-Marie HOUDEBINE
Patrick PRUNET
Jean-Pierre ZALTA

Membres du comité d'experts spécialisé "Santé animale" :

Marc SAVEY

Autres experts :

Bernard GUERIN (Laboratoire de contrôle des reproducteurs)
Jean-Louis GUENET (Institut Pasteur)
André-Laurent PARODI (ENV-Maisons-Alfort)

Consultation extérieure :

Jean-Jacques COLLEAU (SGQA, INRA, Jouy-en-Josas)
Pascale CHAVATTE-PALMER (INRA, Jouy-en-Josas)
Yves HEYMAN (INRA, Jouy-en-Josas)

Coordination scientifique et rédactionnelle

Sophie GALLOTTI
Maxime SCHWARTZ

Coordination éditoriale

Carole Thomann

Avant-propos

Le clonage des animaux peut présenter l'avantage de participer au progrès génétique en favorisant la diffusion de génomes validés dans les troupeaux. A travers le monde, en particulier aux Etats-Unis, au Japon et en Chine, les scientifiques, les sélectionneurs ainsi que les professionnels de la génétique conduisent de nombreux programmes de recherche dans l'objectif d'utiliser à terme les techniques de clonage au niveau des élevages et des productions animales. En Europe, la réflexion bioéthique qui a été associée à l'utilisation de ces techniques a conduit à réduire significativement les programmes de recherche. Plusieurs pays, dont la France demeurent cependant présents dans le domaine du clonage animal qui continue en particulier à intéresser les sélectionneurs bovins malgré ses imperfections.

La consommation de produits issus d'animaux clonés ou de leurs descendants apparaît désormais techniquement envisageable. Ceci impose qu'une évaluation des risques pour les consommateurs et les élevages soit menée.

Jusqu'à maintenant, la consommation des produits issus des animaux clonés fait l'objet d'un moratoire de fait partout dans le monde. Des études préliminaires mais convergentes indiquent qu'aucun des paramètres globaux mesurables (composition de la viande et du lait, présence de substances toxiques ou allergènes, comportement, santé, reproduction.....) ne suggère qu'un animal cloné est anormal. Toutefois, ces conclusions ne reposent que sur un nombre très restreint d'observations, notamment chez les animaux d'élevage.

Aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration a procédé à une évaluation des risques alimentaires des produits issus des animaux clonés et estimé que la viande et le lait de ces animaux étaient aussi sûrs que ceux des animaux conventionnels. Un comité scientifique américain a cependant demandé de surseoir à la publication de ce rapport considérant que les preuves apportées n'étaient pas suffisantes. Les autorités sanitaires australienne et néo-zélandaise ont établi une revue des données disponibles relatives à la sécurité des produits issus des animaux clonés et ont demandé d'adopter une approche de prudence avant de conclure à l'équivalence entre les produits issus d'animaux conventionnels et d'animaux clonés.

Toute avancée technologique comporte des risques mais également des bénéfices et le clonage animal n'échappe pas à cette règle. L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a souhaité dresser un état des connaissances en matière de clonage animal et d'évaluer les risques liés à la consommation des produits issus d'animaux clonés. Au-delà de ces aspects de sécurité sanitaire des aliments, les aspects génétiques, de diversité génétique, de santé et de bien-être animal ont aussi été considérés comme des éléments importants à prendre en compte dans cette évaluation.

Sommaire

INTRODUCTION	6
1 LE CLONAGE	8
1.1 Le principe du clonage	8
1.2 Les applications du clonage	11
1.2.1 Les applications du clonage en recherche	11
1.2.2 Les applications zootechniques du clonage	12
1.3 Les techniques du clonage	12
1.3.1 Introduction	12
1.3.2 L'énucléation de l'ovocyte	13
1.3.3 Le choix des cellules donneuses de noyau	13
1.3.4 Le transfert de noyau	14
1.3.5 Les possibles améliorations des techniques du clonage	15
1.4 Les mécanismes de la reprogrammation cellulaire	16
1.4.1 Les caractéristiques zootechniques des clones	16
1.4.2 L'identité génétique des clones	17
1.4.3 L'identité épigénétique des clones	18
2 LES APPLICATIONS DU CLONAGE DES ANIMAUX DOMESTIQUES : INTERETS ET LIMITES	19
2.1 Introduction	19
2.2 Les applications du clonage	19
2.2.1 Applications potentielles d'un clonage animal totalement maîtrisé	19
2.2.2 Conditions d'application	21
2.3 Aspects économiques du clonage	22
2.4 Intérêt du clonage pour la sauvegarde d'espèces ou de races en voie de disparition	22
3 RISQUES LIES AU CLONAGE : QUELLES CONSEQUENCES EN MATIERE DE SANTE ANIMALE AU PLAN PHYSIOLOGIQUE, PATHOLOGIQUE ET COMPORTEMENTAL ?	24
3.1 Introduction	24
3.2 Etat de santé et pathologies des animaux clonés et de leurs descendants	24
3.2.1 Maladies monofactorielles et multifactorielles	24
3.2.2 Maladies monofactorielles transmissibles, maladies multifactorielles et portage sain	25
3.2.3 Maladies génétiques	25
3.2.4 Développement des clones et problèmes recensés	26
3.3 Conséquences du clonage sur le bien-être des animaux d'élevage	26
3.3.1 Contexte	26
3.3.2 Impact sur le bien-être des animaux clonés	27
4 QUELS IMPACTS SUR LA GENETIQUE DES ESPECES CONCERNEES ?	28
4.1 Impact du clonage sur les génomes	28
4.2 Impact du clonage sur la réduction de la diversité génétique des populations en élevage	29
5 ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA QUALITE ET LA SECURITE ALIMENTAIRE DES PRODUITS ALIMENTAIRES ISSUS D'ANIMAUX CLONES	31
5.1 Composition du lait et de la viande	31
5.2 Digestibilité	31
5.3 Toxicité et alimentarité	32
5.4 Allergénicité	32
5.5 Mutagénicité	32
6 CONCLUSIONS	33
6.1 L'état physiologique des animaux clonés et de leurs descendants	33
6.2 L'état sanitaire des animaux	34
6.3 L'impact sur la génétique des espèces concernées	35
6.4 L'impact du clonage sur le bien être des animaux clonés	35
6.5 La qualité des produits alimentaires issus des clones	36
6.6 Conclusions et recommandations générales	36

ANNEXE : LE DISPOSITIF DE LA SELECTION GENETIQUE EN FRANCE -----	38
A.1 Introduction-----	38
A.2 Bilan des méthodes d'amélioration génétique des races d'élevage -----	38
A.2.1 Le dispositif de collecte et de gestion des données zootechniques -----	38
A.2.2 Le dispositif de sélection des reproducteurs-----	39
A.2.3 Contrôle de la qualité de la sélection-----	43
A.2.4 Le calcul des évaluations génétiques des reproducteurs -----	46
A.2.5 Spécificités de l'organisation de la sélection des races bovines à viande en France ----	47
A.3 Les techniques de reproductions pour l'amélioration génétique des races d'élevage -----	48
GLOSSAIRE -----	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	54

Introduction

Les biologistes comme les éleveurs recherchent des animaux présentant une large diversité génétique. Ceci permet aux biologistes de disposer de modèles pour étudier les fonctions biologiques et certaines maladies humaines. Les éleveurs bénéficient de cette manière des lignées d'animaux les mieux adaptées aux besoins humains en utilisant la variabilité génétique pour sélectionner les reproducteurs.

Pour atteindre ces buts, deux voies sont traditionnellement suivies : la reproduction sexuée et la sélection des individus les plus intéressants. Des progrès considérables ont été faits dans les cent dernières années pour optimiser ces voies d'amélioration des lignées animales. La maîtrise de la reproduction chez les animaux repose sur les méthodes suivantes : choix des géniteurs, insémination artificielle, collecte et transfert d'embryons, collecte et maturation d'ovocytes suivies d'une fécondation *in vitro* et d'un transfert d'embryon, conservation sur de longues durées des gamètes et des embryons. De son côté, la sélection devient de plus en plus précise au fur et à mesure que le choix des animaux d'une population et en particulier des géniteurs ne repose plus seulement sur une observation globale des individus mais sur des mesures biochimiques précises et sur la structure chimique de régions chromosomiques comportant des gènes d'intérêt [Quantitative Trait Loci (QTL) ou gènes marqueurs].

La reproduction sexuée est par essence génératrice de diversité génétique puisqu'elle implique une redistribution aléatoire des gènes parentaux. Cela conduit à la naissance d'individus qui, à l'intérieur d'une espèce ont tous les mêmes gènes mais sous des versions différentes. Ces combinaisons font que chaque individu est unique. La reproduction sexuée est donc une loterie qui favorise le maintien de l'espèce. Celle-ci dispose ainsi d'une diversité d'individus dont certains sont bien adaptés pour survivre à des changements environnementaux et d'autres le sont beaucoup moins.

La sélection a pour effet de réduire une part de la composante aléatoire dans la reproduction sexuée. Une méthode de reproduction capable de court-circuiter la reproduction sexuée est donc, en principe, un moyen de s'affranchir un peu plus du hasard. Le clonage permet d'atteindre ce but.

Si, chez les microorganismes la reproduction non sexuée est la règle, elle est aussi fréquente chez les plantes, naturellement via le marcottage et artificiellement via le bouturage et la culture de cellules. Dans le dernier cas, des cellules d'organes de plantes sont transformées en cellules embryonnaires au cours d'une simple culture. Ces méthodes sont largement utilisées en recherche et en production végétale. Chez les animaux, le clonage n'est actuellement possible qu'en transférant mécaniquement le noyau d'une cellule plus ou moins différenciée dans le cytoplasme d'un ovocyte préalablement énucléé.

Le clonage animal est une technique complexe et encore très empirique. Elle peut, en principe, être mise en œuvre pour procéder à des études fondamentales, pour accélérer le progrès génétique, pour obtenir des cellules capables de régénérer des organes endommagés ou pour engendrer des individus génétiquement identiques au donneur de noyau.

Malgré son efficacité limitée, la technique de clonage pourrait d'ores et déjà être exploitée pour pérenniser des géniteurs de haute valeur dans les élevages. Il est donc possible que, dans un avenir plus ou moins proche, des produits (lait, viande) provenant de descendants d'animaux nés par clonage (et non les clones eux-mêmes) soient proposés aux consommateurs. Il est également important de noter que l'amélioration génétique des animaux d'élevage via le transfert de gène, qui n'est qu'au stade expérimental, repose de plus en plus souvent sur la technique de clonage.

Cette nouvelle technique comporte encore un certain nombre d'inconnues. Cependant, il n'y a, *a priori*, aucune raison pour que des produits issus des clones et de leurs descendants comportent plus de risques pour le consommateur que des produits conventionnels, puisqu'ils proviennent d'animaux dont les performances zootechniques sont connues et que le clonage, par essence, réduit les aléas de la reproduction classique. Toutefois, une proportion relativement élevée des clones présente des désordres métaboliques divers à la naissance qui s'estompent le plus souvent dans les semaines qui suivent.

Le présent rapport fait le point sur les techniques de clonage et sur l'évaluation des risques que pourraient comporter les produits issus des animaux clonés au regard d'effets toxiques et allergènes éventuels. Ce rapport examine également les conséquences de l'utilisation de ces techniques sur la santé et le bien-être des animaux à court et long terme ainsi que, pour l'élevage, les conséquences d'une réduction de la diversité génétique qu'engendrerait la reproduction par clonage. Enfin, certains problèmes socio-économiques sont évoqués pour une mise en contexte de l'ensemble de la question. Il n'aborde aucun problème d'éthique.

Plusieurs rapports sur les risques qui peuvent provenir de la mise en œuvre des techniques de la reproduction, y compris du clonage, ont été publiés depuis 5 ans (AFSSA 1999 ; NAS 2002 ; Pew initiative 2002 ; ICSU, 2003 ; Seamark 2003).

Il est par ailleurs intéressant de noter qu'un colloque qui s'est tenu à Jouy-en-Josas en novembre 2003, à l'initiative de l'INRA et de L'OCDE, a fait le point sur les différentes études visant à évaluer les risques que pourrait soulever la consommation de divers produits issus des animaux clonés. Les actes de ce colloque sont publiés dans le numéro du mois de juin 2004 de la revue Cloning and Stem Cells.

1 Le clonage

1.1 LE PRINCIPE DU CLONAGE

Le développement d'un organisme vivant sexué passe par une série d'étapes dont la première est la fécondation. Le zygote ainsi formé contient une seule cellule qui renferme deux copies de chromosomes, l'une étant présente dans l'ovocyte et l'autre étant apportée par le spermatozoïde. Cette cellule est dite diploïde car elle contient deux copies de chromosomes comme toutes les cellules des organes qui en découlent et que l'on qualifie de somatiques.

La première cellule formant l'embryon se divise pour donner deux puis quatre cellules etc. Jusqu'au stade quatre cellules, chaque cellule est totipotente. Cela signifie que chacune de ces cellules a toutes les potentialités et notamment celle de pouvoir assurer le développement complet de l'organisme dès lors qu'elle est placée dans des conditions appropriées, en l'occurrence leur présence dans l'utérus chez les mammifères. Au-delà de ce stade de développement, les cellules de l'embryon perdent leur totipotence pour devenir pluripotentes. Ceci signifie qu'aucune de ces cellules, seule, ne peut assurer le développement complet d'un organisme, mais que chacune d'entre elle peut indifféremment participer à la formation de n'importe quel organe à la condition expresse d'être associée à d'autres cellules comme cela est le cas dans l'embryon au stade blastocyste. En continuant leurs divisions, les cellules se spécialisent progressivement. On dit qu'elles se différencient. Elles sont alors multipotentes, ce qui implique qu'elles ne sont plus capables que de participer à la formation de certains organes et tissus bien définis (exemple : les cellules de la moelle osseuse qui donnent naissance à l'ensemble des cellules sanguines, les globules rouges et les globules blancs). Le dernier stade consiste, pour les cellules, à se spécialiser complètement pour remplir, dans chaque organe ou tissu où elles se trouvent, les fonctions qui leur sont dévolues.

Ce processus, appelé différenciation, est considéré comme irréversible dans la mesure où une cellule différenciée, multipotente ou pluripotente ne redevient pas spontanément totipotente (figure 1).

A partir des cellules pluripotentes et multipotentes, il est possible d'établir des lignées de cellules dites cellules souches embryonnaires dans le premier cas et cellules souches d'organes dans le second. Par définition, une cellule est capable de se diviser à l'identique un très grand nombre de fois et de se différencier en cas de nécessité. Au cours du développement embryonnaire, les cellules souches se différencient spontanément sous l'influence des inducteurs qui se trouvent à leur contact. Les cellules pluripotentes des lignées de cellules souches embryonnaires peuvent se différencier lorsqu'on les réintroduit dans un embryon précoce ou que l'on ajoute à leur milieu de culture les inducteurs appropriés. Les cellules souches embryonnaires sont donc une source potentielle de cellules multipotentes ou différenciées pour régénérer des organes endommagés chez les patients. Les cellules souches d'organes amplifiées *in vitro* peuvent également contribuer à la régénération d'organes. Dans certaines situations, des cellules souches d'un organe peuvent se transformer en cellules souche d'un autre organe, selon un processus appelé transdifférenciation.

La formation des cellules sexuelles ou gamètes se fait à partir de cellules somatiques dérivées des cellules pluripotentes par un circuit court n'impliquant qu'un nombre réduit de divisions cellulaires. Les cellules sexuelles sont devenues haploïdes (ne contiennent plus qu'une copie de chromosomes) et la diploïdie est restaurée par la fécondation (figure1).

La reproduction sexuée crée un nouveau génome lors de la formation des gamètes et de la fécondation. Les chromosomes homologues échangent en effet leurs gènes de manière aléatoire lors de la formation des gamètes et ces nouvelles versions de chromosomes sont distribuées de manière également aléatoire pour former les gamètes haploïdes. La rencontre des gamètes lors de la fécondation ajoute encore une composante aléatoire à la reproduction sexuée. Ces mécanismes engendrent une diversité génétique permettant une adaptation des espèces aux pressions de l'environnement et de la sélection. Ils sont exploités par les sélectionneurs qui favorisent artificiellement l'obtention d'animaux répondant à leurs besoins.

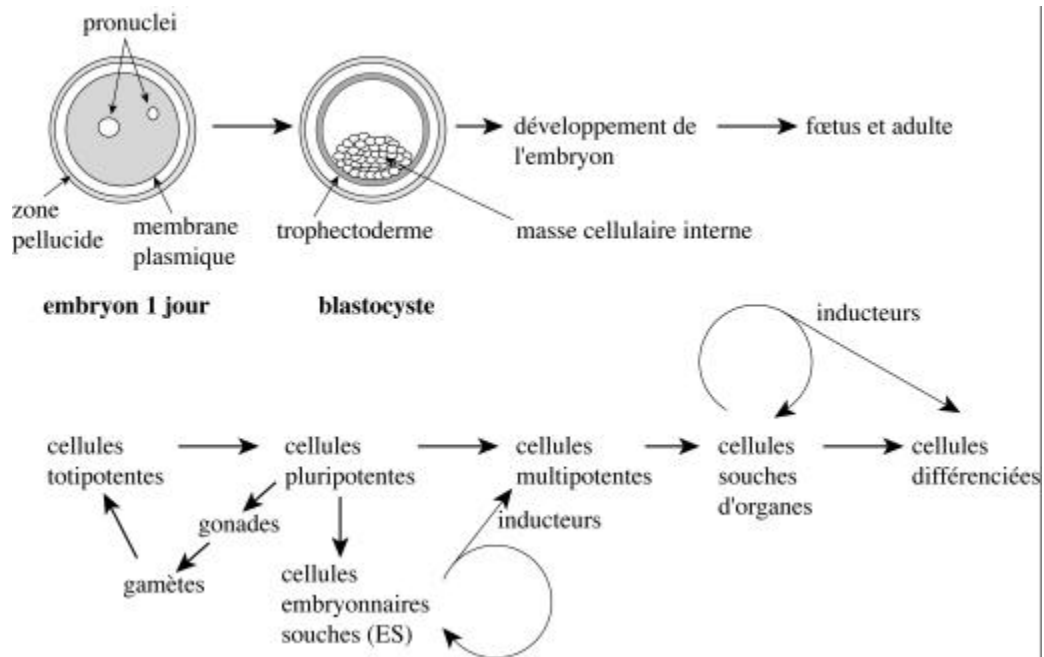


Figure 1 : Les différentes étapes du développement. Les cellules perdent progressivement et irréversiblement leur potentialité en se différenciant. Les gonades et les cellules sexuelles sont formées à partir des cellules pluripotentes en court-circuitant le processus général de différenciation.

La reproduction d'individus génétiquement identiques est généralement la règle chez les microorganismes et il en est de même pour les champignons qui peuvent se reproduire à partir de leur mycélium ; elle est relativement fréquente chez les plantes dans la reproduction à partir de bulbes ou de tubercules ou via la multiplication par marcottage, ou à partir de rhizomes ou de stolons. Le bouturage et le greffage contournent également le processus de reproduction sexuée et ils permettent de multiplier en grand nombre des plantes dont les propriétés phénotypiques sont connues. Ces pratiques de "multiplication végétative" sont rendues possibles par l'existence chez les plantes des méristèmes qui maintiennent un état indifférencié et assurent leur croissance. Ce mode de reproduction n'a pas lieu chez les animaux supérieurs.

Le clonage embryonnaire est un autre moyen de contourner la voie sexuée pour obtenir des organismes normaux et génétiquement identiques à leurs géniteurs (figure 2).

Le clonage chez les végétaux

Le clonage cellulaire chez les végétaux a été obtenu pour la première fois il y a environ 50 ans. Il consiste à dédifférencier *in vitro* des cellules différenciées de la plante. Des milieux de culture relativement simples permettent à ces cellules de redevenir totipotentes et donc, en principe, de pouvoir donner naissance chacune à une plante génétiquement identique à celle de départ. Sa mise en œuvre conduit dans certains cas à l'obtention de plantes présentant diverses anomalies génétiques ce qui en limite l'usage à grande échelle. Cependant, cette méthode est utilisée chez des espèces aussi variées que le caféier ou le palmier à huile. Le bouturage *in vitro* (ou micro bouturage), souvent associé à un traitement thermique, est utilisé pour débarrasser les plantes à reproduction végétative des virus qu'elles propagent. Les propriétés de régénération *in vitro* à partir de cellules uniques permettent, depuis 1983, la production de plantes transgéniques dont toutes les cellules porteront strictement la même insertion du transgène (Robert *et al.*, 1994).

Vers le clonage animal

L'approche développée chez les végétaux s'est rapidement avérée non transposable aux animaux. Il a donc fallu recourir à des méthodes plus sophistiquées pour permettre aux cellules somatiques de redevenir totipotentes. La méthode, qui a été définie il y a environ 50 ans, consiste à transférer le noyau d'une cellule dans le cytoplasme d'un ovocyte énucléé (figure 2).

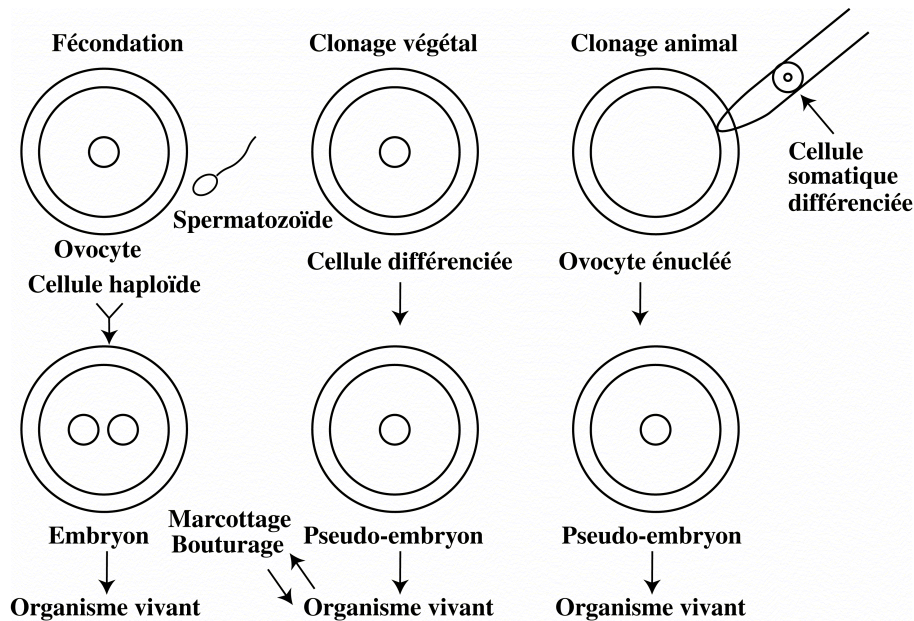


Figure 2 : Les différentes méthodes pour obtenir des cellules totipotentes. La fécondation engendre un embryon qui se développe selon le schéma de la figure 1. **Chez les plantes**, les cellules différenciées sous forme d'organes porteurs de méristèmes, peuvent donner des organismes normaux par marcottage ou bouturage. Les cellules végétales différenciées peuvent redevenir totipotentes *in vitro* puis se différencier pour donner naissance à des clones d'individus complets. **Chez les animaux**, le retour à la totipotence n'est possible que par l'action du cytoplasme d'un ovocyte énucléé. Dans les trois cas, la cellule obtenue est diploïde et totipotente et donc capable de donner naissance à un organisme vivant d'apparence normale. Les cellules totipotentes obtenues par clonage doivent donc être considérées comme des embryons à part entière.

Les premiers succès de transplantation nucléaire ont été obtenus chez les batraciens par Briggs et King (1952) qui ont obtenu des têtards normaux après transplantation de noyau de blastocystes dans des ovocytes énucléés. Cette technique a été principalement utilisée chez les amphibiens pour étudier les modifications du noyau des cellules somatiques au cours de la différenciation cellulaire pendant le développement chez le xénope et la grenouille (Gurdon, 1986 ; DiBenardino, 1987). Chez les poissons, les premiers essais de transplantation nucléaire ont été réalisés par des chercheurs chinois dans les années 1970 mais sans obtenir de résultats concluants. Dès 1979, Gasaryan et collaborateurs réalisent la transplantation de noyaux embryonnaires dans des ovocytes de loche et obtiennent des transplants nucléaires qui se développent jusqu'au stade éclosion mais pas au-delà. Parallèlement, plusieurs groupes chinois (Yan, 1989, 1998) produisent des hybrides nucléocytoplasmiques par transplantation de noyaux d'une espèce dans les ovocytes énucléés d'une autre espèce. Ces travaux pionniers réalisés chez la loche et chez les cyprinidés n'ont pas connu de développement ultérieur dans d'autres espèces.

Ces expériences ont été étendues au mouton en 1986 dans le but d'accélérer le progrès génétique chez les ruminants. Ce succès est resté trop limité pour donner lieu à des applications zootechniques. Le rendement de la méthode était faible et seules les cellules pluripotentes d'embryons précoces (morula-blastocyste) non cultivées, dont le patrimoine génétique n'était pas individuellement connu, conduisaient à l'obtention d'animaux vivants. Une étape décisive a été franchie lorsque, en 1996, des agneaux clonés sont nés à partir des cellules pluripotentes d'embryons maintenues en culture pendant plusieurs semaines (Campbell *et al.*, 1996). Les mêmes conditions expérimentales ont permis, peu après, la naissance d'agneaux clonés à partir de cellules fœtales et adultes différenciées (Wilmot *et al.*, 1997). La preuve était donc donnée que le génome des cellules différenciées pouvait donner naissance à des animaux viables.

Plus récemment, ces techniques de clonage ont été aussi développées chez les poissons. Ainsi, Wakamatsu et collaborateurs (2001) ont obtenu des transplants nucléaires fertiles à partir de noyaux

de cellules embryonnaires de medaka et ont montré la transmission mendélienne de gènes marqueurs dans la descendance de ces cellules transplantées. Le transfert de noyau à partir de fibroblastes provenant de culture à long terme (13 passages) a été réalisé en 2002 chez une autre espèce modèle, le poisson-zèbre (Lee *et al.* 2002).

1.2 LES APPLICATIONS DU CLONAGE

1.2.1 Les applications du clonage en recherche

Malgré les succès limités que rencontre la technique actuelle de clonage des animaux, plusieurs applications sont possibles ou en cours d'évaluation. Le clonage par transfert de noyau offre des possibilités sans précédent pour étudier les mécanismes de programmation génétique et de différenciation cellulaire. L'obtention de clones d'animaux de laboratoire permet d'évaluer avec une précision augmentée les propriétés de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. Le clonage est une technique qui a été adoptée par les expérimentateurs pour ajouter des gènes étrangers chez les ruminants et pour remplacer des gènes par recombinaison homologue chez les espèces autres que la souris. Cette espèce est en effet, en pratique, la seule qui se prête à l'obtention de chimères germinales transmettant aux descendants les mutations induites dans des cellules pluripotentes de type ES ou EG (figure 3).

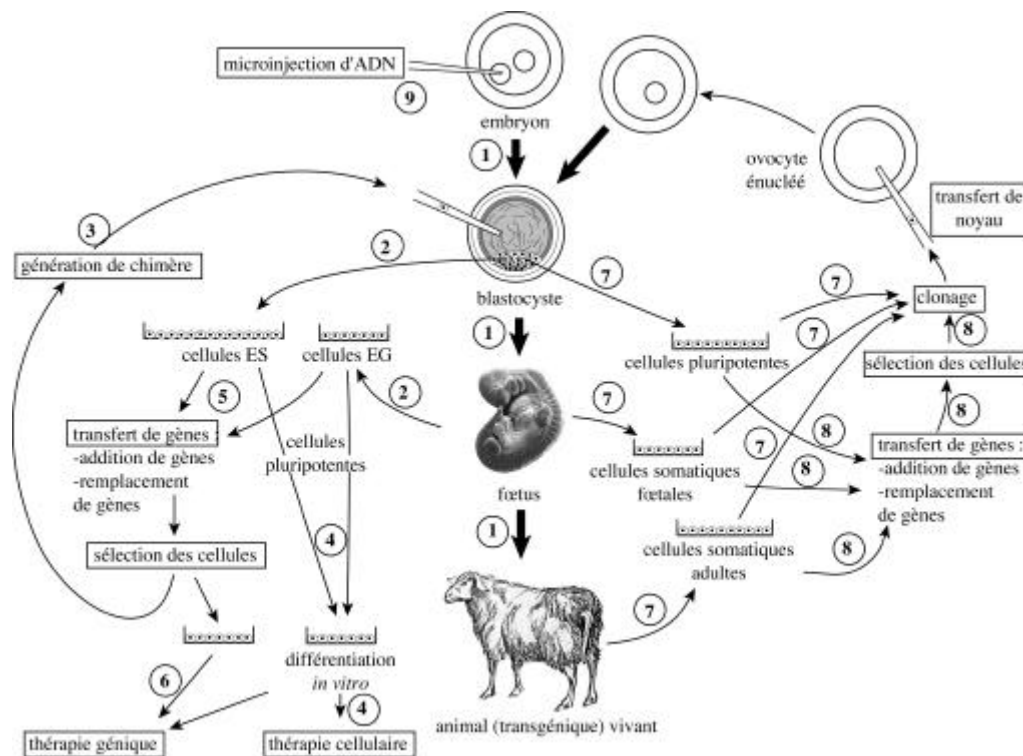


Figure 3 : Les relations possibles entre le clonage, la transgénèse, la thérapie cellulaire et la thérapie génique. 1) Développement normal de l'embryon ; 2) Etablissement de lignées de cellules pluripotentes à partir de la masse cellulaire interne de blastocystes (cellules ES) ou de gonades fœtales (cellules EG) ; 3) Les cellules pluripotentes réintroduites dans un blastocyste receveur participent au développement de tous les organes et donnent naissance à des animaux chimères ; 4) Les cellules pluripotentes peuvent se différencier *in vitro* et introduites chez des patients pour régénérer des organes endommagés (thérapie cellulaire), (la thérapie cellulaire peut également être réalisée avec des cellules souches d'organes ou des cellules déjà différenciées) ; 5) Des gènes peuvent être transférés dans des cellules pluripotentes utilisées ultérieurement pour engendrer des animaux chimériques transgénétiques (cette méthode est employée essentiellement chez la souris pour le remplacement de gène) ; 6) Des cellules pluripotentes ayant reçu un gène étranger peuvent se différencier *in vitro* et être utilisées pour des thérapies géniques (les thérapies géniques sont généralement réalisées à partir de cellules somatiques différenciées) ; 7) Des cellules pluripotentes ou différenciées provenant de fœtus ou d'adultes peuvent être utilisées pour le clonage par transfert de noyau ; 8) Les cellules qui ont reçu des gènes peuvent être utilisées pour engendrer des animaux clonés transgénétiques ; 9) Des gènes peuvent être introduits dans un embryon par micro-injection pour engendrer des animaux transgénétiques.

Une étude récente a montré qu'il était possible, chez la même vache, d'inactiver, par recombinaisons homologues successives suivies d'un clonage, les deux allèles de deux gènes, dont celui codant pour la protéine PrP qui joue un rôle majeur dans le développement de l'encéphalopathie spongiforme bovine (Kuroiwa *et al.*, 2004).

1.2.2 Les applications zootecniques du clonage

En permettant l'obtention d'animaux génétiquement identiques, le clonage pourrait offrir la possibilité de "faire revivre" des animaux de compagnie. Des chats clonés ont été obtenus dans ce but. D'autres animaux comme le chien le seront dans un avenir probablement pas très éloigné. La reproduction de tels animaux par clonage constitue un marché potentiellement intéressant du point de vue financier.

Le clonage de chevaux de jumping est en cours. Il représente un intérêt particulier dans la mesure où les meilleurs de ces animaux sont en général des mâles castrés. La castration avant la puberté rend ces animaux dociles mais également stériles. Leur reproduction n'est donc possible que par clonage.

Le clonage peut de plus, en principe, contribuer à sauver des espèces menacées d'extinction. Le noyau de cellules provenant de quelques individus de l'espèce pourrait être transféré dans le cytoplasme d'ovocytes énucléés d'une espèce voisine. Un mouflon cloné est ainsi né après transfert de noyau dans des ovocytes énucléés de mouton (Loi *et al.*, 2001). Ce succès tient probablement au fait que le mouflon est l'espèce dont dérive le mouton.

Le clonage permet enfin d'envisager une diffusion du progrès génétique en clonant des géniteurs dont les caractéristiques phénotypiques sont intéressantes pour l'élevage. Les bovins sont actuellement la seule espèce pour laquelle la reproduction par clonage est envisagée.

C'est cette dernière application qui implique la consommation des produits issus des animaux clonés ou de leurs descendants dont il est question dans ce rapport.

1.3 LES TECHNIQUES DE CLONAGE

1.3.1 Introduction

Le noyau du spermatozoïde dont l'ADN est recouvert de protamines et qui n'est transitoirement plus capable de se répliquer ni d'exprimer les gènes qu'il contient, subit rapidement de profondes transformations dans les heures qui suivent la fécondation. Au contact du cytoplasme de l'ovocyte, le noyau du spermatozoïde perd ses protamines qui sont remplacées par des histones et des protéines nucléaires régulatrices. Le noyau se décondense pour être visuellement semblable à celui de l'ovocyte moins de 24 heures après la fécondation. L'ADN des noyaux de l'ovocyte et du spermatozoïde peut alors se répliquer simultanément pour assurer la première division cellulaire de l'embryon. Dans les tous premiers jours du développement, (de 1 à 4 jours selon les espèces) le génome commence à être transcrit. Le cytoplasme de l'ovocyte a donc été capable de programmer le génome du spermatozoïde en rendant possible l'expression immédiate d'un grand nombre de gènes ainsi que l'expression future au cours du développement fœtal et chez l'adulte de l'ensemble des gènes de l'organisme. Au cours de la gamétogenèse et dans la période qui suit la fécondation jusqu'au stade blastocyste, l'ADN de l'embryon se déméthyle massivement rendant possible l'expression d'un grand nombre de gènes. A partir de "l'éclosion" et pendant l'implantation, l'ADN se reméthyle mais de manière sélective. Ce mécanisme participe au choix des régions du génome qui vont garder leurs capacités à transcrire les gènes qu'elles contiennent. Pour certains gènes, la région où ils se trouvent est méthylée sur l'un des chromosomes parentaux et non sur l'autre. Les gènes non méthylés sont les seuls qui restent activables. Ce phénomène qui est plus ou moins transmissible d'une génération à l'autre est appelé empreinte génétique. L'extinction d'un gène ne dépend donc pas, dans ces situations, de mutations de l'ADN mais de son inactivation locale. Ce type de phénomène est qualifié pour cette raison d'épigénétique.

La fusion expérimentale de cellules se traduit par l'obtention de cellules hybrides qui gardent, plus ou moins selon les cas, les spectres d'expression des gènes des deux cellules. Les hybrides entre des cellules somatiques et des cellules ES pluripotentes expriment pour l'essentiel les gènes des cellules

ES tandis que les gènes spécifiques des cellules somatiques s'éteignent chez ces cellules hybrides. Le gène *oct4*, dont l'expression est restreinte aux cellules pluripotentes, est ainsi réactivé dans les cellules hybrides dont l'une des partenaires est une cellule ES. Il en est de même pour les gènes du chromosome X rendus silencieux au cours du développement. Les gènes méthylés responsables du phénomène d'empreinte génétique sont également déméthylés et réactivés. Il est donc considéré que les ovocytes et les cellules pluripotentes ont un caractère dominant en ce qui concerne la programmation génétique (Jouneau et Renard, 2003). C'est cette propriété qui est mise à profit depuis 50 ans pour obtenir des clones d'animaux.

1.3.2 L'énucléation de l'ovocyte

Pour pouvoir bénéficier des propriétés de programmation génétique du cytoplasme de l'ovocyte, le noyau est tout d'abord retiré mécaniquement de ce dernier par aspiration. Le globule polaire qui contient le jeu de chromosomes éjectés de la cellule pour former le gamète haploïde et qui se trouve entre la zone pellucide et la membrane est aspiré en même temps.

Cette opération est traumatisante non seulement en raison de la relative violence mécanique qu'elle comporte mais aussi parce qu'elle s'accompagne du retrait d'environ un tiers du cytoplasme. Ceci abaisse d'autant les capacités de programmation de l'ovocyte. Des additions compensatoires de cytoplasme d'ovocyte atténuent quelque peu l'amplitude de ce phénomène. L'addition de cytoplasme d'ovocyte exogène ne paraît plus nécessaire lorsque le noyau du cytoplasme n'est pas retiré par aspiration mais par un clivage de la cellule à l'aide d'une lame tranchante qui sépare le noyau du reste de l'ovocyte.

1.3.3 Le choix des cellules donneuses de noyau

L'origine des cellules donneuses de noyau a une importance très grande sur l'efficacité du clonage. Les cellules pluripotentes des embryons non cultivées donnent les meilleurs rendements de clonage. Ce rendement baisse notablement lorsque ces cellules ont été cultivées pendant plusieurs semaines. L'efficacité du clonage baisse encore plus lorsque les cellules donneuses sont prélevées chez un fœtus et surtout lorsqu'elles proviennent d'un adulte (Wilmot *et al.*, 2002 ; Hiiragi et Solter, 2005).

Il semble donc que le retour à la totipotence soit d'autant plus difficile que la cellule donneuse de noyau est plus différenciée. Il est important de noter que l'utilisation de noyaux de lymphocytes B et T ont permis le clonage de souris. Le rendement de l'opération était particulièrement faible mais ces résultats ont levé une ambiguïté. Il est en effet toujours possible que le faible succès du clonage à partir de cellules primaires soit dû à la présence de cellules souches d'organes incomplètement différenciées et donc plus aptes à retrouver l'état de totipotence. Ce phénomène, s'il existe, ne paraît plus possible à partir de clones de cellules B et T dans lesquelles on peut identifier sans ambiguïté respectivement les gènes des immunoglobulines et des récepteurs qui ne sont réarrangés que dans ce type de cellules à l'état différencié (Hochedlinger *et al.*, 2002).

Le type cellulaire de la cellule donneuse de noyau est également important. Les cellules du cumulus chez l'adulte et les fibroblastes de la peau chez le fœtus sont parmi les meilleures donneuses de noyau sans que l'on ait pu en déterminer les raisons. Les données actuelles indiquent que le type de cellules utilisées comme donneuses de noyau a une influence sur le rendement du clonage mais non sur les caractéristiques physiologiques des animaux nés après transfert de noyau.

La situation physiologique des cellules donneuses et receveuses de noyau est également très importante. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne la phase du cycle de division cellulaire des deux cellules. Plusieurs stratégies sont possibles sans qu'il ait pu être prouvé que l'une d'entre elles soit incontestablement la meilleure (Wilmot *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2003).

Il est important de noter par ailleurs que certains animaux donneurs d'ovocytes ou de noyaux permettent d'obtenir systématiquement de meilleurs rendements de clonage que d'autres. Les mécanismes qui déterminent ces propriétés et qui apparaissent d'origine génétique sont inconnus (Powell *et al.*, 2004).

La santé de l'animal cloné dépendra étroitement de l'état sanitaire de l'animal donneur dont le noyau d'une cellule sera utilisé pour l'obtention du clone, de même elle dépendra de l'état sanitaire de la femelle receveuse. Tout évènement pathologique en cours de gestation pourra avoir un impact sur la santé du fœtus et du jeune animal cloné. En particulier, la présence dans les noyaux des cellules utilisées pour le clonage de génomes de certains virus en phase de latence (ex : Herpès virus) ou intégrés dans les gènes cellulaires (ex : rétrovirus) peut avoir un impact direct sur le développement cellulaire, le fœtus ou le jeune clone après la naissance. Tous ces éléments devront donc être pris en compte dans le choix des cellules donneuses et donc de l'animal donneur ou receveur.

1.3.4 Le transfert de noyau

Le transfert d'un noyau de cellule isolé dans le cytoplasme d'un ovocyte énucléé est mécaniquement possible mais il n'est en pratique suivi d'un développement embryonnaire que chez la souris. Il semble que l'architecture de la région du cytoplasme, qui entoure le noyau, soit essentielle et que la manipulation du noyau isolé en altère l'intégrité. Cependant, c'est cette technique qui est utilisée chez le poisson-zèbre et le medaka sans apparemment poser de problème particulier (les pourcentages de transferts nucléaires réussis sont identiques à ceux observés chez les vertébrés supérieurs).

La cellule donneuse de noyau est donc introduite mécaniquement, par micromanipulation, entre la zone pellucide et la membrane de l'ovocyte. Cette opération est suivie d'un traitement répété par un champ électrique qui a pour but d'induire la fusion des membranes plasmiques de l'ovocyte énucléé et de la cellule donneuse. Le noyau diploïde de la cellule se retrouve ainsi au contact du cytoplasme de l'ovocyte. Le nouvel édifice ainsi construit s'apparente fortement à un zygote. Le traitement par le champ électrique a également comme effet d'activer le nouvel embryon pour qu'il commence son développement. En effet, ce champ électrique induit la formation de pores dans la membrane de l'embryon ce qui permet au calcium ambiant de pénétrer dans le compartiment intracellulaire. Cet artifice mime en partie l'induction de flux de calcium qui est normalement déclenchée par des signaux provenant du spermatozoïde lors de la fécondation.

L'activation de l'embryon issu d'un transfert de noyau peut être également être induite par l'action d'ionophores à calcium (ionomycine ou A23187), par l'addition de DMAP (6-diméthylaminopurine) qui est un inhibiteur de kinase capable de provoquer l'inactivation du MPF (M-phase promoting factor) de l'ovocyte (Hwang *et al.*, 2004) ou par l'addition d'inhibiteurs de la synthèse protéique (cycloheximide) et d'inhibiteur du cytosquelette (cytochalasine).

Les effets de ces traitements ne sont pas tous connus. Il vient ainsi d'être mentionné que le DMAP, classiquement utilisé par les biologistes cellulaires pour inhiber la phosphorylation de certaines protéines, a des propriétés mutagènes très significatives.

La phase d'activation de l'ovocyte après le transfert de noyau est un point capital dans le succès du clonage. Les techniques ne sont pas les mêmes dans tous les laboratoires sans que les raisons qui ont amené les expérimentateurs à faire ces choix, soient toujours bien claires. Chez le porc, un groupe procède ainsi à un double transfert de noyau. Le premier se fait dans l'ovocyte énucléé. Le second consiste à extraire le noyau du zygote et à l'introduire dans un embryon au stade une cellule préalablement énucléé. Ce protocole repose sur l'idée que la reprogrammation se fait essentiellement en présence du cytoplasme de l'ovocyte tandis que le cytoplasme d'un embryon doit, selon les auteurs, être le mieux à même d'assurer le développement précoce de l'embryon.

Le rat a été, pendant des années, considéré comme une espèce se prêtant particulièrement mal au clonage. Chez cette espèce, la manipulation de l'embryon suffit à induire son activation qui n'est dès lors plus maîtrisée et est, de ce fait, asynchrone avec le transfert de noyau proprement dit. Le contrôle artificiel de l'activation à l'aide d'un inhibiteur de la cdc2-specific kinase, le butyrolactone, a rendu possible le clonage du rat (Zhou *et al.*, 2003).

Le clonage du lapin doit son succès également à un bon contrôle du synchronisme entre l'activation de l'ovocyte obtenu par transfert de noyau et son implantation dans une femelle adoptive (Chesné *et al.*, 2002).

1.3.5 Les possibles améliorations des techniques de clonage

Il est admis que les clones sont génétiquement identiques à leurs parents génétiques. La viabilité des clones et les diverses ressemblances phénotypiques ainsi que génotypiques ne suffisent pas strictement à conclure que ceci est véritablement le cas. Personne ne connaît en effet le statut génétique d'une cellule somatique utilisée comme donneuse de noyau. Ces cellules ne sont sans doute pas strictement génétiquement identiques. Des études basées sur la comparaison de multiples marqueurs génétiques sont en cours pour comparer les génomes des clones à ceux de leurs parents génétiques (De Montéra *et al.*, 2004).

Il reste raisonnable de considérer que la majorité des clones issus d'un même animal sont génétiquement identiques entre eux et à l'animal qui a donné son génome. En revanche, un certain nombre de gènes n'étant pas correctement exprimé, ces clones sont épigénétiquement modifiés.

Il reste dans ce domaine à confirmer que les descendants des clones ne sont plus épigénétiquement modifiés. Les tests appliqués aux clones pour mesurer systématiquement l'expression d'un grand nombre de gènes n'ont pas encore révélé si ces mêmes gènes ont repris un fonctionnement normal chez les descendants des clones.

Des études récentes ont montré que l'association artificielle de deux embryons clonés augmentait considérablement les chances de développement de ces embryons et la survie des nouveau-nés. Cette amélioration du devenir des clones s'accompagne précisément d'une forte augmentation de l'expression précoce du gène *oct4* qui est indispensable pour le développement embryonnaire (Houdebine, 2003). Cette étude montre que le processus de reprogrammation nucléaire n'a pas lieu seulement pendant le premier contact entre le noyau et le cytoplasme de l'ovocyte. La reprogrammation, qui implique des contacts directs entre les cellules de l'embryon, s'étale donc très vraisemblablement sur plusieurs jours. Ces résultats pourraient se traduire par une amélioration du clonage puisque huit fois plus de souriceaux vivants ont été obtenus par cette méthode de clonage.

Certaines expériences récentes montrent que les noyaux de fibroblastes peuvent être reprogrammés par des extraits de lymphocytes T. Les cellules ainsi modifiées expriment certaines fonctions spécifiques des cellules T (Hakelien *et al.*, 2002). Il est concevable que des extraits de cytoplasme ou des facteurs isolés et bien caractérisés puissent dédifférencier des cellules somatiques pour les rendre totipotentes. Le recours à des ovocytes pour le clonage ne serait alors plus nécessaire. Sans aller jusqu'à une situation aussi extrême, une expérience récente a montré que l'inoculation des cellules donneuses de noyaux perméabilisés avec des extraits de cellules en phase mitotique induit une condensation des chromosomes qui favorise le développement ultérieur des clones (Sullivan *et al.*, 2004).

Les ovocytes constituent un matériel limitant pour le clonage, chez certaines espèces en tout cas et particulièrement chez l'homme (Hwang *et al.*, 2004). Le transfert de noyaux humains dans des ovocytes de vaches énucléées a permis, il y a plusieurs années, d'obtenir des blastocystes ayant une apparence normale. Ces expériences ont été reprises en utilisant cette fois des ovocytes énucléés de lapin (Chen *et al.*, 2003). Une proportion importante des embryons a atteint le stade blastocyste. Des lignées de cellules pluripotentes ont pu être établies à partir de ces blastocystes. Des lignées de cellules différenciées ont ensuite été établies *in vitro* à partir des cellules embryonnaires. Ces cellules sont semblables aux cellules humaines. Ce procédé, s'il comporte encore des inconnues et s'il soulève des problèmes éthiques spécifiques pourrait constituer un moyen simplifié pour procéder à des clonages thérapeutiques chez l'homme et à des clonages pour des usages divers chez les animaux (Wakayama, 2004). Diverses combinaisons inter-espèces, entre cellules donneuses et ovocytes receveurs, ont été tentées et ont conduit à l'obtention de blastocystes. Une des plus récentes tentatives a consisté à transférer des noyaux d'embryon de poulet dans des ovocytes de lapin énucléés (Liu *et al.*, 2004). Une autre possibilité pourrait consister à exploiter une observation récente qui a montré que des cellules ES (pluripotentes) étaient capables de se transformer en ovocytes *in vitro* (Vogel, 2003). Ce procédé permettrait de disposer d'un grand nombre d'ovocytes génétiquement identiques sans devoir recourir à une ovulation.

1.4 LES MECANISMES DE LA REPROGRAMMATION CELLULAIRE

Une des caractéristiques spécifiques des animaux clonés est leur capacité limitée à survivre. Cette observation pose de nombreuses questions théoriques et pratiques qui ont d'ores et déjà reçu certains éléments de réponse. Il apparaît de plus en plus vraisemblable que les perturbations diverses du développement chez les animaux clonés proviennent essentiellement d'une mauvaise reprogrammation du génome de la cellule donneuse de noyau plutôt que de déficiences génétiques proprement dites. A défaut de pouvoir encore décrire ces phénomènes en détail, il est possible de dresser un inventaire des désordres biologiques que l'on observe chez les clones. Ceux-ci affectent plus ou moins la vie des animaux et ils doivent être en rapport avec les qualités sanitaires des produits alimentaires issus des clones.

1.4.1 Les caractéristiques zootechniques des clones

Les rendements des techniques de clonage sont faibles chez toutes les espèces, mais variables selon les conditions expérimentales. Le rendement va en décroissant lorsque les cellules donneuses de noyau sont d'origine embryonnaire (36 %), fœtale (15 %) ou somatique (5, 5 %). Le génome apparaît d'autant moins facilement reprogrammable qu'il provient d'une cellule plus différenciée.

Une des caractéristiques souvent observée des embryons clonés est l'arrêt de leur développement tout au long de la gestation et à la parturition. Après clonage à partir de cellules somatiques, 30 % de blastocystes bien conformés peuvent être obtenus (contre 50 % après fécondation *in vitro*). Seulement 15 % deviennent des fœtus et 5,5 % des adultes.

Il est admis que ces arrêts de développement sont dus à la non disponibilité des gènes requis pour franchir les étapes successives de la croissance. Cette non disponibilité pourrait être le fait de mutations induisant leur inactivation par hyperméthylation.

A la parturition ou dans les 6 mois qui suivent, environ 30 % des veaux meurent. Ils présentent de multiples anomalies morphologiques. Ils sont en particulier plus gros que les nouveau-nés normaux tandis que leur placenta est hypodéveloppé avec de nombreuses anomalies morphologiques et fonctionnelles (Heyman *et al.*, 2004 ; Chavatte-Palmer *et al.*, 2004 ; Wells *et al.*, 2004).

Parmi les animaux nés vivants, certains ne présentent aucune anomalie décelable. D'autres au contraire présentent toute une série de manifestations pathologiques qui sont essentiellement semblables d'un troupeau à l'autre et d'un laboratoire à l'autre. Parmi ces anomalies on peut citer : excès de poids, hépatites, pneumonies, obésité, faible capacité de cicatrisation, immunodépression, altération du système cardiovasculaire, hyperthermie chronique, désordres métaboliques, etc.

Ces syndromes disparaissent souvent au cours des deux premiers mois si les animaux sont traités de manière appropriée. Les animaux qui atteignent l'âge adulte sont normaux mais leur mortalité est plus élevée et imprévisible. Une partie de ces maladies a un caractère infectieux ce qui pourrait signifier que les animaux clonés ont un système immunitaire affaibli. Les clones ne semblent pas mourir de façon prématurée à la suite d'un vieillissement précoce.

Les clones peuvent être partagés en trois classes 1) ceux qui présentent de graves anomalies et qui meurent au cours de la gestation ou peu après la parturition ; 2) ceux qui présentent des désordres reproductibles et réversibles qui pourraient être des séquelles des conditions défavorables de la gestation et en particulier d'un dysfonctionnement du placenta ; 3) ceux qui ne présentent aucune anomalie observable. Pour des raisons inconnues, les anomalies des nouveau-nés obtenus par clonage sont plus fréquentes chez la vache et le mouton que chez la chèvre. Elles sont rares chez le porc.

La naissance des clones a lieu par césarienne car la parturition ne se déclenche en général pas spontanément. Il semblerait que ceci ne soit pas dû à une incapacité des fœtus à envoyer des signaux au placenta mais plutôt au placenta lui-même qui n'est pas sensible à ces signaux.

La croissance, la reproduction et la lactation des clones sont normales. Il est en de même pour les descendants des clones.

Divers examens histologiques et biochimiques sont régulièrement faits sur les clones. La mesure des concentrations de certains facteurs de croissance et de leurs protéines associées comme IGFI, IGFII, IGFBP, d'hormones comme T4, GH, insuline, leptine, cortisol, ACTH, de paramètres sanguins comme le volume globulaire, l'hémoglobine etc. ne révèle pas de différences avec les animaux normaux susceptibles de rendre compte de certains états pathologiques.

Certains clones ont une aplasie thymique partielle et une production d'anticorps anormalement basse.

La reprogrammation incomplète du génome des clones et l'affaiblissement du système immunitaire de certains d'entre eux seraient susceptibles de réactiver des génomes rétroviraux endogènes. De tels génomes sont en effet nombreux chez nombre d'espèces. Ils sont pour la plupart inactivés par méthylation de leur ADN puis au cours du temps par des mutations successives. La recherche de rétrovirus bovins a donc été effectuée chez les clones. Ces examens n'ont révélé aucune propension des clones à héberger des rétrovirus actifs.

Il est intéressant de noter que certains syndromes bien identifiés, comme l'obésité chez les clones d'une lignée particulière de souris, ne sont observés chez aucun de leurs descendants (Tamashiro *et al.*, 2002).

Des clones ont été obtenus à partir de souris et de bovins clonés. Dans le premiers cas, les souris ne montrent pas de différence significative avec les animaux contrôle après six clonages successifs (Wakayama *et al.*, 2000). A l'inverse, les bovins clonés descendant de clones présentent de sérieuses anomalies et ils ne survivent que difficilement (Kubota *et al.*, 2004). La reproduction normale effacerait donc en grande partie sinon complètement les défauts induits par le clonage alors que la reproduction par clonage les aggrave plutôt.

1.4.2 L'identité génétique des clones

Par définition, un clone a, en principe, le même génotype que son parent. La réalité est moins simple.

Les expérimentateurs ne connaissent pas strictement le génome des cellules donneuses de noyaux. Des données qui s'accumulent depuis un peu plus de cinq ans indiquent que beaucoup d'animaux, y compris l'homme, sont mosaïques ou chimériques. Il n'est pas rare que deux embryons échangent des cellules voire fusionnent. Les nouveau-nés sont alors des chimères. Il semble que ce phénomène soit plus fréquent qu'on ne l'imaginait et il pourrait être amplifié par les techniques de la reproduction qui impliquent souvent le transfert de plusieurs embryons dans la même mère porteuse (Pearson, 2002). Les embryons de leur côté transmettent à leur mère des cellules qui peuvent s'implanter dans l'organisme maternel de manière durable (Barinaga, 2002)

Une étude récente a montré qu'une proportion significative des clones de bovins présentait une instabilité chromosomique anormale en relation avec leur mauvais état de santé (Hanada *et al.*, 2005).

Une étude en cours indique que des échanges de cellules entre les embryons clonés et leur mère porteuse peuvent être révélées en utilisant l'ADN mitochondrial comme marqueur (Hiendleder *et al.*, 2004).

Les mitochondries chez les mammifères ne contiennent qu'un nombre réduit de gènes. Ces gènes ont une influence certaine et plusieurs maladies génétiques sont connues pour résulter de la mutation de gènes mitochondriaux.

Lors du clonage, la cellule donneuse de noyau transmet ses mitochondries à l'ovocyte énucléé receveur et, partant, au clone. Les mitochondries des deux origines sont encore présentes chez les animaux adultes. Ce phénomène n'a pas lieu lors de la fécondation. Les mitochondries du spermatozoïde ne se retrouvent en effet pas dans l'embryon qui hérite donc du génome mitochondrial de sa mère seulement.

Il est par ailleurs important de noter que le couple ovocyte énucléé – cellule donneuse de noyau n'est généralement pas formé des mêmes partenaires. En effet, le même animal peut donner un nombre

important de cellules donneuses de noyau, mais les ovocytes, en raison de leur relative rareté, doivent provenir de plusieurs femelles non nécessairement génétiquement apparentées.

Les clones ont donc deux raisons indépendantes de ne pas être, au sens strict, génétiquement identiques. Il a été possible d'utiliser les ovocytes et les cellules donneuses de la même famille. Ce protocole ne saurait répondre que marginalement aux exigences de la sélection génétique et il a peu de chance d'être mis en œuvre régulièrement.

Les cellules somatiques ne sont, par ailleurs, pas toutes génétiquement identiques. Des études visant à comparer la structure primaire du génome des clones et de leurs parents génétiques sont en cours (De Montera *et al.*, 2004). La structure primaire du génome des animaux d'élevage n'est pas connue. Les comparaisons s'appuient donc sur l'observation de fragments de génome par plusieurs techniques complémentaires AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism), MSAP (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism) et RDA (Representational Difference Scanning).

La méthode MSAP est capable de mettre en évidence des différences locales de méthylation de l'ADN et donc potentiellement des épimutations.

1.4.3 L'identité épigénétique des clones

Chez les vertébrés, l'ADN est déméthylé au cours de la gamétogenèse et de l'embryogenèse précoce. Il est reméthylé de manière sélective à partir du stade blastocyste. L'ADN des cellules somatiques est en grande partie méthylé et ceci correspond au faible nombre de gènes actifs dans chaque cellule différenciée (Mc Lay *et al.*, 2003).

Pour être couronné de succès, le clonage doit déméthyliser l'ADN comme lors du développement suivant une fécondation. Ceci n'est en général pas le cas (Pomerantz et Blau, 2004 ; Allegrucci *et al.*, 2004). L'ADN du chromosome X est intensément méthylé chez certains bovins clonés (Xue *et al.*, 2002). Le degré de méthylation de l'ADN reflète la capacité des clones bovins et les ovins à se développer (Santos *et al.*, 2003; Beaujean *et al.*, 2004). Chez la souris 400 des 10,000 gènes qui ont été examinés n'avaient pas une expression normale. Il est intéressant de noter que ces anomalies ont été observées dans les cellules placentaires mais non dans la partie fœtale. Ce fait peut expliquer le dysfonctionnement fréquent du placenta chez les clones (Fulka *et al.*, 2004).

Certaines observations suggèrent que les arrêts précoces du développement des embryons clonés pourraient être provoqués par un rejet à caractère immunitaire. En effet, les trophoblastes des bovins clonés expriment des gènes du MHC1 à des taux variables et de manière dérégulée. Un nombre anormalement élevé de lymphocytes T CD3+ a également été observé au voisinage des cellules endométriales chez les vaches portant des embryons clonés. Ceci pourrait révéler l'existence de réactions immunitaires atypiques (Ellis, 2004).

Il est donc probable que les clones sont plus souvent épigénétiquement modifiés que les porteurs de mutations génétiques au sens strict (Smith et Murphy, 2004).

Certaines des anomalies des génomes comme la longueur des télomères disparaissent chez les descendants des clones (Schiels et Jardine, 2003). Certains sites hyperméthylés chez les souris clonées restent hyperméthylés chez leurs descendants (Lane *et al.*, 2003). Au niveau moléculaire, toutes les traces du clonage ne seraient pas complètement effacées par un cycle de reproduction normale.

2 Les applications du clonage des animaux domestiques : intérêts et limites

2.1 INTRODUCTION

Chez les espèces d'intérêt zootechnique, le progrès génétique dépend de l'efficacité des techniques de la reproduction tout autant que de la précision avec laquelle on peut évaluer les caractéristiques phénotypiques des individus. Diverses techniques de reproduction ont été mises en œuvre depuis l'invention de l'élevage il y a 10000 ans. Le contrôle de la reproduction a permis les premières sélections chez les espèces domestiques. L'insémination artificielle puis le transfert d'embryons apportent depuis plusieurs décennies un progrès génétique beaucoup plus rapide (voir annexe).

Le clonage qui s'affranchit des aléas de la reproduction offre théoriquement des possibilités d'orienter et d'accélérer le progrès génétique des animaux d'élevage. Ces schémas théoriques reposent sur l'hypothèse que ce sont les descendants des clones et non les clones eux-mêmes qui seront proposés aux consommateurs.

La technique de clonage malgré son efficacité limitée est d'ores et déjà applicables à l'élevage, à petite échelle en tout cas. Il apparaît que le point limitant majeur dans l'application du clonage aux animaux d'élevage est le coût du clonage des géniteurs identifiés comme ayant une haute valeur génétique. Il est admis que les coûts du clonage vont très significativement baisser dans les cinq années qui viennent. Pendant la même période, l'utilisation des géniteurs bovins clonés devrait augmenter de manière exponentielle. C'est en tout cas sur ces hypothèses que certaines entreprises de la sélection fondent leur prévision de développement (Faber *et al.*, 2004).

La sélection des bovins en France est très organisée. Le dispositif en vigueur est décrit en annexe. Tout indique donc que le développement de lignées issues de géniteurs clonés ne serait pas fait de manière anarchique ou incontrôlée.

La mise en œuvre du clonage s'accompagne inévitablement d'une réduction de la diversité génétique. Celle-ci comporte des risques théoriques qui s'ajoutent à ceux de l'insémination artificielle et du transfert d'embryon. Les défauts du dispositif de sélection actuel peuvent contribuer à amplifier les risques intrinsèques du clonage. Il convient donc de définir les conditions d'utilisation du clonage susceptibles d'apporter un véritable progrès génétique sans réduction excessive de la diversité génétique.

2.2 Les applications du clonage

2.2.1 Applications potentielles d'un clonage animal totalement maîtrisé

Il s'agit ici d'inventorier les applications potentielles du clonage, si possible de manière exhaustive. Le clonage à considérer en priorité est celui des cellules somatiques d'individus ayant pu manifester dans leur vie une série d'aptitudes intéressantes, ce qui serait de nature à motiver les utilisateurs potentiels. Il y a, en effet, encore trop d'inconnues sur la valeur génétique d'un embryon, donneur potentiel de noyau. On peut bien sûr envisager de cloner un embryon, après typage et sélection, pour toute une série de gènes connus et (ou) une valeur génétique estimée via la théorie des QTL (la recherche dans ce domaine est en plein développement). Mais il ne s'agit là qu'une position stratégique de repli, à laquelle on serait contraint, notamment si l'on n'arrivait pas à faire baisser très sensiblement la fréquence des anomalies phénotypiques parmi les produits issus de clonage somatique.

On se projette donc dans un futur idéal où les problèmes techniques et scientifiques actuels relatifs au clonage auraient fini par être totalement maîtrisés. On dispose alors d'individus dont l'ADN nucléaire est la copie conforme de celui de l'individu de départ (donneur). Bien entendu, le prix de revient pour l'obtention de ces clones va dépendre des taux d'élimination observés à chaque stade des opérations de clonage. Par ailleurs, dans cette hypothèse, on ne prend pas en considération le fait que les

mutations somatiques préexistantes chez les donneurs et liées par exemple au vieillissement puissent être gênantes.

Cette projection tient également compte des avancées futures dans la connaissance du génome naturel (sachant que d'importants moyens y sont consacrés dans le monde entier et que la recherche progresse rapidement) ainsi que dans sa manipulation *via* la transgénése. Concrètement, on ne demande donc pas aux techniques de clonage de contribuer de manière prépondérante au progrès génétique, qui peut être obtenu en utilisant les autres techniques de reproduction et le marquage moléculaire (sélection assistée par marqueurs).

L'objectif est plutôt de déterminer les applications qui présentent *un intérêt objectif* pour le monde de l'élevage *parce qu'aucune autre méthode que le clonage ne permet tout court, ou ne permet pas dans un temps raisonnable, d'aboutir au même résultat*. On peut distinguer au moins quatre domaines d'applications.

a) clonage de secours

- Un animal intéressant dans les programmes de sélection (un taureau testé très favorablement en vue de l'insémination artificielle, par exemple) peut se révéler accidentellement incapable de remplir son rôle de reproducteur. On peut le cloner pour éviter une perte de progrès génétique.
- Un animal non reproducteur (par exemple, un hongre en saut d'obstacles) peut s'avérer potentiellement intéressant pour la reproduction. Son clonage favorisera le progrès génétique.
- Un animal intéressant pour l'éleveur (quelle qu'en soit la raison) peut devoir être réformé. Il peut être souhaitable de le remplacer par une "copie" qui servira elle-même de géniteur.
- Un embryon cultivé en vue de sa transplantation dans une femelle adoptive peut être la source de cellules donneuses de noyaux. Quelques cellules peuvent en effet être prélevées sur l'embryon sans compromettre son développement. Les embryons obtenus par clonage à partir de ces cellules peuvent donner naissance à un nombre de cellules élevé et suffisant pour autoriser un typage génétique de l'embryon d'origine. Cette approche permet une corrélation *a posteriori* entre des marqueurs génétiques et les performances zootechniques de l'animal.

Il s'agit ici bien sûr d'applications dans lesquelles le clonage apporte des potentialités totalement nouvelles.

b) clonage pour la diffusion génétique

Il serait souhaitable que certains troupeaux (bovins à viande, bovins laitiers en partie) pratiquant la monte naturelle puissent bénéficier des avantages de ce type de technique tout en accédant d'emblée au niveau génétique supérieur des reproducteurs utilisés en insémination artificielle. Dans ce cas, certains de ces reproducteurs pourraient être clonés et dirigés vers la monte naturelle. L'économie de ces troupeaux en serait alors améliorée tout en stimulant à long terme le progrès génétique. A ce stade du raisonnement, un minimum d'attention devrait être accordé au maintien de la variabilité génétique. Pour cela, il conviendrait de diffuser beaucoup de clones différents et si possible parmi les moins représentés dans les troupeaux.

Bien entendu, on peut aussi envisager de cloner des femelles ayant montré au cours de leur carrière tout un ensemble d'aptitudes zootechniques intéressantes.

Dans ce type d'application, le clonage permet simplement d'obtenir un certain niveau génétique souhaité, plus rapidement qu'au travers des méthodes de reproduction usuelles.

c) clonage pour la production

Le clonage est ici un élément constitutif du système de production parce qu'apportant des bénéfices économiques immédiats à l'éleveur qui le pratique : en clair, le clonage permet *d'inventer de nouveaux systèmes de production*. Les exemples qui suivent illustrent ce type de possibilité.

En ce qui concerne les bovins laitiers, l'éleveur intéressé se fournit en clones (plusieurs) de vaches ayant un profil génétique très équilibré (bonne production mais pas de problèmes de fertilité ni de mammites), qui, de ce fait, ont une très grande longévité (diminution des frais d'amortissement).

L'éleveur reproduit ces animaux la plupart du temps en procédant à des croisements (valorisation des veaux), sauf lorsque le remplacement par d'autres clones plus récents est envisagé. Dans cette situation, l'équilibre du système est lié au prix de revient des clones. Il n'y a alors pas d'incidence sur le progrès génétique en race pure mais l'éleveur met à profit une génétique de combinaisons de caractères pour maximiser son profit immédiat.

Dans le cas des bovins à viande, une association "naissances de clones" et ateliers d'engraissement pourrait être à l'origine de labels économiquement intéressants. En effet, les performances connues du donneur d'origine pourraient et devraient inclure non seulement les performances d'abattage mais aussi les caractéristiques détaillées de qualité de viande (elles sont partiellement d'origine génétique). Les consommateurs sont de plus en plus exigeants vis-à-vis de la qualité de viande alors que les méthodes de sélection usuelles sont, ou trop imprécises, ou trop coûteuses (abattage de descendants). Le clonage apporterait une solution élégante à ce problème.

Dans les deux cas, on met à profit une génétique de combinaisons de caractères très rares parce que difficiles à obtenir simultanément en peu de temps par d'autres techniques, même avec l'aide de la génétique moléculaire.

d) clonage pour la protection de la variabilité

Le clonage conduit à une destruction accélérée de la variabilité génétique si les individus que l'on clone sont d'origines très banales et donc très parents en moyenne avec la population existante. En revanche, il conduit à conforter la variabilité génétique s'il concerne des lignées rares en voie d'extinction et il augmente fortement, en quelque sorte, leur prolificité. A l'évidence, la technique est fondamentalement neutre et seules certaines conditions et perspectives d'application peuvent engendrer un effet néfaste.

Populations sélectionnées

Cloner les femelles intéressantes mais peu représentées dans les troupeaux augmente la fréquence de leurs génotypes. Il s'ensuit un rééquilibrage du pool génétique et donc une incidence favorable sur les possibilités de progrès génétique à long terme (*cf* les résultats théoriques connus en génétique des populations).

Populations conservées

La plupart du temps, le génome des femelles de départ est quasi perdu dans sa totalité, parce que les schémas de sélection s'appuient essentiellement sur les mâles. Prolonger leur vie génétique en recourant au clonage permettrait de constituer des stocks importants de gamètes femelles, auxquels on pourrait se ressourcer régulièrement. Ceci aurait pour conséquence de réduire la dérive génétique et la consanguinité dans les populations. Une application extrême de la technique conduit à l'immortalisation de populations, chaque individu réformé étant remplacé par son propre clone.

Dans ces deux types de populations, si les moyens financiers le permettaient, il serait tout indiqué de conforter les cryothèques de semence par des somatothèques de cellules somatiques congelées en vue d'un éventuel clonage. A noter ici encore la spécificité du clonage qui est bien la seule technique qui permettrait la résurrection rapide d'une population disparue.

2.2.2 Conditions d'application

Les applications potentielles sont donc très diversifiées et intéressantes. Il faut souligner que l'intérêt est *intrinsèque*, en particulier que le clonage n'est pas présenté comme une méthode alternative de création du progrès génétique. En effet, dans ce domaine, il faut tenir compte des avancées présentes et futures de la génétique moléculaire qui rendront la sélection plus efficace et moins coûteuse. Au contraire, la connaissance des génotypes des clones pour un certain nombre de gènes d'intérêt, en sus de leurs performances et de leurs index de sélection, permettra de mieux cibler les individus dignes du clonage et donc de renforcer les créneaux d'application du clonage.

Une transposition en vraie grandeur sur le terrain exige que la technique soit bien au point (ce n'est pas le cas actuellement car le taux de réussite moyen est encore trop faible et trop irrégulier) et que le prix d'achat des clones soit tolérable par l'utilisateur (ce qui dépendra très probablement de l'application envisagée).

2.3 ASPECTS ECONOMIQUES DU CLONAGE

Les applications du clonage décrites plus haut, sont étroitement liées aux considérations économiques. Les applications commerciales du clonage des animaux d'élevage resteront essentiellement limitées tant que la technique ne sera pas suffisamment fiable. Elle doit encore faire l'objet de recherches approfondies tant pour résoudre des problèmes de biologie fondamentale que pour améliorer la méthode de clonage en tant que telle. Tout indique qu'une amélioration de la technique est possible et que cela se traduira par une baisse substantielle du prix de revient des clones destinés à l'amélioration des productions animales (Farber *et al.*, 2004).

Les coûts du clonage chez les bovins, toute race confondue, sont actuellement les suivants. Le prix de revient actuel d'un veau cloné est d'environ 20 000 \$ et celui d'une vache clonée de 170 000 \$. L'utilisation de la semence d'un taureau cloné pourrait apporter un gain annuel de 1 million de dollars (Powell, 2003). Ces prix sont à rapprocher de ceux des animaux sélectionnés par la reproduction classique. Une vache sélectionnée coûte, selon les races, de 2 000 à 20 000 \$ et un taureau de 3 000 à 30 000 \$. Des études prospectives indiquent que la technique de clonage des bovins bien maîtrisée permettrait un supplément de gain d'environ 1000 \$ par veau par rapport à l'insémination artificielle classique. Ceci devrait devenir progressivement une réalité dans les cinq ans qui viennent et au-delà. Il est en effet postulé que le prix d'un veau cloné pourrait baisser de manière continue avec l'amélioration de la technique jusqu'à atteindre le chiffre de 1000 \$ en 2010 (Farber *et al.*, 2004).

2.4 INTERET DU CLONAGE POUR LA SAUVEGARDE D'ESPECES OU DE RACES EN VOIE DE DISPARITION

Pour certaines espèces non-exploitées à des fins zootechniques, vivant en liberté ou semi-liberté dans le milieu naturel, les risques de disparition sont réels et souvent liés aux conséquences de la pollution, de la chasse ou de la sur-exploitation des stocks naturels sur les équilibres des écosystèmes. La disparition de ces populations conduit alors à un appauvrissement de la diversité génétique et à la perte de caractères génétiques intéressants. Ainsi, par exemple, environ 30 % des races bovines ne sont pas régulièrement exploitées et sont donc menacées de disparition. Ces races peuvent être conservées sous forme d'animaux vivants ainsi que de semence, d'embryons ou d'ovocytes congelés.

Dans ce contexte, le clonage a été présenté comme une technologie capable de contribuer à la sauvegarde d'espèces ou de races en voie de disparition. Le génome des animaux peut tout aussi bien être conservé sous forme de cellules somatiques congelées utilisées ultérieurement pour régénérer des animaux vivants par les techniques de clonage. En pratique, des cellules de type fibroblastique peuvent être prélevées sur les oreilles des animaux, cultivées puis gardées dans l'azote liquide. Des conditions standardisées ont été définies pour établir et conserver les lignées de cellules de manière fiable (Bousquet et Blondin, 2004). De telles collections sont déjà mises en place par exemple dans le Centre de Reproduction des Espèces en Danger à San Diego (USA).

La mise en oeuvre de cette approche doit être envisagée dans deux situations différentes : (i) D'une part dans le cas de conservation d'individus ou de races génétiquement importants/intéressants au sein d'une espèce qui ne présente pas de problème de conservation (ii) d'autre part dans le cas d'espèce en voie de disparition. La première situation recouvre en particuliers les espèces d'intérêt agronomique. Dans ce cas, la conservation des génomes sous forme de cellules congelées donneuses de noyau qui est recommandée par la FAO (FAO/OMS, 2003) peut s'appliquer à la conservation de tous les animaux précieux : animaux ayant des caractéristiques génétiques exceptionnelles, animaux produisant peu de semence, animaux accidentés, animaux transgéniques et animaux en voie de disparition. Cependant, certaines précautions doivent être prises pour être sûr que le matériel biologique produit par clonage apporte une contribution positive au bien-être de la population que l'on veut conserver. En effet, lorsque la reprogrammation nucléaire est inadéquate et conduit à des anomalies phénotypiques, le risque de produire des individus clonés contre-performants en terme de bien-être est réel. Il faudra alors envisager de travailler avec les descendants issus de géniteurs clonés.

Dans le cas d'espèces en voie de disparition, il sera alors le plus souvent nécessaire d'utiliser le clonage inter-espèces. En effet, les ovocytes utilisés pour recevoir les noyaux provenant de cellules somatiques ont peu de chance de pouvoir être obtenus à partir de l'espèce en voie de disparition ce

qui impose de se retourner vers une autre espèce proche. Ainsi, le clonage du Gaur (*Bos gaurus*) a été réalisé grâce à l'utilisation d'ovocytes énucléés de vache (*Bos taurus*). Les animaux hybrides issus d'un tel clonage inter-spécifique sont intéressants sur le plan de la recherche mais ils ne pourront pas toujours constituer une réelle solution pour le sauvetage de l'espèce en voie de disparition.

3 Risques liés au clonage : quelles conséquences en matière de santé animale sur le plan physiologique, pathologique et comportemental ?

3.1 INTRODUCTION

Le nombre de ruminants vivants, âgés de plus de six mois, obtenus par clonage est inférieur à un millier dans le monde entier fin 2003. La plupart de ces animaux sont, en 2004, âgés de moins de cinq ans. Ces animaux résultent de plusieurs dizaines de milliers de tentatives d'implantation d'embryons clonés puisque 5 à 15 % de ceux-ci produisent, au terme de la gestation, des veaux vivants dont près d'un tiers vont mourir dans les six premiers mois de vie post-natale.

Les problèmes de santé de l'individu cloné sont donc particulièrement importants durant son développement utérin, puis pendant les six premiers mois de vie post-natale. Par ailleurs, s'agissant de reproducteurs d'élite clonés, il convient de s'interroger sur la santé de leurs descendants (clonés ou non) ainsi que sur leur impact potentiel dans les populations animales où ils vont être utilisés. Ceci concerne la diversité génétique, la propagation de facteurs de susceptibilité génétique aux diverses affections acquises (maladies transmissibles d'origine microbienne ou parasitaire, maladies métaboliques, ...) ou les maladies génétiques. Il est donc essentiel de comprendre la nature génétique ou épigénétique des anomalies observées ainsi que leur éventuel impact transgénérationnel.

Parmi les troubles du développement pré-natal et de la santé post-natale décrits chez les animaux clonés, un certain nombre a déjà été rapporté à la suite de la mise en œuvre d'autres technologies de la reproduction (fécondation *in vitro* et transfert d'embryons par exemple). Cet aspect ne doit pas être négligé pour comprendre et, si possible, contrôler l'impact des anomalies constatées, tant au plan individuel que populationnel.

3.2 ETAT DE SANTE ET PATHOLOGIES DES ANIMAUX CLONES ET DE LEURS DESCENDANTS

3.2.1 Maladies monofactorielles et multifactorielles

En matière de pathologie animale, on distingue classiquement les maladies monofactorielles provoquées par un seul facteur causal (qui peut être un agent transmissible, un gène, une molécule toxique,...) et les maladies multifactorielles provoquées par une association de déterminants le plus souvent dans des circonstances particulières (agent à faible pouvoir pathogène intrinsèque se développant chez un animal affaibli à un moment particulier de sa vie).

Cette classification s'applique par exemple à deux affections virales comme la fièvre aphteuse (maladie monofactorielle) et la gastro-entérite néonatale du veau à rotavirus (maladie multifactorielle).

De la même façon un déterminant monofactoriel génétique est reconnu dans de nombreuses affections des animaux domestiques (près de 400 affections d'origine génétique sont ainsi reconnues chez les bovins -M.I.C. 2000, OMIA).

Les choses se compliquent quelque peu quand on évoque la résistance génétique à certaines maladies. Il s'agit là plus souvent de résilience que de résistance vraie, en particulier dans le domaine des maladies parasitaires. Leur déterminant génétique est souvent polygénique et pourrait être exploré par la recherche de "Quantitative trait Loci" (Q.T.L.), mais on peut aussi retrouver des déterminismes plus simples comme ceux impliqués dans la résistance à la tremblante (ESST).

Au-delà de la maladie (à déterminisme mono ou multifactoriel), il existe de nombreuses situations où il y a cohabitation entre microbe et hôte animal sans pathologie associée (bovins adultes porteurs d'*E. coli* 0157, H7, VTEC) ou à manifestation sporadique (*Listeria monocytogenes* et chez les ovins) mais

avec des conséquences pour la santé publique par contamination de l'homme, notamment au travers des denrées alimentaires.

Enfin il convient de souligner que, dans de nombreux processus pathologiques, au-delà du développement d'une maladie chez un individu, il existe un risque induit pour une plus ou moins grande partie de la population animale (espèce, race) à laquelle appartient l'individu, y compris au travers des générations successives dans le cas des maladies génétiques.

Pour analyser les risques qui pourraient être spécifiquement associés à la santé des animaux issus du clonage, on peut dans un premier temps distinguer les risques associés aux maladies multifactorielles ou monofactorielles transmissibles de ceux qui sont liés à un support génétique monofactoriel.

3.2.2 Maladies monofactorielles transmissibles, maladies multifactorielles et portage sain

Dans les maladies monofactorielles transmissibles (MT) ou les maladies multifactorielles (MF), la composante génétique de la sensibilité est peu importante (MT) ou mal connue (certaines MT et MF). Néanmoins, la mise en œuvre de la sélection génétique pour l'amélioration des performances de production (quantité de lait, vitesse de croissance, qualité de la viande) chez certaines espèces ou races (vaches laitières par exemple) au sein de systèmes de production intensif a coïncidé avec une augmentation de l'incidence des maladies multifactorielles enzootiques atteignant l'appareil locomoteur, la mamelle et l'appareil respiratoire. Ces observations faites sur de longues périodes (plusieurs dizaines d'années) n'ont pas fait l'objet d'études analytiques qui auraient permis de mesurer les contributions respectives de divers facteurs (alimentation, conditions de vie, génétique...). Les conséquences de ces affections sont très importantes (mortalité, morbidité, coûts, qualité et quantité des productions) car elles représentent les motifs les plus fréquents d'intervention sanitaire. Il est courant d'évoquer une "perte de rusticité" liée au développement des méthodes rationnelles d'amélioration de la productivité sans que le constat puisse être réellement argumenté. Le même type de constatations et de questionnements (sans réponse) existent vis-à-vis du portage sain (sans pathologie associée chez l'animal) de nombreux pathogènes essentiellement bactériens (*Listeria*, *Salmonella*, ...) dont on connaît les conséquences en terme de santé publique.

Au total, il existe, tant pour le portage sain que pour les maladies multifactorielles, un déficit de connaissances sur le déterminisme général (causes, mécanismes, conséquences) des interactions entre pathogène et animal cible. Dans ce cadre, notamment en ce qui concerne l'influence de la génétique, l'appréciation des conséquences de l'utilisation d'animaux clonés dans les systèmes existant d'amélioration génétique ne peut s'appuyer que sur un effort considérable de recherches et d'études sur espèces-cibles dans des conditions de type expérimental ou de type production, incluant un nombre d'animaux suffisamment représentatif et pendant des durées significatives (plusieurs générations).

Avant les opérations de clonage, il importe donc d'évaluer les risques sanitaires liés à l'état sanitaire de l'animal donneur et éventuellement du receveur.

3.2.3 Maladies génétiques

Il s'agit, paradoxalement, d'une catégorie d'affections bien connues à la fois aux plans individuel et populationnel, pour lesquelles il existe une réelle expérience de détection et de contrôle des émergences. Nous illustrerons dans l'espèce bovine l'expérience acquise et ce qu'elle peut apporter en matière de reproducteurs clonés.

Si plus de 400 anomalies d'origine génétique sont reconnues pour l'ensemble des races au plan mondial, la prévalence globale des anomalies cliniquement exprimées est probablement inférieure à un pour mille. Il ne faut pas néanmoins oublier que la fréquence de portage d'un gène peut s'accroître très vite et atteindre des niveaux importants (en 1992, aux Etats-Unis, un veau sur 200 de race Holstein était atteint de la BLAD -Bovine Leucocyte Adhésion Deficiency). En France, jusqu'au début des années 90, le nombre d'anomalies ayant fait l'objet de recherches et/ou de programmes de contrôle était très limité (Syndrome Arthrogrypose Palatoschisis en race charolaise, polydactylie en

race normande). Au cours des années 90, sont apparues successivement en France trois nouvelles maladies : la BLAD dont la fréquence maximale est observée en 1992, l'achondroplasie et le CVM (Complex Vertebral Malformation) respectivement repérées en France et au Danemark en 1999. Ces trois anomalies sont identifiées en race Holstein. BLAD et CVM sont à déterminisme monogénique autosomal récessif (comme 60 % des anomalies héréditaires bovines). L'achondroplasie est plus complexe et probablement liée à un gène majeur dominant à pénétrance incomplète (Ducos *et al.* 2002, Hagemoser *et al.* 1983, Agerholm *et al.* 2001).

L'apparition de multiples anomalies génétiques au sein d'une seule race laitière Holstein (ou Prim Holstein) a posé le problème de leur condition d'émergence. Celle-ci est liée, au moins partiellement, à l'évolution de la consanguinité¹ dans la plupart des races laitières puisqu'elle augmente de 1 % par génération depuis 1970. Ainsi, en race Holstein, la consanguinité est passée de 0,5 % en 1986 à 2,5% après 2001. Ceci est lié à la politique de sélection mise en œuvre depuis vingt ans, avec une forte diminution du nombre de pères aux taureaux et une utilisation très déséquilibrée, qui se traduit par d'importants goulots d'étranglement (en race Holstein, deux taureaux fondateurs étaient porteurs de BLAD et de CMV).

Deux aspects quantitatifs permettent d'illustrer l'importance du phénomène. En France pour une population de trois millions de vaches Holstein, le nombre de géniteurs est de 56. Pour un gène récessif de fréquence $p = 0,01$, la probabilité d'apparition d'une tare génétique est de 26 fois plus élevée pour un accouplement à coefficient de consanguinité 0,25 (accouplement parent x descendant) que pour un accouplement à coefficient 0 (individus issus de reproducteurs non apparentés).

3.2.4 Développement des clones et problèmes recensés

Il existe une mortalité très prononcée chez les embryons clonés et un taux de mortalité post natale très important, qui est constaté avec une particulière acuité dans les espèces ovines et bovines et beaucoup moins dans les espèces caprines et porcines. Il convient à ce propos de noter la très grande fréquence des hydramnios et des hydrallantoïdes constatés chez les fœtus, anomalies rarissimes dans les populations de ruminants.

Les anomalies sont souvent liées à des anomalies placentaires qui pourraient être à l'origine du syndrome du gros nouveau-né (LOS) chez les bovins et les ovins. Les données disponibles ne sont pas très nombreuses et assez souvent imprécises.

Les animaux clonés pourraient être plus sensibles à certaines maladies infectieuses. Ils pourraient donc théoriquement contribuer à augmenter la fréquence de certaines pathologies, indépendamment de leurs caractéristiques génétiques.

La diminution de la diversité génétique qui résulte du clonage peut par ailleurs disséminer des génomes d'animaux plus sensibles à certaines maladies. Le clonage peut donc à long terme et de manière peu prévisible contribuer à la dégradation de l'état de santé de certaines populations animales.

A l'inverse, le clonage peut transmettre des génomes qui rendent les animaux plus résistants à telle ou telle maladie. Ceci peut avoir lieu à l'insu des sélectionneurs ou au contraire être une opération volontaire si un tel génome a été identifié.

3.3 CONSEQUENCES DU CLONAGE SUR LE BIEN-ETRE DES ANIMAUX D'ELEVAGE

3.3.1 Contexte

La prise en compte de critères de bien-être dans les élevages d'espèces d'intérêt commercial depuis 20 ans est une donnée constante qui prend de plus en plus de poids dans l'évaluation des nouvelles techniques d'élevage. Le principe éthique énoncé dans le traité d'Amsterdam considère que nous

¹ Le pourcentage de consanguinité est la probabilité pour qu'à un locus donné, le gène transmis par le père et le gène transmis par la mère soient la réplique d'un même gène ancêtre.

avons une obligation morale envers les animaux qui nous interdit de les faire souffrir même si ces actions constituent un bénéfice pour l'homme. Les règles générales de bien-être qui ont été énoncées peuvent se regrouper autour des cinq rubriques suivantes : éviter la faim et la soif, l'inconfort, les douleurs, les blessures et les maladies, la peur et l'angoisse ainsi que permettre un comportement normal. Ainsi, le bien-être recouvre à la fois la santé des animaux et leur condition physique mais aussi leur état mental et leur capacité à faire face aux fluctuations défavorables de leur environnement. Depuis environ 10 ans, les considérations sur le bien-être animal ont été appliquées aux nouvelles technologies de sélection animale. Dans ce contexte, il était logique que le clonage animal soit aussi évalué pour ses conséquences sur le bien-être des individus clonés. Cette question a fait l'objet de deux rapports en 1998 et 2004 de la part du FAWC (Farm Animal Welfare Council, UK).

3.3.2 Impact sur le bien-être des animaux clonés

Sans pour autant condamner *a priori* le clonage sur la base du non-respect des règles de bien-être des animaux, les experts du bien-être animal considèrent que plusieurs des opérations mises en oeuvre lors du clonage posent de réels problèmes de bien-être.

1. La première objection concerne le syndrome du "gros nouveau-né". Il n'est pas rare qu'à la suite d'une fécondation *in vitro* et d'un transfert nucléaire au cours desquels l'embryon est maintenu dans un milieu de culture *in vitro* avant d'être transféré chez une mère adoptive, on observe un développement fœtal anormal. Celui-ci conduit à la production d'un descendant ayant une taille anormalement élevée ce qui n'est pas sans poser des problèmes pour la mère et le nouveau-né au moment de la naissance.
2. La deuxième critique concerne l'état de santé des animaux clonés. Comme il a été indiqué précédemment, trois situations sont observées actuellement : (i) des clones qui présentent des anomalies graves et meurent au cours de la gestation, (ii) des clones qui présentent des désordres réversibles mais survivent après la naissance, (iii) des clones normaux. Dans ce contexte, les pratiques actuelles soulèvent des problèmes au regard des règles de bien-être animal dans la mesure où l'on peut affirmer que ces anomalies sont causées par la technologie utilisée (le clonage) et ne constituent pas un événement rare comme cela est observé dans les élevages classiques.
3. La troisième critique du clonage porte sur le risque de perte de diversité génétique. En l'absence d'un contrôle génétique des individus obtenus par clonage, il existe un risque d'appauvrissement de la diversité génétique pouvant favoriser la dissémination d'anomalies à déterminisme génétique, l'apparition de nouveaux facteurs de susceptibilité à certaines maladies transmissibles ou au stress dans les conditions d'élevage.

Comme souvent dans les débats autour du bien-être des animaux d'élevage, les critiques des pratiques en vigueur font l'objet de travaux de recherche complémentaires et des solutions techniques le plus souvent acceptables sont proposées. Cependant, dans la plupart des cas, ces recherches sont suivies par des modifications significatives des méthodes d'élevage. Le clonage doit être évalué de la même manière. On peut raisonnablement imaginer que les problèmes soulevés aux points 1 et 3 puissent être mieux maîtrisés et donc devenir acceptables au regard des règles de bien-être. Les réponses aux critiques portant sur la santé des animaux clonés seront plus difficiles à apporter dans la mesure où les anomalies observées semblent inhérentes à la technique du clonage. Il est toutefois parfaitement concevable que les améliorations apportées aux techniques de clonage permettront d'atténuer les effets délétères actuellement observés.

4 Quels impacts sur la génétique des espèces concernées ?

4.1 IMPACT DU CLONAGE SUR LES GENOMES

Par définition, le clonage a pour effet de multiplier en autant d'exemplaires qu'il existe de descendants, le génome de l'animal à l'origine du clone. Ceci doit être considéré aussi bien pour les clones de "première génération" que pour ceux des générations ultérieures, sous-clonés en série à partir d'un clone primitif. Le clonage réalisé par transfert nucléaire à partir de cellules somatiques prélevées sur un géniteur âgé a donc les mêmes effets qu'aurait la prolongation de la vie de ce géniteur en permettant d'obtenir, par exemple, de lui/elle un plus grand nombre de gamètes. De ce point de vue, le clonage est plus avantageux chez la femelle que chez le mâle puisque le nombre d'ovocytes susceptibles d'être produits par une femelle est incomparablement plus petit que le nombre de spermatozoïdes produits par le mâle. Ceci est encore accentué par la plus grande difficulté qu'il y a de préserver les gamètes femelles, au moins dans certaines espèces.

Dans la plupart des espèces où des clones ont été produits, des animaux ont survécu jusqu'à l'âge de la reproduction et dans pratiquement tous les cas, ils ont pu engendrer, avec des partenaires sexuels normaux, des descendants eux-mêmes apparemment normaux. Cette observation est encourageante si on la compare à l'importante pathologie qui affecte les animaux nés d'embryons manipulés car elle semble confirmer que la méiose joue le rôle d'un "filtre à anomalies génétiques" qui ne laisserait passer que des gamètes normaux. Cette observation confirme les observations anciennes, déjà faites chez la souris.

Des expériences préliminaires ont été réalisées dans le but de démontrer l'intégrité de l'ADN provenant des cellules d'animaux clonés et son identité avec l'ADN du donneur. Ces expériences, fondées sur la mise en évidence d'éventuels polymorphismes dans la taille des produits d'amplification PCR de microsatellites (Simple Sequence Length Polymorphism ou SSLP) n'ont pas permis de détecter de modifications substantielles entre les deux génomes. Ces expériences sont préliminaires, relativement grossières et certainement insuffisantes pour détecter des modifications subtiles, ponctuelles et sans doute rares. D'autres résultats, basés sur le séquençage de grands fragments d'ADN analysés en termes de Single Nucleotide Polymorphism (SNP) sont nécessaires.

Les mutations dominantes et les anomalies chromosomiques qui surviennent dans les cellules somatiques d'un organisme en cours de développement ont peu d'importance pour l'organisme en question car elles sont, en général, incompatibles avec la survie de la cellule et sont, par conséquent, rapidement éliminées. Lorsqu'elles sont présentes dans les cellules somatiques prélevées pour effectuer un transfert nucléaire ou lorsqu'elles surviennent pendant la culture *in vitro* des cellules explantées, elles aboutissent en général à un échec et ne donnent pas d'embryon viable. On considère d'ailleurs que ces mutations et d'autres anomalies chromosomiques sont responsables d'une partie des échecs observés dans le clonage par transfert nucléaire. Ceci conduit à penser que ce type d'anomalies, parce qu'il est très fortement contre sélectionné, réduit le risque pour les animaux clonés d'hériter d'un patrimoine génétique altéré.

Les mutations récessives augmentent en nombre avec les générations cellulaires et chaque cellule diploïde fille hérite des mutations présentes dans la cellule mère auxquelles s'en ajoute d'autres. Ces mutations sont éliminées naturellement par le fait qu'elles restent confinées dans les cellules somatiques et n'ont par conséquent aucun avenir génétique, ou par le fait qu'elles ne sont pas représentées dans les gamètes qui participent à la production de la génération G + 1. De ce point de vue, on peut considérer que la méiose est, ici encore, une machinerie à "nettoyer le génome". Le clonage court-circuite les effets de cette machinerie et permet donc l'accumulation de mutations. Pour illustrer cet aspect on peut faire remarquer que le "sous clonage" ou clonage en série semble n'être possible qu'un nombre limité de fois (trois chez les bovins et sept chez la souris) et une des explications généralement avancée pour rendre compte de cette limite est que des mutations accumulées dans les cellules somatiques finissent par empêcher la production d'un embryon viable. Il est difficile toutefois de faire une distinction entre les effets des mutations classiques et des épimutations qui affectent l'expression de certains gènes mais non leur structure.

Les mutations survenant dans l'ADN mitochondrial (mt DNA) représentent un risque potentiel pour les animaux clonés. L'ADN mitochondrial est une structure importante pour le bon fonctionnement du métabolisme cellulaire et son intégrité est essentielle. Cette molécule est héritée uniquement de la mère car l'unique molécule de mtDNA présente dans le spermatozoïde est perdue au moment de la fécondation. Le mtADN, parce qu'il est haploïde, est aussi une structure qui mute facilement dans les cellules somatiques conduisant à un taux relativement élevé d'hétéroplasmie, autrement dit à un mélange de mitochondries à ADN de structures différentes. Lorsqu'un noyau cellulaire est prélevé pour être transféré dans un ovocyte, une contamination de l'ovocyte en question par des molécules de mtDNA mutantes est possible. Même si ces molécules transférées accidentellement sont minoritaires au départ, il a été montré qu'elles pouvaient, avec le temps, se substituer en totalité ou en majorité aux molécules de mtDNA de la cellule hôte et conduire ainsi (au moins théoriquement) à l'observation d'une pathologie. Ce risque potentiel concerne essentiellement les clones femelles et leur descendance car il y a un "bottle-neck effect" dans la transmission du mtDNA de la mère à la fille. Les clones mâles ne transmettent en effet à leur descendance que l'ADN nucléaire.

Des modifications épigénétiques sont communément observées dans le génome des clones qui portent sur la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Ces modifications épigénétiques, de même d'ailleurs que l'accroissement de la taille des télomères qui est observée dans certaines cellules d'animaux clonés, sont semble-t-il en grande partie réversibles lorsque le génome passe par la phase haploïde (gamétogenèse). Elles ne constituent donc, semble-t-il, qu'un risque potentiel très atténué pour la descendance des clones.

Le clonage de géniteurs mâles peut aussi, au moins théoriquement, avoir des effets sur la fréquence des allèles dans la population des animaux d'une même race lorsque la semence du géniteur en question est utilisée pour l'insémination artificielle. En effet, le fait qu'un géniteur soit utilisé plus longtemps ou plus souvent modifie mathématiquement la fréquence des allèles dans la race en question. Ces effets sont faibles si le nombre de clones reste limité mais ils s'ajoutent aux effets de l'insémination artificielle.

4.2 IMPACT DU CLONAGE SUR LA REDUCTION DE LA DIVERSITE GENETIQUE DES POPULATIONS EN ELEVAGE

La sélection génétique classique, réalisée via l'insémination artificielle, s'accompagne déjà d'une réduction de la diversité génétique dans la population. Le clonage ne peut qu'amplifier ces effets si on ne prend pas certaines précautions (cf plus haut). Cette réduction de la diversité génétique pourrait avoir plusieurs conséquences négatives. Elle pourrait, par exemple, rendre certains troupeaux plus sensibles à des agents pathogènes rares. Un tel événement pourrait induire des problèmes d'élevage inattendus. Il ne peut de même, en théorie, être totalement exclu qu'une exploitation aussi rationnelle que possible du clonage induise de tels effets. La probabilité faible mais non nulle qu'un tel scénario devienne une réalité pourrait être augmentée de manière imprévisible par des changements de conditions dans lesquelles les animaux sont élevés. Des modifications du climat pourraient ainsi favoriser l'émergence de certaines pathologies préférentiellement dans des troupeaux composés d'un nombre élevé de descendants de clones trop proches génétiquement.

Des études théoriques ont permis de définir les limites que ne devraient pas franchir les utilisateurs des techniques de clonage (Colleau, 1993 ; Colleau *et al.*, 1998 ; Wooliams et Wilmut, 1999).

La recherche en génétique quantitative offre actuellement des solutions efficaces pour la gestion génétique des populations sélectionnées (Bijma *et al.*, 2002, Colleau *et al.*, 2004a,b). Ces solutions sont applicables aussi à des populations où des clones seraient exploités et elles permettent de gérer convenablement de tels troupeaux. Ainsi l'utilisation de clones de pedigrees très fréquents est faiblement recommandée tandis que l'utilisation de clones de pedigrees rares est au contraire fortement recommandée, ce qui en pratique contribuera à augmenter la variabilité génétique.

Quelques exemples peuvent illustrer ces points. La sélection génétique classique a permis d'augmenter très considérablement la production laitière des vaches. Ceci s'accompagne d'effets secondaires néfastes qui tendent à s'amplifier au fur et à mesure que la sélection en faveur de la production laitière progresse.

Les vaches les plus productives présentent une fécondité qui est en diminution régulière. Il s'agit d'un phénomène complexe qui n'est pas expliqué à ce jour. La diminution de diversité génétique qui accompagne la sélection peut avoir co-sélectionné des gènes favorables à la lactation et d'autres défavorables pour la reproduction. Il est également concevable que les deux fonctions biologiques impliquées que sont la gestation et la lactation, qui sont naturellement en compétition métabolique, se retrouvent dans une situation de moins en moins compatible à la suite d'une sélection intense.

Dans le même ordre d'idée, il est bien établi que la fréquence des infections mammaires est plus élevée chez les vaches hautes productrices de lait.

Au cours des premières semaines qui suivent la mise-bas, les vaches laitières sont soumises à un déséquilibre métabolique qui oblige l'animal à puiser intensément sur ses réserves. Ce phénomène s'accompagne fréquemment de maladies métaboliques diverses (stéatoses hépatiques, acétoses, plus grande sensibilité vis à vis de fièvres vitulaires) qu'il est difficile de maîtriser.

Il est logique de penser qu'une utilisation non judicieuse de géniteurs obtenus par clonage puisse contribuer à renforcer ces tendances. A l'inverse, l'introduction du patrimoine génétique de géniteurs validés par une carrière de reproducteur pourrait au contraire contribuer significativement à maîtriser les dérives des méthodes de la sélection conventionnelle. Il existe en effet des individus dans les troupeaux qui sont à la fois des bons producteurs de lait et des animaux ne souffrant pas des désordres métaboliques cités plus haut. Le nombre de ces animaux est trop faible pour qu'on puisse les utiliser comme géniteurs capables d'avoir un impact génétique significatif sur les troupeaux. Le clonage, s'il était techniquement bien maîtrisé et s'il était bien ciblé, permettrait la diffusion de ces "déviant" favorables et il contribuerait à résoudre le problème (cf 2.2.1 b) et c)).

S'il y a un domaine où le principe de précaution doit être observé avant toute application, c'est bien celui du clonage, en raison des importantes modifications du génome (de type épigénétique notamment) fréquemment observées avec la technique actuelle et qui sont en relation avec le très fort taux de perte et (ou) d'anomalies au cours du développement.

Tant que la recherche n'aura pas réussi à mieux maîtriser ces phénomènes, il est préférable de ne pas envisager d'applications où l'animal issu de clonage participe à la reproduction, pour ne pas risquer d'altérer durablement le génome de l'ensemble de la population au bout de plusieurs générations. Il est évidemment urgent de définir à partir de quels critères et de quelle méthodologie, un clone pourra être déclaré apte ou non à la reproduction. Très clairement, cette thématique doit être approfondie par les chercheurs. En tout état de cause, le clonage dit "de production" et décrit plus haut est libéré de ce souci. C'est sans doute là qu'une application rapide du clonage ne comporterait pas de risques mal appréhendés.

5 Etat des connaissances sur la qualité et la sécurité sanitaire des produits alimentaires issus des animaux clonés

Les deux principaux produits alimentaires issus des bovins clonés, le lait et la viande, ont d'ores et déjà été soumis à des tests destinés à mettre en évidence d'éventuels problèmes de digestibilité, alimentarité, toxicité, allergénicité et mutagénicité. Les tests actuellement effectués et qui sont décrits dans ce chapitre concernent essentiellement les clones eux-mêmes. Ces données ont été obtenues à partir d'un nombre limité d'animaux. Il est important de noter par ailleurs que les produits qui sont susceptibles d'être proposés aux consommateurs sont exclusivement les descendants des clones et non les clones eux-mêmes. Les tests doivent donc être appliqués surtout aux descendants de clones même si tout indique que les défauts des clones sont très atténués, voire inexistant chez leurs descendants.

5.1 COMPOSITION DU LAIT ET DE LA VIANDE

La composition du lait a été examinée indépendamment par au moins trois groupes (Seamark, 2003; Walsh *et al.*, 2004 ; Norman et Walsh, 2004) sur un nombre significatif d'animaux, respectivement 15 et 13 vaches. Aucune différence significative n'a pu être observée concernant les paramètres suivants : quantité totale de matière solide, minéraux, protéines, lipides, lactose, pH, SCC (somatic cell counts), ADV (acid degree value). Un examen plus détaillé a également révélé que la proportion des différentes protéines du lait (caséines et protéines du lactosérum) ainsi que la concentration relative des différents acides gras est identique chez les vaches obtenues par clonage et chez les animaux contrôlés. Les premières expériences réalisées avec les descendants des clones confirment ces conclusions.

Les laits de vaches, chèvres, brebis contiennent plus d'un million de molécules différentes (Jenness 1988) dont la présence, donc la composition du lait, varie en fonction de la race de vache, du stade de sa lactation, de la phase de la lactation, de l'âge de la vache, de l'intervalle entre les traites, de la température ambiante, des maladies et de la saison de l'année (Walstra et Jenness, 1984 ; Kaufman et Hagemester, 1987) La détection des différences entre les clones et les vaches non clonées exigerait l'analyse de tous ces effets.

La composition globale de neuf parties de la carcasse des vaches clonées a été également évaluée sur la base des paramètres suivants : eau, protéines, lipides, carbohydrates, cendres et cholestérol (Takahashi et Ito, 2004). Aucune différence entre les animaux clonés et les contrôles n'a pu être observée.

Tian *et al.* (2005) ont analysé plus de 100 paramètres relatifs à la qualité de la viande de 2 bovins et à la composition du lait de 4 vaches laitières clonés. Ils ont également effectué des analyses histologiques des organes des 2 bovins autopsiés. Les résultats ne mettent pas en évidence de différence significative entre les animaux clonés et les témoins, ni d'anomalies histologiques dans les organes examinés (foie, rein, poumon, cœur, rate, surrénales et thyroïde). Cette étude, conduite sur un nombre limité d'animaux et sur des clones produits à partir d'une seule source génétique, nécessite d'être élargie à un plus grand nombre d'animaux clonés d'origines génétiques différentes.

5.2 DIGESTIBILITE

Des tests *in vitro* utilisant des extraits gastriques et intestinaux ont été mis en oeuvre pour évaluer la digestibilité des homogénats de viande de vaches clonées et d'animaux contrôlés. Ces tests n'ont révélé aucune différence de digestibilité entre les deux groupes d'animaux (Seamark, 2003 ; Takahashi et Ito, 2004).

5.3 TOXICITE ET ALIMENTARITE

Des rats ont été nourris pendant 14 semaines avec de la viande lyophilisée provenant de vaches clonées et d'animaux témoins. Les paramètres classiques permettant de révéler une toxicité des aliments ainsi que leur propriété nutritionnelle ont été examinés chez ces animaux : état général, comportement, consommation de nourriture, létalité, croissance, reproduction, lactation, ainsi que 29 paramètres physiologiques comprenant, entre autres, l'analyse du sang et des urines, et la mesure de 9 réactions réflexes. Les animaux ont par ailleurs été autopsiés et les principaux organes ont été soumis à des examens histologiques (Seamark, 2003 ;Takahashi et Ito, 2004). Ces tests n'ont révélé l'existence d'aucune anomalie chez les rats ayant consommés des produits provenant d'animaux clonés.

Une étude similaire chez des rats nourris avec du lait ou de la viande issu de vaches clonées confirme en tout point ces conclusions (Tomé *et al.*, 2004).

5.4 ALLERGENICITE

Afin d'éviter des effets allergènes aspécifiques fréquemment observés chez les rats consommant de la viande, d'autres tests d'allergénicité n'impliquant pas la consommation de viande ont été mis en œuvre. Ils consistent à sensibiliser les rats avec des injections d'extraits de viande et à mesurer ensuite les réactions cutanées des animaux exposés localement aux extraits de viande. Ces tests n'ont fait apparaître aucune réaction allergène particulièrement induite par les extraits de viande provenant des animaux clonés (Takahashi et Ito, 2004).

La mesure des concentrations des immunoglobulines chez les rats nourris avec du lait ou de la viande provenant des vaches clonées ou non a montré que les produits issus des animaux clonés n'induisaient aucune réaction immunitaire particulière. Chez les rats nourris avec des extraits d'animaux clonés ou de témoins, des anticorps de type IgG, IgA et IgM, mais non de type IgE, dirigés contre le lait et la viande ont été identifiés. Les réactions immunitaires étaient similaires chez les deux lots de rats (Tomé *et al.*, 2004).

5.5 MUTAGENICITE

Les propriétés mutagènes des extraits de viande de vaches clonées ou non ont été évaluées par le test des micronoyaux. Aucun effet mutagène n'a été observé avec les produits issus des deux groupes de vaches (Takahashi et Ito, 2004).

6 Conclusions

Le clonage animal est une technique complexe et encore très empirique qui peut, en principe, être mise en œuvre pour accélérer le progrès génétique.

Malgré son efficacité encore limitée, la technique de clonage pourrait d'ores et déjà être exploitée pour pérenniser des géniteurs de haute valeur dans les élevages. Aussi est-il probable que des animaux clonés vont entrer prochainement dans les élevages conventionnels. Il est important de noter que la reproduction des animaux d'élevage par clonage sera pendant longtemps réservée à quelques individus d'élite. Les clones seront obtenus non pour être consommés mais pour donner naissance à des animaux qui eux seront destinés à l'alimentation humaine. L'état physiologique des clones et la qualité de leurs produits sont donc, de ce point de vue, moins importants que ceux de leurs descendants au regard de la sécurité des aliments.

Les observations faites à ce jour sur les animaux d'élevage clonés conduisent à des conclusions contrastées. Une proportion significative d'entre eux souffre d'altérations transitoires variées de leur santé. Ces effets sont le résultat de mécanismes divers et complexes qu'il n'est pas actuellement possible de décrire avec précision. Pour autant, une fois adultes, les animaux nés par clonage ne se distinguent guère de ceux nés après fécondation. Des études plus fines menées au niveau moléculaire, surtout chez la souris mais aussi chez les bovins, indiquent que les quelques différences que l'on observe parfois chez les clones ont disparu chez leurs descendants.

Du point de vue de la sécurité des aliments, la question se pose donc de savoir si les clones doivent être traités comme des animaux conventionnels, comme une nouvelle nourriture (nouvel aliment) ou comme faisant partie d'une catégorie intermédiaire.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a souhaité dresser un état des connaissances en matière de clonage animal et d'évaluer les risques liés à la consommation des produits issus d'animaux clonés. Au-delà de ces aspects de sécurité sanitaire des aliments, les aspects génétiques, de diversité génétique, de santé et bien-être animal ont aussi été considérés comme des éléments importants à prendre en compte dans cette évaluation.

6.1 L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES ANIMAUX CLONES ET DE LEURS DESCENDANTS

L'examen de quelques 1500 clones nés dans le monde a fait apparaître qu'une partie de leurs anomalies étaient, pour l'essentiel, diverses et reproductibles. Il est remarquable que la très grande majorité des veaux qui traversent sans dommage les premiers mois qui suivent leur naissance ont une vie semblable à celle des animaux obtenus par fécondation. En toute logique, il serait possible de considérer que les clones, et encore plus leurs descendants, ne sont pas différents des animaux obtenus par les méthodes de reproduction classique et qu'aucun examen particulier n'est justifié pour les introduire dans le circuit de produits alimentaires destinés à la consommation humaine. C'est la position que préconise la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis (Powell, 2003).

Le caractère de nouveauté des clones et les anomalies dont certains d'entre eux pâtissent, au moins pendant une période initiale de leur vie, invitent cependant à procéder à des examens plus approfondis que ceux qui sont appliqués aux animaux obtenus par fécondation.

Les caractéristiques physiologiques et zootechniques des clones et de leurs descendants devraient être évaluées pendant au moins deux générations. Il est probable que l'examen des descendants directs des clones doit suffire pour s'assurer qu'ils ne posent aucun problème physiologique particulier. Les analyses à développer devraient non seulement reprendre les tests physiologiques classiques mais pourraient aussi s'appuyer sur des analyses du transcriptome utilisé comme indicateur de l'état de normalité des animaux.

La mesure des paramètres morphologiques, métaboliques, endocriniens et immunitaires classiquement appliquée aux animaux conventionnels devrait être effectuée de la même manière pour les clones et surtout leurs descendants. Une liste non exhaustive, mais représentative de l'état

physiologique des animaux, de ces paramètres a été dressée plus haut (partie 1.4.1) ainsi que par Rudenko *et al.* (2004).

6.2 L'ETAT SANITAIRE DES ANIMAUX

Les animaux obtenus par clonage ont apparemment une santé qui, normalement, ne se distingue pas de celle des animaux conventionnels. Toutefois, les nouveaux clones obtenus à partir de cellules de clones primaires de vache sont plus fragiles que les descendants des clones obtenus par reproduction sexuée. Ce phénomène n'a, par contre, pas été observé chez la souris. Ceci signifie clairement que les vaches obtenues par clonage ne sont pas des animaux strictement identiques aux animaux conventionnels. Il a par ailleurs été observé qu'en moyenne les clones de souris vivent 10% moins longtemps que leurs homologues non clonés. Ceci est apparemment dû non à un vieillissement prématuré des animaux mais à une plus grande sensibilité vis-à-vis de maladies infectieuses classiques. Une observation faite chez les bovins va dans le même sens. Certains clones pâtiennent ou meurent de maladies rares ou classiques avec une fréquence anormalement élevée. Ces faits ont été établis à partir d'un nombre très réduit d'animaux, ce qui interdit toute conclusion ayant une portée générale, et invitent par contre à procéder à des examens particuliers des animaux.

Recherches complémentaires

Les données objectives relatives à l'évaluation de l'état sanitaire et du statut immunitaire des animaux clonés sont peu nombreuses et ne s'appuient pas toujours sur des paramètres mesurables ou de laboratoires. Des travaux devraient être conduits pour obtenir des informations complémentaires dans ces domaines. A titre d'exemples, les études suivantes pourraient être conduites pour comparer les statuts sanitaires et immunitaires des animaux clonés et ceux des animaux conventionnels et notamment par rapport aux animaux donneurs.

- Objectiver le suivi sanitaire des animaux clonés par rapport à un échantillon représentatif d'animaux conventionnels (plus particulièrement les donneurs ou les animaux situés dans le même environnement des donneurs) en prenant en compte les profils sérologiques vis à vis des principaux contaminants, vacciner les animaux clonés vis-à-vis des principaux pathogènes et comparer les réponses immunitaires tant sérologiques que celles liées à l'immunité à médiation cellulaire en utilisant des paramètres cumulés de mesure des réponses (Bruce *et al.*, 1999).
- Objectiver d'éventuelles modifications des fonctions immunitaires chez les animaux clonés (en tenant compte des particularités du système immunitaire de l'espèce concernée) en mesurant comparativement les populations cellulaires entre les animaux clonés et un échantillon représentatif de l'espèce concernée (incluant les donneurs) ou par rapport à des valeurs moyennes si elles sont connues à partir de la formule sanguine, en mesurant au cytomètre en flux les distributions de populations cellulaires ciblées sur les cellules mononuclées du sang périphérique : lymphocytes T incluant les CD4/CD8, les lymphocytes B, ..., en mesurant comparativement, par ponction de la moelle osseuse, les cellules souches des lignées myéloïdes et lymphoïdes.
- Tenter d'établir des corrélations entre les protocoles de clonage et le type ainsi que la fréquence des anomalies, le succès du développement *in utero* et des troubles de santé post-nataux.
- Engager les études nécessaires de physiopathologie concernant le développement *in utero* des clones afin, en particulier, de comprendre le déterminisme du LOS (syndrome du gros nouveau-né) ainsi que celui de l'hydramnios et/ou de l'hydrallantoïde en identifiant la contribution respective des deux phénomènes aux problèmes du développement *in utero*.

Evaluation des risques en santé animale

Une surveillance permettant de mettre en évidence une éventuelle sensibilité des clones et de leurs descendants vis à vis de certaines maladies paraît donc nécessaire pour assurer la santé des animaux individuellement mais aussi pour maintenir les troupeaux à l'abri de l'émergence éventuelle de maladies propagées plus particulièrement par les clones (cf. 3.2.4).

En ce qui concerne l'estimation des risques en matière de santé animale, il conviendrait de mettre en œuvre les mesures suivantes :

- évaluer le statut sanitaire, avant clonage, des animaux donneurs et receveurs ainsi que la présence des principaux pathogènes, en fonction de l'espèce concernée ;
- étudier comparativement chez les animaux clonés et un échantillon représentatif de l'espèce concernée incluant les donneurs élevés dans un même environnement, les flores digestives et respiratoires incluant certains agents microbiens comme les salmonelles et les *Campylobacter* ;
- identifier les causes déterminantes de la mortalité post-natale jusqu'à 6 mois (incluant des analyses de laboratoires dont microbiologiques) ;
- dépister systématiquement les marqueurs génétiques connus des affections héréditaires chez les animaux clonés (cf. 3.2.3) ;
- assurer un suivi sanitaire permanent (jusqu'à la mort avec autopsie systématique) de chaque animal cloné ;
- observer à l'aide de protocoles ad hoc le devenir du point de vue sanitaire de plusieurs (au moins quatre) générations issues des animaux clonés.

6.3 L'IMPACT SUR LA GENETIQUE DES ESPECES CONCERNEES

La réduction de la diversité génétique résultant d'une utilisation mal contrôlée du clonage peut avoir à long terme divers effets négatifs. L'impact négatif de l'insémination artificielle classique sur la diversité génétique est déjà pris en compte. Les solutions techniques pour assurer une gestion génétique saine des troupeaux existent déjà et sont efficaces, pour peu qu'on ait la volonté effective de les appliquer. Ceci n'est pas toujours le cas autant que cela serait souhaitable avec l'insémination artificielle classique. Une application plus rigoureuse des méthodes de sélection des animaux d'élevage est donc hautement souhaitable avec l'exploitation de géniteurs clonés. En règle générale, les géniteurs clonés ayant un pedigree déjà fréquemment représenté ne devraient être exploités que modérément pour éviter d'accélérer encore plus la réduction de la diversité génétique. A l'inverse, une exploitation privilégiée de géniteurs clonés ayant un pedigree rare pourrait être recommandée puisqu'elle se traduit, en pratique, par une augmentation de la diversité génétique.

Les exemples cités dans la partie 4.2 invitent à ne pas considérer que l'utilisation de géniteurs clonés conduit inexorablement à la réduction de la diversité génétique dans les élevages. Bien au contraire, le choix raisonné des géniteurs obtenus par clonage peut contribuer à maîtriser les méfaits des méthodes de sélection classique. Le succès de l'entreprise repose sur un choix rigoureux des géniteurs qui doivent être reproduits par clonage (originalité génétique et bon équilibre du profil zootechnique) mais aussi sur une analyse approfondie du patrimoine génétique des troupeaux qui sont susceptibles de bénéficier ainsi d'un enrichissement de leur diversité génétique.

Il est par ailleurs essentiel que l'intégrité des génomes clonés soit aussi complète que possible (notamment sans modifications de type épigénétique). La méthode de diagnostic qui reste à développer devrait être basée non seulement sur les marqueurs génétiques associés aux QTL des caractères les plus importants mais aussi sur d'autres marqueurs non spécifiques, notamment dans les régions du génome où s'exercent normalement les phénomènes d'empreinte génétique au cours du développement.

Des mesures expérimentales de l'expression du génome des descendants des clones pourraient être aussi réalisées par des examens systématiques de leurs transcriptomes et de leurs protéomes.

6.4 L'IMPACT DU CLONAGE SUR LE BIEN ETRE DES ANIMAUX CLONES

Selon le principe énoncé dans le traité d'Amsterdam, le bien-être recouvre à la fois la santé des animaux et leur condition physique mais aussi leur état mental et leur capacité à faire face aux fluctuations défavorables de leur environnement. La prise en compte de critères de bien-être dans les élevages d'espèces d'intérêt commercial depuis 20 ans est une donnée constante qui prend de plus

en plus de poids dans l'évaluation des nouvelles techniques d'élevage. Dans ce contexte, il était logique que le clonage animal soit aussi évalué pour ses conséquences sur le bien-être des individus clonés.

Les anomalies et désordres physiopathologiques observés chez les animaux clonés sont inhérentes à la technique de clonage mais il est parfaitement concevable que des améliorations à cette technique permettront d'en atténuer les effets actuellement observés. Cependant, il conviendra de rester vigilant sur l'impact du clonage au regard du bien-être animal et de prendre en compte des critères de bien-être dans les programmes de suivi des animaux issus du clonage.

6.5 LA QUALITE DES PRODUITS ALIMENTAIRES ISSUS DES CLONES

Les deux principaux produits animaux, le lait et la viande, ont déjà fait l'objet d'essais de digestibilité, alimentarité, toxicité, allergénicité et mutagénicité. Les résultats de ces essais obtenus sur un nombre limité d'animaux clonés (non destinés à la consommation humaine) ne montrent aucune différence entre les animaux testés et les témoins.

Cependant, ce type d'essais devrait être appliqué, pendant quelques temps au moins, pour les clones et surtout pour ceux de leurs descendants qui seront destinés à entrer dans les élevages.

L'ensemble de ces essais paraît important pour décrire les propriétés biologiques des clones et pour définir des critères permettant d'autoriser ou non leur consommation par l'homme. Il n'est pas certain que ces mesures soient justifiées autrement que de manière transitoire. Il est en effet concevable que l'absence répétée de problèmes pendant plusieurs années rende la plupart de ces tests inutiles. Une surveillance à long terme paraît toutefois nécessaire pour pouvoir identifier des maladies que pourraient contracter les clones ou leurs descendants et prévenir leur émergence.

6.6 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS GENERALES

L'analyse des bénéfices et des risques du clonage qui fait l'objet de ce rapport se réfère majoritairement aux bovins. C'est en effet pour cette espèce que la mise en œuvre du clonage pourrait avoir un impact économique significatif et relativement rapide. Il doit pour autant être considéré que les conclusions qui découlent de cette analyse sont extrapolables pour l'essentiel aux autres espèces d'animaux d'élevage.

Les données acquises suggèrent que les animaux descendants des clones, qui sont les seuls susceptibles d'être proposés aux consommateurs, peuvent être traités comme leurs équivalents issus des méthodes de reproduction classiques. Les tests appliqués de longue date aux animaux conventionnels pour la mise en vente des carcasses devraient donc mettre les consommateurs à l'abri de tout risque.

Il est toutefois nécessaire de procéder à des examens plus approfondis, basés sur des mesures de paramètres biologiques divers. Des observations pertinentes ont déjà été faites mais leur nombre est trop limité pour autoriser une généralisation. Il convient donc d'accumuler des données concernant les animaux issus directement d'un clonage mais aussi et surtout de leurs descendants pendant plusieurs générations.

Les effets délétères du clonage à l'intérieur d'une espèce sont reproductibles et observés dans tous les laboratoires où ces méthodes sont mises en œuvre. Les conclusions qui seront tirées des observations, faites à partir d'un nombre suffisant d'animaux, devraient donc pouvoir être considérées comme généralisables. Ceci implique que les études de risques pourraient être restreintes à un nombre limité d'animaux expérimentaux examinés de manière approfondie et non sur chaque animal cloné. Toute modification profonde de la méthode de clonage pourrait cependant justifier, au cas par cas, quelques comparaisons avec les clones obtenus par les méthodes en vigueur.

Création de troupeaux spécifiquement dédiés à l'étude des clones et de leurs descendants

L'étude des clones dans les divers laboratoires concernés est actuellement faite au cas par cas sur quelques animaux. Les résultats préliminaires obtenus sont intéressants dans la mesure où ils indiquent les points qui doivent certainement faire l'objet d'examen plus approfondis.

Les pratiques actuelles ne permettent aucune généralisation en particulier pour les éventuels effets du clonage qui ne s'expriment qu'à long terme. Il est donc hautement souhaitable de disposer d'un nombre suffisamment important de clones obtenus et étudiés simultanément et donc dans des conditions comparables auxquelles il est possible de se référer.

La création et l'entretien de tels troupeaux sont des opérations relativement onéreuses. Une concertation sur le plan international paraît plus que souhaitable. De tels projets pourraient bénéficier d'un soutien financier de l'Union européenne qui s'est déclarée favorable à ce genre d'étude.

Création d'un comité de surveillance

Les travaux des différents laboratoires impliqués dans l'étude des effets secondaires du clonage des animaux d'élevage pourraient avantageusement être suivis par un comité interdisciplinaire. Les évaluations de ce comité pourraient permettre d'éviter les redondances et les lacunes et les programmes de recherche sur les risques engendrés par le clonage. Les recommandations du comité pourraient également servir de garanties pour les organismes qui assureraient le soutien financier de ces recherches.

Annexe

Le dispositif de la sélection génétique en France

A.1 INTRODUCTION

L'amélioration génétique des races d'élevage est une pratique ancienne et son évolution, en fonction des progrès scientifiques, a conduit à la mise en place en France par exemple pour la race bovine d'un dispositif technique et réglementaire très encadré.

Pour comprendre l'intérêt et les conditions de mise en œuvre des techniques de clonage, il est nécessaire d'abord d'analyser de façon détaillée les méthodes et le dispositif en place qui jouent un rôle essentiel dans les conditions présentes et les résultats obtenus quant à la qualité des produits. Dans un second temps, seront développés l'apport et le rôle possibles du clonage.

L'amélioration génétique dans l'espèce bovine repose en France principalement sur un dispositif qui résulte de l'application de la loi sur l'Élevage adoptée en 1966. Un cadre législatif précis définit les missions des différents organismes professionnels pour le bon fonctionnement de ce dispositif, piloté et ajusté en permanence au sein d'une commission consultative auprès du ministre de l'Agriculture : la Commission Nationale d'Amélioration Génétique (CNAG).

Ce dispositif national, dont le but est d'évaluer génétiquement les reproducteurs et d'organiser la sélection des meilleurs d'entre eux, est fondé (i) sur un système de collecte et de gestion des données zootechniques et (ii) sur un protocole d'identification, d'évaluation et de sélection des reproducteurs mâles.

A.2 BILAN DES METHODES D'AMELIORATION GENETIQUE DES RACES D'ELEVAGE

A.2.1 *Le dispositif de collecte et de gestion des données zootechniques*

Ce dispositif a pour objectif d'organiser, sur des bases homogènes, la collecte, la validation, le traitement et l'acheminement de toutes les données vers un site central d'évaluation génétique. Ces données concernent l'identification des animaux, l'état civil, les niveaux de production, la morphologie ou d'autres aptitudes fonctionnelles faisant l'objet d'un contrôle systématique pouvant contribuer à définir des schémas de sélection.

Pour garantir une qualité homogène des données collectées sur l'ensemble du territoire français, ce système s'appuie sur un ensemble de protocoles et de règlements techniques, agréés par le ministère de l'Agriculture, et supervisés par l'Institut de l'Élevage. La collecte des informations est assurée, sur le terrain, par des techniciens d'organismes habilités et spécialisés que sont d'une part les Etablissements Départementaux de l'Élevage (EDE) (au nombre de 80 en France), et d'autre part les Organismes de Contrôle des Performances ou OCP (contrôle laitier, contrôle de croissance) pour les données de production.

La gestion globale de ces interventions est placée sous la responsabilité des organismes territorialement compétents, les EDE, agréés pour cette mission par le Ministère de l'Agriculture. Pour certaines données de morphologie et d'autres aptitudes, la collecte des données est réalisée complémentirement par les organismes raciaux (UPRA) ou les unités de sélection.

Le traitement des données, assuré par l'intermédiaire du Système d'Information Géographique (SIG) est organisé sous la forme d'une base de données répartie entre les Centres Régionaux Informatiques (CRI) et le Centre de Traitement de l'Information Génétique (CTIG de l'INRA). Chaque organisme local, racial ou national pourvoyeur de données brutes (mesure du poids de lait, pesées, des animaux, inséminations, pointages, etc.) ou élaborées (lactations, index, etc.) a accès à une information gérée, validée et centralisée.

A.2.2 Le dispositif de sélection des reproducteurs

La conduite des programmes

Les centres d'insémination animale sont agréés par le Ministère de l'Agriculture comme centres de mise en place ou comme centres de production de semence.

Les centres de mise en place des programmes ont pour mission d'utiliser des semences de taureaux agréés ou autorisés pour l'insémination par le Ministère de l'Agriculture et de d'établir des contrats avec une ou plusieurs unités de sélection afin de garantir l'approvisionnement régulier des éleveurs de la zone dans laquelle ils interviennent de façon exclusive.

Les centres de production de semence ont pour mission de conduire un ou plusieurs programmes de sélection. On parle alors d'unités de sélection.

Les unités de sélection sont généralement des unions de centres de mise en place, organisées sur une base nationale ou régionale suivant l'importance des programmes et des races. Elles ont la totale responsabilité de ces programmes et sont propriétaires des taureaux et de leur semence qu'elles rétrocèdent ensuite aux centres de mise en place adhérents ou éventuellement à d'autres unités de sélection après que l'agrément des taureaux pour l'insémination ait été obtenu. Elles confient, le plus souvent aux coopératives de base, la réalisation matérielle de certains aspects du programme, comme le testage en ferme et la production de semence. Elles réalisent, en revanche, toujours elles-mêmes le recrutement des mères à taureaux, les accouplements dirigés ainsi que le recrutement des taurillons et la gestion des stations de contrôle individuel ou de contrôle de descendance (production d'animaux de boucherie ou d'élevage).

L'agrément des taureaux ne peut être accordé que si :

- les taureaux ont été mis à l'épreuve dans le cadre d'un programme de sélection agréé,
- un index de sélection a été calculé et publié à partir des résultats obtenus lors des épreuves sur descendance, et ce, pour chaque aptitude,
- les index sont suffisamment précis,
- les valeurs d'index attestent qu'ils sont améliorateurs.

Aujourd'hui, 29 programmes de sélection, dans 14 races, sont agréés par le Ministère de l'Agriculture qui garantit la qualité de l'évaluation génétique et le progrès génétique que l'on peut obtenir. Les normes d'agrément des programmes et des taureaux sont périodiquement revues par le Ministère de l'Agriculture. Huit races laitières et 6 races bouchères disposent de programmes de sélection incluant la mise à l'épreuve sur descendance (tableaux 1, 2 et 3).

La base de sélection

La base de sélection des différentes populations bovines repose sur l'ensemble des animaux identifiés, dont les filiations sont enregistrées et validées par les EDE. Ces animaux sont soumis au contrôle de performances en ferme (contrôle laitier et contrôle de croissance). C'est à partir de cet ensemble d'animaux que les opérations de contrôle de descendance sont réalisées et que sont recrutées les mères à taureaux.

L'examen des tableaux 1, 2 et 3 permet de constater que la France possède un effectif contrôlé très important pour les principales races laitières exploitées.

Tableau 1 : Statistiques générales des programmes "lait"
(sources SCEES du MAAPAR⁽¹⁾ ; IE-FCL⁽²⁾ ; UNCEIA⁽³⁾)

Races	Nombre de vaches	Nombre d'IA par race de mâle (1)	Nombre de femelles inséminées	Nombre de vaches au Contrôle Laitier	Nombre de taureaux mis à l'épreuve (2)	Effort de testage (1)/(2)
Prim'Holstein	2 338 000	2 287 464	2 541 603	1 946 011	614	3 726
Normande	532 000	423 318	447 920	283 177	154	2 749
Montbéliarde	654 000	465 277	595 848	380 403	162	2 872
Abondance	53 000	31 476	39 604	19 847	15	2 098
Simmental Française	33 000	23 059	22 644	13 861	11	2 096
Brune	24 300	20 045	22 221	15 936	8	2 506
Pie Rouge des Plaines	28 000	11 932	15 281	10 311	7	1 705
Tarentaise	14 600	8 947	9 824	7 757	14	639
TOTAL	3 676 900	3 271 518	3 694 945	2 677 303	985	3 321

IA : Insémination artificielle

IAP : Insémination artificielle première

Le nombre de vaches (femelles primipares) est estimé à partir du recensement agricole 2000 et des évolutions constatées chaque année sur le nombre d'IAP.

Le nombre de femelles inséminées intègre les vaches et les génisses inséminées (respectivement 73% et 27% du total)

Tableau 2 : Statistiques générales des programmes "viande"
(sources SCEES du MAAPAR⁽¹⁾ ; IE-FBC⁽²⁾ ; UNCEIA⁽³⁾)

Races	Nombre de vaches ¹	Nombre d'IA par race de mâle	Race pure	Nombre de femelles inséminées	Nombre de vaches à Bovins Croissance ²	Nombre de taureaux mis à l'épreuve		Nombre de descendance contrôlées	
						Qualité Maternelle	Aptitude Bouchère	Qualité Maternelle	Aptitude Bouchère
Charolaise	1 666 000	489 996	222 468	229 928	247 276	35	0	19	19
Limousine	861 000	261 649	110 552	120 046	143 292	12	10	12	12
Blonde	441 000	163 257	116 970	120 532	98 758	10	5	7	16
INRA 95	(-)	53 310	(-)	(-)	(-)	(-)	8	(-)	8,5
TOTAL	2 968 000	968 212	449 990	470 506	489 326	94	15	38	47

IA : Insémination artificielle

¹ : Le nombre de vaches est estimé à partir du recensement agricole 2000 et des évolutions constatées chaque année sur le nombre d'IAP.

² : Dénomination du contrôle de performance pour les programmes "viande", conduits par l'Institut de l'Élevage et France Bovin Croissance.

Tableau 3 : Statistiques des races mixtes ou en reconversion "lait-viande"
(sources SCEES du MAAPAR⁽¹⁾ ; IE-FBC⁽²⁾ ; UNCEIA⁽³⁾)

Races	Nombre de vaches ¹	Nombre d'IA par race de mâle	Race pure	Nombre de femelles inséminées	Nombre de vaches au Contrôle Laitier	Nombre de vaches à Bovins Croissance ²	Nombre de taureaux autorisés à l'IA
Rouge des Prés	51 000	9 856	9 316	10 633	41	12 195	4
Salers	188 000		9 656	17 555	1 897	27 625	2
TOTAL	239 000	20 897	18 972	28 188	1 938	39 820	6

IA : Insémination artificielle

IAP : Insémination artificielle première

¹ : Le nombre de vaches est estimé à partir du recensement agricole 2000 et des évolutions constatées chaque année sur le nombre d'IAP

² : Dénomination du protocole de contrôle de performance pour les programmes "viande"

La situation est un peu différente pour les races bouchères : malgré la hausse des effectifs contrôlés, ces derniers ne sont pas encore suffisants pour être utilisés comme support de testage exclusif. Des aménagements de protocole de contrôle de performances en ferme sont actuellement à l'étude pour atteindre ce but. L'effectif contrôlé sert néanmoins de réservoir pour le recrutement des reproducteurs,

notamment grâce à l'évaluation génétique des reproducteurs en ferme (IBOVAL). Le quart des vaches contrôlées est inséminé pour améliorer le niveau génétique de ces élevages et assurer la connexion génétique entre troupeaux.

Le choix sur ascendance

Le repérage systématique des meilleures vaches, le choix précis des pères à taureaux, l'utilisation des accouplements raisonnés et du transfert embryonnaire permettent d'introduire dans les schémas de sélection les meilleurs reproducteurs de leur génération.

Environ 20 % des transferts embryonnaires ont été réalisés dans le cadre des schémas collectifs d'amélioration génétique. Le transfert embryonnaire (TE) permet en particulier de créer et de gérer des noyaux de génisses de très haut niveau génétique, destinées à produire des reproducteurs qui sont ainsi les fils des meilleurs taureaux et des génisses, elles-mêmes filles des meilleurs taureaux. Le raccourcissement de l'intervalle entre générations, rendu possible par l'augmentation de la pression de sélection sur les mères des futurs taureaux (TE et encore davantage OPU-FIV -ouovum pick up-fécondation *in vitro*), ainsi que par la certitude d'obtenir un veau mâle au moins pour chaque femelle intéressante, garantit un progrès génétique plus rapide. Cette voie approvisionne 50 % des schémas laitiers des grandes races.

Le reste des recrutements est effectué classiquement à partir des accouplements entre des pères à taureaux et des mères à taureaux. Ces dernières sont choisies selon des critères extrêmement sévères qui les placent parmi les 1 à 2 % des meilleures reproductrices contrôlées de la race. Ces accouplements sont, bien entendu, réalisés dans le cadre des schémas laitiers, mais aussi (et la France occupe à cet égard une place originale au plan mondial) dans le cadre des schémas collectifs appliqués aux races bouchères.

Un programme de sélection assistée par marqueurs est en place depuis 2000 dans les races Holstein, Normande et Montbéliarde. Ce programme d'une ampleur exceptionnelle va permettre d'optimiser le choix des reproducteurs à mettre à l'épreuve. L'année 2003 correspond à la première année où le choix de la majorité des veaux à mettre à l'épreuve a été effectué sur les index SAM pour 8 caractères de production, de fertilité et de résistance aux maladies. Pour ce faire, 10 000 typages sont réalisés chaque année pour caractériser les familles et, pour les candidats, leurs mères ou les noyaux de sélection. Ce programme, piloté par l'INRA et une coopérative d'éleveurs, l'UNCEIA, auquel une entreprise privée, LABOGENA, est associée, est unique au monde et ne peut être mis en place que grâce à l'organisation originale de la sélection génétique française. Il constitue de plus une ressource exceptionnelle pour la caractérisation des gènes et la recherche des mutations intéressantes.

Le contrôle individuel

Les veaux issus d'accouplements raisonnés sont élevés dans les stations de contrôle individuel, afin de choisir, sur la base de critères de conformation, de croissance et d'efficacité alimentaire, ceux qui devront être destinés soumis au testage.

Dans le cas des races rustiques où les programmes de mise à l'épreuve n'existent pas, l'évaluation individuelle de taurillons destinés soit à l'insémination artificielle (IA), soit à la monte naturelle, est indispensable. C'est pour cette raison que les unités de sélection retiennent les 3 ou 4 meilleurs taurillons issus des centres d'élevage en vue d'une utilisation en IA ; les autres sont soit destinés à la monte naturelle, soit éliminés.

Selon les races, le nombre de taurillons qui ont fait l'objet d'un contrôle effectif sur les performances individuelles suivant le protocole INRA - Institut de l'Élevage, est variable (tableau 4). Les données indiquent que :

- 1503 taurillons ont été contrôlés individuellement en station. Cet effectif, varie peu sur un pas de temps de quelques années (1 503 en 2001 et 1 373 en 2002) ;
- presque tous les taureaux de races bouchères sont contrôlés individuellement avant d'être mis à l'épreuve, la pression de sélection exercée en station étant très forte (un taureau conservé pour trois taureaux entrés en station). Les stations d'évaluation sont utilisées pour les races où n'existe pas de mise à l'épreuve sur descendance.

Tableau 4 : Activité des stations de contrôle individuel en 2003 (comparée à 2002) :
nombre de taurillons contrôlés quant à leurs performances individuelles
(sources UNCEIA)

Races	Taurillons			
	Entrés		Conservés	
	2003	2002	2003	2002
Normande	388	383	154	157
Montbéliarde	426	421	162	159
Abondance	43	19	15	17
Tarentaise	25	18	14	14
Charolaise	132	127	35	68
Limousine	42	42	22	12
Blonde d'Aquitaine	57	48	15	12
Rouge des Prés (station d'évaluation)	77	65	4	4
Bazadaise (station d'évaluation)	6	0	2	0
Aubrac (centre d'élevage)	133	110	3	3
Gasconne (centre d'élevage)	70	62	3	3
Salers (centre d'élevage)	90	61	2	1
INRA 95	14	17	8	0
Races laitières ⁽¹⁾	882	841	345	347
Races bouchères spécialisées ⁽²⁾	231	217	72	92
Centres d'élevage ⁽³⁾	376	298	14	11
Souche ⁽⁴⁾	14	17	8	0
TOTAL GENERAL	1503	1373	439	450

⁽¹⁾ Normande, Montbéliarde, Abondance, Tarentaise

⁽²⁾ Charolaise, Limousine, Blonde d'Aquitaine

⁽³⁾ Maine-Anjou, Bazadaise, Aubrac, Gasconne, Salers

⁽⁴⁾ Inra 95

Le contrôle sur descendance

Les opérations de mise à l'épreuve sur descendance sont la clé de voûte des programmes de sélection. L'organisation de la base de sélection est telle que tous les taureaux mis à l'épreuve atteignent rapidement un niveau de précision suffisant pour procéder sans risque au choix des géniteurs. Dans ce but, les programmes de sélection des grandes races font l'objet d'un protocole de testage rigoureux qui comprend un examen comparé des effets d'une partie des IA de testage pour vérifier, si nécessaire, l'absence de biais dû à un effet région.

- En races laitières, 985 taureaux ont été mis à l'épreuve en 2003, contre 980 en 2002. Cet effectif est globalement stable depuis 1990. L'effort de testage, mesuré par le rapport du nombre de taureaux mis à l'épreuve sur le nombre d'insémination artificielle première (IAP) par taureau est de un pour 3 321 (tableaux 1 et 2).

Le choix est d'autant plus sévère que l'effectif contrôlé est important. Les taureaux, qui ont subi toutes les épreuves et ont obtenu un index génétique connu avec une précision minimale, sont présentés à une Commission de Surveillance des Programmes. Celle-ci va proposer au ministère de l'Agriculture l'agrément ou non pour l'utilisation de ces taureaux en insémination artificielle. Un taureau sur 9 présentés en commission de surveillance est agréé mais un sur 13 seulement sera utilisé intensivement dans les races laitières. Même si le nombre total de taureaux utilisés est très important (plus de 6 000), la moitié des inséminations réalisées dans chacune des grandes races n'est le fait que de quelques dizaines de taureaux.

- En races bouchères, 22 taureaux sont mis à l'épreuve en 2003 sur leurs qualités maternelles. De plus, 19 descendance sont actuellement contrôlées pour ce seul programme, au travers des filles en station.

Par ailleurs, 15 taureaux sont aussi mis à l'épreuve sur la base de leurs aptitudes bouchères. De plus, 28 de leurs descendance sont contrôlées. Ne sont pas comprises les descendance des Charolais

(26 descendances en 2003) qui sont contrôlées pour le programme muscularité précoce. Suivant les types de production, ce contrôle de descendance est réalisé soit en ferme, soit en station.

L'ampleur de ces programmes de sélection est tout à fait remarquable et unique dans les pays d'élevage bovin développé. C'est grâce à l'effort constant des unités de sélection que ces programmes ont atteint leur niveau actuel et permis un relatif développement de l'insémination en troupeau allaitant. Les taureaux améliorateurs utilisés en insémination couvrent une très large gamme de types de production, du veau vendu précocement au jeune bovin, comme le montrent les bilans génétiques bouchers.

A.2.3 Contrôle de la qualité de la sélection

La qualité des programmes et du travail accompli par les unités de sélection peut se vérifier grâce aux bilans génétiques calculés chaque année par l'INRA et l'Institut de l'Elevage. Pour calculer ces bilans génétiques, il existe deux possibilités :

- la base fixe : elle mesure la différence génétique entre le niveau génétique laitier des IA réalisées une année donnée avec celui des femelles ayant produit, nées de 1978 à 1981 (avec 1^{er} vêlage à partir du 1^{er} septembre 1980) ;
- la base mobile qui fait référence aux index qu'utilisent les éleveurs. Ainsi, chaque année, la population, dont l'index moyen est nul par convention, définit la base mobile. Cette population regroupe les taureaux d'insémination animale :
 - * testés sur descendance en France,
 - * ayant un coefficient de détermination (CD) ≥ 70 et nés de 1992 à 1995 pour les races Montbéliarde, Normande et Prim'Holstein,
 - * ou ayant un CD ≥ 50 et nés de 1990 à 1995 pour les races Abondance, Pie Rouge, Brune, Tarentaise et Simmental Française.

Races laitières

Le bilan du progrès génétique établi sur 10 ans pour les 3 principales races laitières (tableau 5), montre l'évolution de ce bilan génétique au cours du temps : sur le seul critère "Lait", le niveau génétique des vaches laitières contrôlées a progressé de près de 107 kg/an en Holstein, 75 kg/an en Normande et 69 kg/an en Montbéliarde. Cette hausse du niveau génétique explique en grande partie l'augmentation annuelle de la production des vaches inscrites au contrôle laitier puisqu'on observe, pour chacune de ces races, une dégradation de l'effet troupeau.

Le contrôle laitier mesure de façon objective ce que l'éleveur constate. Les valeurs constatées pour les différents paramètres mesurés expriment la résultante entre l'effet génétique imputable à l'IA et l'effet dû à la conduite du troupeau. L'essentiel du progrès s'explique par la génétique plutôt que par l'effet troupeau qui se dégrade. La colonne bilan génétique indique le bilan moyen par IA dans le troupeau.

Tableau 5 : Bilan du progrès génétique sur 10 ans (1993-2003)
(sources Institut de l'Elevage)

	Niveau génétique	Effet troupeau	Contrôle laitier	Bilan génétique des IAP
Prim'Holstein				
INEL (points/an)	4,58			5,1
TP (g/kg/an)	0,07	-0,02	0,08	0,05
TB (g/kg/an)	-0,11	0,06	-0,02	-0,18
Lait (kg/an)	106,9	-11,4	108,2	129,4
Matière protéique (kg/an)	4	-0,4	4	4,5
Matière grasse (kg/an)	3,3	-0,1	4,2	3,6

		Niveau génétique	Effet troupeau	Contrôle laitier	Bilan génétique des IAP
Normande					
Progrès	INEL (points/an)	3,86			4
	TP (g/kg/an)	0,1	-0,03	0,1	0,02
	TB (g/kg/an)	-0,01	0	0,01	-0,05
	Lait (kg/an)	74,8	-13,7	54,3	92,2
	Matière protéique (kg/an)	3,2	-0,7	2,4	3,3
	Matière grasse (kg/an)	3,2	-0,6	2,5	3,8
Montbéliarde					
Progrès	INEL (points/an)	3,03			3,2
	TP (g/kg/an)	0,03	-0,01	0,04	-0,01
	TB (g/kg/an)	0	0,04	0,05	-0,1
	Lait (kg/an)	68,8	-13,8	50,4	87,5
	Matière protéique (kg/an)	2,5	-0,6	1,9	2,8
	Matière grasse (kg/an)	2,8	-0,4	2,2	2,8

IAP : insémination artificielle première

INEL : index économique laitier

TP : taux protéique

TB : taux butyreux

Races bouchères

Les bilans pour les principaux types de production (tableaux 6 et 7) dans les trois grandes races bouchères permettent de se rendre compte de la qualité des géniteurs proposés aux éleveurs et des choix zootechniques que ces derniers réalisent pour procréer les produits souhaités. Ces choix sont différents suivant les races et varient dans le temps.

Dans les races bouchères, les index sont centrés sur 100. La valeur moyenne des index est donc exprimée par rapport à 100 à partir des moyennes et des écarts-types de chaque série que l'on compare à des témoins. Les colonnes pour lesquelles les gains sont les plus significatifs correspondent à des objectifs majeurs de sélection. Les qualités maternelles représentent la synthèse des critères des autres colonnes (fertilité, vêlage, allaitement).

Tableau 6 : Production de viande, par race et type de production

(sources Institut de l'Élevage – INRA)

Races	Type de production	Facilité de naissance		Poids à âge type		Conformation		Rendement carcasse		Aptitudes bouchères		Insémination artificielle première	
		1993	2003	1993	2003	1993	2003	1993	2003	1993	2003	1993	2003
Charolaise	Aptitudes de naissance	102	106			116	124					247 570	202 090
	Jeunes Bovins Station	101	101	102	103	103	104	104	103	104	105	399 760	241 560
Limousine	Veaux Boucherie	98	102	107	102	114	109	107	104	111	106	151 410	140 180
	Jeunes Bovins Station	98	97	99	102	105	107	101	100	103	103	183 230	105 390

Races	Type de production	Facilité de naissance		Poids à âge type		Conformation		Rendement carcasse		Aptitudes bouchères		Insémination artificielle première	
		1993	2003	1993	2003	1993	2003	1993	2003	1993	2003	1993	2003
Blonde d'Aquitaine	Veaux Boucherie	100	103	106	103	108	106	104	103	106	106	130 120	39 760
	Atelier Jeunes Bovins Station	97	102	99	103	107	109	103	103	101	105	110 340	94 810
INRA 95	Veaux Boucherie Atelier	102	103	99	107	128	133	107	118	113	116	71 240	57 330

Le tableau 7 présente la valeur génétique moyenne des inséminations réalisées à l'aide de taureaux agréés pour la production de femelles de renouvellement dans les trois grandes races bouchères françaises. Là encore, les objectifs de sélection poursuivis au niveau de chaque race correspondent bien aux choix des éleveurs.

Dans les races bouchères, les index sont centrés sur 100. La valeur moyenne des index est donc exprimée par rapport à 100 à partir des moyennes et des écarts-types de chaque série que l'on compare à des témoins.

Tableau 7 : Valeur génétique moyenne des inséminations de femelles d'élevage
(sources Institut de l'Élevage – INRA)

Races	Croissance Développement		Fertilité		Vêlage		Allaitement		Qualités maternelles		Insémination artificielle première	
	1993	2003	1993	2003	1993	2003	1993	2003	1993	2003	1993	2003
Charolaise	101	106	101	105	107	106	105	108	106	110	172 520	213 770
Limousine	98	115	103	104	104	100	103	112	103	116	64 540	73 330
Blonde d'Aquitaine	98	104	100	108	100	101	108	103	103	107	86 960	82 630

La figure 4 présente l'évolution historique des programmes lait et viande. Sont indiqués les effectifs de taureaux mis à l'épreuve et l'effort génétique associé, pour les races laitières et les races bouchères. L'évolution de cet effort génétique est visualisée par une donnée calculée de telle façon qu'elle augmente quand le nombre d'IAP/taureau mis à l'épreuve diminue.

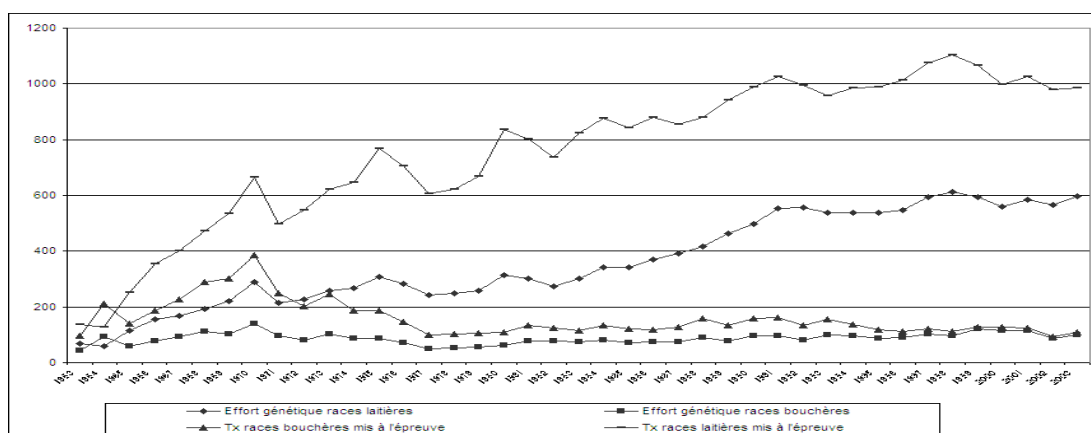


Figure 4 : Evolution historique des programmes de sélection des races laitières (2 courbes supérieures) et bouchères (2 courbes inférieures) entre 1963 et 2003

Les courbes supérieures représentent les données pour les races laitières. La 1^{ère} courbe représente l'évolution du nombre de taureaux laitiers mis à l'épreuve par an. La diminution de la pente depuis 1991 traduit une réduction de la taille des programmes qui dépend des besoins donc des inséminations réalisées. La 2^{ème} courbe représente l'évolution de l'effort de sélection qui est traduit par le rapport entre le nombre d'IA et le nombre de taureaux mis à l'épreuve. Il représente la capacité d'investissement des unités de sélection. Exemple : en moyenne, on teste 1 taureau pour 3800 IA Holstein et 1 taureau pour 2500 IA normande.

Les courbes inférieures traduisent les mêmes données mais pour les races bouchères. On remarque une diminution du nombre de taureaux mis à l'épreuve (période 1970-1977), puis une stagnation qui se poursuit depuis de nombreuses années. La pente quasi nulle de la courbe traduit la constance de l'investissement en terme d'effort de sélection.

A.2.4 Le calcul des évaluations génétiques des reproducteurs

Le calcul de l'évaluation génétique des reproducteurs est une opération éminemment scientifique. Pour être performante, elle exige de traiter un très grand nombre d'informations selon des méthodes statistiques appropriées ayant pour but la recherche d'un compromis optimum entre la finesse du modèle et les données réelles. En France, toutes les évaluations génétiques sont sous la responsabilité directe des chercheurs généticiens de l'INRA qui disposent de l'ensemble des données centralisées sur le site national du CTIG de l'INRA.

Concrètement, pour tous les caractères et dans toutes les espèces, le "BLUP modèle animal" qui tient compte de nombreux facteurs de variation non génétiques est systématiquement appliqué.

La diffusion officielle des index de valeur génétique est confiée, pour les espèces bovine, ovine et caprine à l'Institut de l'Élevage. Elle vise à garantir l'objectivité des résultats et l'indépendance des détenteurs de reproducteurs ou des structures directement concernées par la valorisation génétique ou commerciale des résultats.

Les experts des instituts techniques nationaux sont, depuis l'origine, très impliqués dans les travaux et les instances ayant permis depuis quelques années une évaluation génétique internationale des taureaux laitiers dans le cadre d'Interbull (sous-comité d'ICAR : International Committee for Animal Recording), dont la tâche est d'harmoniser l'évaluation génétique des bovins entre les différents pays et de procéder aux classements internationaux des animaux.

L'INRA et les instituts techniques nationaux sont reconnus par la Commission européenne comme organismes officiels habilités à réaliser et diffuser les résultats des évaluations génétiques. La France participe aux classements internationaux mis en place par Interbull pour les races Holstein, Brune et Simmental depuis 1995.

A.2.5 Spécificités de l'organisation de la sélection des races bovines à viande en France

L'organisation de la création et de la diffusion du progrès génétique dans le cas des races bovines bouchères repose sur deux volets :

- d'une part la sélection et la diffusion large par IA de semences de taureaux évalués avec précision et sélectionnés parmi ceux mis à l'épreuve dans les programmes de sélection (élevage et insémination) ;
- d'autre part sur une aide aux éleveurs pour repérer les taureaux de monte naturelle susceptibles d'améliorer la production des troupeaux allaitants.

Le contrôle de performances bouchères joue à cet égard un rôle très important puisque 15 % des vaches allaitantes françaises sont contrôlées (635 000) dans 12 000 troupeaux. Cette base de sélection comprenant les animaux identifiés, avec un état civil connu, soumis au contrôle de performances (pesée et pointage au sevrage) sert :

- d'une part aux programmes collectifs en vue de recruter les futurs reproducteurs (mères à taureaux et futurs taureaux à mettre à l'épreuve) et d'évaluer sur descendance les reproducteurs mis à l'épreuve notamment sur les facilités de naissance et les performances pré-sevrage ;
- d'autre part à évaluer sur résultats en ferme tous les reproducteurs qui disposent d'informations de contrôle de performances pour gérer génétiquement les troupeaux et orienter la diffusion par monte naturelle.

Cette dernière partie est tout à fait originale puisque les éleveurs doivent, pour obtenir des évaluations génétiques en ferme de leurs reproducteurs (IBOVAL), connecter leurs troupeaux en faisant réaliser un certain pourcentage d'insémination de façon à ce que les performances enregistrées dans les troupeaux soient comparables au niveau racial. Dans ces conditions, on publie des index sur les principales aptitudes (facilités de naissance, croissance avant sevrage, développement musculaire et squelettique, facilités de vêlage, aptitude maternelle allaitement) sur les vaches, les taureaux, les veaux de chaque troupeau. Des outils nationaux de restitution de ces informations ont été mis au point à savoir le bilan génétique du troupeau allaitant, des fiches individuelles de performances mâle et femelle ainsi que des listes d'index.

Par ailleurs, un système d'évaluation des performances de croissance en station est organisé au travers des organisations raciales (UPRA) consistant à évaluer la croissance musculaire, la capacité d'ingestion et la morphologie de taureaux destinés essentiellement à la monte naturelle mais aussi pouvant être recrutés dans les programmes collectifs. Ces animaux doivent suivre un protocole (conditions de recrutement à l'entrée, régime de croissance, etc.) et disposent d'une évaluation génétique sur leurs performances intra-station.

Toutes les évaluations génétiques (taureaux mis à l'épreuve et indexés dans le cadre des schémas collectifs, animaux indexés en ferme sur IBOVAL, animaux évalués en station) font l'objet d'une **qualification raciale** qui sert à la meilleure utilisation des reproducteurs dans le schéma collectif et dans la diffusion par monte naturelle.

Un suivi régulier de l'efficacité génétique du système est organisé au travers du calcul des bilans zootechniques (valeurs génétiques de chaque insémination) ainsi que l'observation des différents paramètres concernant les performances zootechniques (croissance, poids à la naissance, morphologie, etc.).

A.3 LES TECHNIQUES DE REPRODUCTION POUR L'AMELIORATION GENETIQUE DES RACES D'ELEVAGE

Chez les espèces d'intérêt zootechnique, le progrès génétique dépend de l'efficacité des techniques de la reproduction tout autant que de la précision avec laquelle on peut évaluer les caractéristiques phénotypiques des individus.

L'insémination artificielle

L'insémination artificielle a été la première technique mise en œuvre à grande échelle pour accélérer la diffusion des meilleurs patrimoines génétiques. Cette technique est exploitée à des degrés divers chez la plupart des espèces d'animaux d'élevage.

Chez les bovins 4.372.171 IAP (inséminations premières) ont été réalisées en 2003 dont 3.291.918 en races laitières et 1.080.253 en races bouchères (tableau 8).

Tableau 8 : Répartition de l'insémination animale selon les espèces
(données UNCEIA⁽¹⁾, ANIO⁽²⁾, CAPRI-IA⁽³⁾ et ITP⁽⁴⁾)

	ESPECE BOVINE ⁽¹⁾		ESPECE OVINE ⁽²⁾	ESPECE CAPRINE ⁽³⁾	ESPECE PORCINE ⁽⁴⁾
	Races laitières	Races allaitantes			
Année 2003	3 291 918	1 080 253	870 956	71 343	5 794 812

Le transfert d'embryons

Le transfert d'embryons est une autre technique couramment utilisée dans les élevages. Ces embryons peuvent provenir de fécondation *in vivo* d'animaux superovulés ou être obtenus en laboratoire, après collecte d'ovocytes et fécondation *in vitro*.

Les statistiques pour l'année 2003 montrent que 5.665 vaches donneuses ont été collectées et que 33.729 embryons dont plus de 99% produits *in vivo* ont été transférés en France (tableau 9).

Tableau 9 : Activité du transfert embryonnaire en France (source : AETE)

Production d'embryons	2003	var / 2002	2002
In vivo			
Nombre de donneuses collectées	5 665	-16,7%	6 797
Nombre d'embryons collectés	64 925	-1,7%	66 031
Nombre d'embryons transférables	37 433	-0,8%	37 725
Nombre d'embryons collectés par donneuse	11,46	18,0%	9,71
Nombre d'embryons transférables par donneuse	6,61	19,1%	5,55
% embryons transférables / embryons collectés	58%	0,9%	57%
In vitro (OPU)			
Nombre de donneuses d'ovocytes	77	-9,4%	85
Nombre de sessions d'OPU	77	-46,5%	144
Nombre d'embryons transférables	261	-12,4%	298
Nombre d'embryons transférables par session	3,39	63,8%	2,07
Total des embryons in vitro	261	-12,4%	298
Nombre total d'embryons transférables	37 694	-0,9%	38 023
Transfert embryonnaire			
In vivo			
Frais	18 415	4,9%	17 562
Congelé	15 076	-0,5%	15 158
In vitro			
Frais	231	9,0%	212
Congelé	7	-22,2%	9
Nombre total d'embryons transférés	33 729	2,4%	32 941
% d'embryons <i>in vitro</i> transférés	0,7%	7,7%	0,7%
% d'embryons congelés transférés	44,7%	-0,6%	46,0%

Pour le transfert classique (embryons produits *in vivo*) la mise au point de protocoles de superovulation plus efficaces ont permis d'améliorer significativement le rendement global qui s'établit actuellement à l'obtention de 6,7 embryons transférables par collecte.

Les embryons peuvent également être obtenus par la collecte d'ovocytes à partir d'ovaires d'abattoirs ou sur l'animal vivant par prélèvement des ovaires sous échographie (technique d'OPU : ovum pick up). Les ovocytes ainsi récoltés sont soumis à des étapes successives de maturation, fécondation et culture *in vitro* qui permettent d'obtenir des embryons au stade blastocystes qui sont alors transférables sur des femelles receveuses. Une vache donneuse génétiquement intéressante peut ainsi théoriquement engendrer jusqu'à 200 veaux en ayant recours à des mères porteuses.

Bien que les rendements d'embryons obtenus dans ces conditions (4 à 5 embryons par collecte) aient été significativement améliorés ces dernières années, le prix de revient de ces embryons produits *in vitro* demeure environ trois fois plus élevé que celui des embryons produits *in vivo*. La congélation de ces embryons n'étant pas encore maîtrisée, l'utilisation d'embryons *in vitro* reste associée à des programmes de recherches ou à des applications de terrain très limitées (race Montbéliarde).

Le clonage

La reproduction par clonage vient s'ajouter logiquement aux techniques utilisées actuellement. L'impact positif potentiel du clonage sur l'amélioration génétique justifie que les conditions de mise en œuvre de cette technique soient soigneusement examinées.

Le plus logique consiste à cloner les animaux adultes dont les performances génétiques sont connues et validées.

L'intérêt du clonage paraît toutefois assez limité pour les races laitières. En effet, un taureau issu de clone d'un taureau indexé, aurait dès sa naissance un handicap de progrès génétique correspondant à ce qu'il est convenu de dénommer "la progression du progrès par an", soit 110 kg de lait par an pour la race Prim'Holstein par exemple. Dans la mesure où 3 années vont nécessairement s'écouler entre le moment où on prélèvera une cellule de l'animal à cloner et le moment où on pourra disposer de la semence du clone, ce dernier sera distancé, de 350 à 400 kg de lait par rapport aux taureaux qui seront en fait d'une génération n+3 par rapport à lui.

Pour cette raison, il est donc évident que pour l'instant, les techniques de clonage restent limitées, au moins en théorie, à des hypothèses d'utilisation dans le cadre des programmes où il y a peu de progrès génétique comme par exemple pour les races à viande ou pour les taureaux en croisement industriel.

A défaut, il peut être envisagé de cloner les embryons issus de parents dont les caractéristiques génétiques sont intéressantes. Cette approche n'a jusqu'à maintenant reçu aucune application pratique en raison du trop faible rendement du clonage mais également du fait que les propriétés génétiques des embryons ne sont pas réellement connues. Cette méthode pourrait avoir un regain d'intérêt si une sélection basée sur l'examen d'un grand nombre de marqueurs génétiques pertinents pouvait être pratiquée sur les embryons.

La sélection génétique des embryons par marqueurs, indépendante du clonage, est une réalité. Elle porte sur la détermination du sexe et la présence de quelques allèles de gènes dont les effets sont importants et connus. L'examen d'un grand nombre de marqueurs requiert l'utilisation d'une quantité de cellules embryonnaires relativement importante. Le clonage permet de multiplier en grand nombre les quelques cellules qui peuvent être prélevées sur un embryon sans prendre le risque de compromettre sa survie.

Il est par ailleurs concevable que le clonage contribuera à accélérer la diffusion des génomes des géniteurs sélectionnés en procédant à une reproduction par clonage de leurs descendants directs.

GLOSSAIRE

Allèles

Différentes versions d'un même gène. Les différents allèles dirigent la synthèse de protéines ayant des structures et des activités biologiques plus ou moins différentes. La distribution des allèles définit les caractéristiques des individus.

Aneuploïde

Se dit d'une cellule qui a un nombre anormal de chromosomes.

Blastocyste

Embryon composé de 64 ou 128 cellules.

Cellule totipotente

Cellule capable de donner naissance à un organisme vivant.

Cellule pluripotente

Cellule capable de participer à la formation de n'importe quel organe d'un organisme vivant mais incapable, seule, de donner naissance à un organisme vivant.

Cellule multipotente

Cellule capable de participer à la formation d'un nombre restreint d'organes. Exemple : les cellules souches de la moelle osseuse qui donnent naissance aux globules rouges et aux globules blancs.

Cellule unipotente

Cellule capable de ne participer à la formation que d'un seul organe. Exemple : les cellules précurseurs des spermatozoïdes.

Cellules souches embryonnaires

Lignée de cellules pluripotentes (cellules ES).

Cellules souches d'organes

Lignées de cellules multipotentes.

Cellule sexuelle

Gamète, cellules germinales.

Cellule somatique

Cellule non sexuelle, cellule d'organe.

Chimère

Organisme vivant formé par des cellules provenant de plusieurs organismes de la même espèce ou non. Exemple : une chimère est obtenue après transfert de cellules d'un embryon dans un autre embryon.

Chromosome

Association d'ADN et de protéines présentes dans le noyau des cellules.

Clone

Organisme vivant obtenu sans reproduction sexuée et possédant le même patrimoine génétique que son parent.

Clonage (au sens de cette étude)

Opération qui consiste à permettre la naissance d'un organisme vivant en dehors de la reproduction sexuée. Chez les animaux, le clonage est possible en transférant le noyau d'une cellule différenciée dans un ovocyte énucléé.

Code génétique

Code de correspondance entre la succession des bases d'un gène et l'ordre des acides aminés de la protéine correspondante.

Cytoplasme

Partie interne de la cellule qui entoure le noyau.

Différenciation

Processus naturel qui transforme les cellules totipotentes en cellules pluripotentes, multipotentes puis totalement spécialisées. La différenciation est en grande partie irréversible. Le clonage par transfert de noyau permet une dédifférenciation artificielle des cellules qui retournent à l'état totipotent.

Diploïde

Se dit d'une cellule qui possède deux jeux de chromosomes (cellules somatiques qui constituent les organes).

Enucléation

Opération qui consiste à enlever mécaniquement le noyau d'un ovocyte (plus généralement d'une cellule).

Epigénèse

Ensemble des mécanismes n'impliquant pas de modification du message génétique et qui contrôle la capacité d'un gène à être activé ou non par ses inducteurs naturels. Exemple: la méthylation de certaines bases de l'ADN inactive réversiblement un gène.

Epimutation

Modification héréditaire de gènes qui altère leur expression mais non leur structure primaire.

Evolution

Processus reposant sur les mutations spontanées des gènes et la sélection naturelle qui ont conduit à l'apparition de nouvelles espèces.

Gamètes

Cellules sexuelles, cellules germinales : ovocyte et spermatozoïde.

Gène

Message codé ayant pour support l'ADN, lui-même présent dans les chromosomes. Le décodage d'un gène donne naissance à une protéine.

Génie génétique

Ensemble des opérations qui permettent de manipuler les gènes : isolement, mutation, construction de gène, transfert de gène dans des cellules ou des organismes entiers.

Génome

Ensemble des gènes d'un organisme vivant.

Génotypique

Se dit des effets du patrimoine génétique sur un organisme vivant.

Haploïde

Se dit d'une cellule qui ne possède qu'un seul jeu de chromosomes (cellules sexuelles).

Hybride

Organisme vivant obtenu par le croisement de deux organismes appartenant à des variétés, des races ou des espèces différentes. Exemples : les hybrides de maïs, le mulet.

Lois de l'hérédité

Ensemble des règles qui définissent le mode de transmission des caractères génétiques d'une génération à l'autre.

Mitochondrie

Les mitochondries sont de petites structures (des organites) situées dans le cytoplasme de la plupart des cellules animales et végétales. Elles fournissent l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule. Le nombre de mitochondries d'une cellule (plusieurs unités à plusieurs dizaines de milliers) dépend de l'intensité de son activité : une cellule musculaire, par exemple, en possède beaucoup.

Morula

Embryon composé de 16 ou 32 cellules.

Mutant

Organisme dont certains allèles ont modifié les propriétés biologiques.

LOS : "Large Offspring Syndrome"

Syndrome du gros nouveau-né.

OGM

Organisme qui a été génétiquement modifié par l'intervention d'un expérimentateur.

Ovocyte

Cellule sexuelle femelle aussi appelée ovule.

Parent (au sens de cette étude)

Individu donneur de noyau pour la génération d'un clone.

Pénétrance

Capacité qu'a un gène portant un caractère bien défini de s'exprimer phénotypiquement dans une population.

Phénotypique

Se dit des effets conjugués du patrimoine héréditaire et du milieu environnant sur un organisme vivant.

Protéine

Macromolécule formée d'acides aminés associés dans un ordre précis. Cet ordre est défini par l'ordre des bases du gène correspondant. L'ordre des acides aminés détermine également la forme et l'activité de la protéine.

QTL : "QUANTITATIVE TRAIT LOCI"

Locus d'un génome contenant des gènes responsables d'un caractère héréditaire ayant un impact phénotypique important chez les animaux d'élevage.

Reprogrammation nucléaire

Ensemble des phénomènes qui permettent aux gènes d'une cellule d'acquérir une nouvelle sensibilité aux inducteurs cellulaires.

Sélection génétique

Opération qui consiste à ne conserver que les individus d'une espèce qui répondent le mieux aux besoins de l'expérimentateur.

Sélection naturelle

Processus qui ne conserve que les individus et les espèces les mieux adaptés aux conditions du milieu.

Séquençage

Opération qui consiste à déterminer l'ordre des acides aminés d'une protéine ou l'ordre des bases d'un gène et plus généralement d'un fragment d'ADN.

Syndrome du gros nouveau-né

Ensemble des anomalies qui caractérisent les animaux clonés nouveau-nés.

Télomères

Courtes séquences d'ADN qui se trouvent à l'extrémité des chromosomes. Les télomères protègent l'ADN en empêchant une digestion de ses extrémités. Les cellules vieillissantes ont des télomères de plus en plus courts qui protègent de moins en moins bien l'ADN.

Transgénèse

Transfert de gène dans un organisme vivant conduisant à l'obtention d'une lignée porteuse d'une information génétique exogène qui peut provenir de la même espèce ou d'une autre espèce.

Zygote

Ovocyte fécondé.

Références bibliographiques

- AFSSA (1999). Reproductive Biotechnologies and Food Safety (in French). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Proc. of the meeting held in Paris, September 29 the 1999, M. Thibier (ed) 117 pp.
- Agerholm J.S., Bendixen C., Andersen O., Arnbjerg J. (2001). Complex vertebral malformation in holstein calves. *J Vet Diagn Invest.* 13 (4), 283-289.
- Allegrucci C., Denning C., Priddle H., Young L. (2004). Stem-cell consequences of embryo epigenetic defects. *Lancet*, 364, 206-208.
- Anonyme– L'insémination animale en France dans les espèces bovine, porcine, caprine et ovine en 2003. – Elevage et Insémination, UNCEIA Ed. N° Statistiques 2003. 66 p.
- Barinaga, M. (2002). Cells exchanged during pregnancy live on. *Science* 296, 2169-2172.
- Beaujean N, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L. (2004). Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 71, 185-93.
- Bijma P., Meuwissen T.H.E., Woolliams J.A. (2002). Design of sustainable breeding programs in developed countries. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production Communication 24-01 August 19-23 2002, Montpellier France
- Bousquet D., Blondin, P. (2004). Potential uses of cloning in breeding schemes: dairy cattle. *Cloning and Stem Cells*, 6, 190-196.
- Briggs R., King T.J. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 38, 455-461.
- Bruce N. *et al.* (1999). Genetic effects on vaccination in Veterinary vaccines and diagnosis Ed by Ronald D. Schultz, *Advances in Veterinary Medecine*, vol 41, Academic Press, pp 39-51.
- Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A. and Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380, 64-66.
- Chavatte-Palmer, P., Remy, D., Cordonnier, N., Richard, C., Issenman, H., Laigre, P., Heyman, Y. and Mialot, J.P. (2004). Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning and Stem Cells*, 6, 94-100.
- Chen, Y., He, Z.X., Liu, A., Wang, K., Mao, W.W., Chu, J.X., Lu, Y., Fang, Z.F., Shi, Y.T., Yang, Q.Z., Chen da, Y., Wang, M.K., Li, J.S., Huang, S.L., Kong, X.Y., Shi, Y.Z., Wang, Z.Q., Xia, J.H., Long, Z.G., Xue, Z.G., Ding, W.X. and Sheng, H.Z. (2003). Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Res.* 13, 251-263.
- Chesné, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L. and Renard, J.P. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 366-369.
- Cloning and risk assessment: building-up a scientific expertise. (2004) *Cloning and Stem Cells* 6
- Colleau J.J. (1993). Les biotechnologies de l'embryon bovin: application à la sélection, réalités et enjeux économiques. *Cahiers Agricultures*, 2, 93-102.
- 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, 41-56.
- Colleau J.J., Moureaux S., Briend M., Béchu J. (2004a). A method for the dynamic management of genetic variability in dairy cattle. *Genet. Sel. Evol.* 373-394.
- Colleau J.J., Moureaux S., Briend M., Tribout T. (2004b). Management of selected populations : from theory to practice. Commission on Animal Genetics 55th EAAP Meeting September 3-6 2004, Bled, Slovenia
- De Montera B., Boulanger L., Taourit S., Renard, J.P., Eggen A. (2004). Genetic identify of clones and methods to explore DNA. *Cloning Stem Cells*, 6, 133-139.
- DiBerardino M.A. (1987). Genomic potential differentiated cells analyzed by nuclear transplantation. *Am. Zool.* 27, 623-644.

- Ducos A., Eggen A., Darre R., Boichard D. (2002). Identifier les anomalies héréditaires des bovins et comprendre leurs mécanismes de transmission. *Bull. GTV*, 18, 175-182
- Ellis S.A. (2004). Immune status: normal expression of MHC class I in the placenta and what is expected in clones ? *Cloning and Stem Cells*, 6, 121-125.
- Faber, D.C., Ferre, L.B., Metzger, J., Robl, J.M. and Kasinathan, P. (2004). Agro-economic impact of cattle cloning. *Cloning and Stem Cells* 6 : 198-207.
- FAO/OMS (2003). L'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments issus d'animaux génétiquement modifiés (y compris les poissons).
- FAWC report on the implications of cloning for the welfare of farmed livestock. (December 1998). Farm Animal Welfare Council, 1A Oage street, London, SW1P 4PG, UK.
- FAWC report on the welfare implications of animal breeding and breeding technologies in commercial agriculture. (June 2004). Farm Animal Welfare Council, 1A Page street, London, SW1P 4PG, UK.
- Fulka J. Jr., Miyashita N., Nagai T., Ogura A. (2004). Do cloned mammals skip a reprogramming step ? *Nat Biotechnol*, 22, 25-26.
- Fulka, J. Jr., Loi P., Fulka H., Ptak G., Nagai T. (2004). Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. *Trends Biotechnol* 22: 279-283.
- Gasaryan K.G., Hung N.M., Neyfakh A.A., Ivanenkov V.V. (1979). Nuclear transplantation in teleost *Misgurnus fossilis* L. *Nature*, 16, 280 (5723), 585-7.
- Gurdon J.B. (1986). Nuclear transplantation in eggs and oocytes. *J Cell Sci Suppl.* 4:287-318.
- Hagemoser W.A., Roth J.A., Lofstedt J., Fagerland J.A. (1983). Granulocytopenia in a Holstein heifer *J Am Vet Med Assoc.* 1983 Nov 15;183(10):1093-4.
- Hakelien, A.M., Landsverk, H.B., Robl, J.M., Skalhegg, B.S. and Collas, P. (2002). Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol* 20: 460-466.
- Hanaga H., Takeda K., Tagami T. et al (2005) Chromosomal instability in the cattle clones derived by somatic cell nuclear-transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 71: 36-44.
- Heyman, Y., Richard, C., Rodriguez-Martinez, H., Lazzari, G., Chavatte-Palmer, P., Vigonon, X. and Galli, C. (2004). Zootechnical performance of cloned cattle and offspring : preliminary results. *Cloning and Stem Cells*, 6: 109-120.
- Hiendleder, S., Bebbere, D., Zakhartchenko, V., Reichenbach, H-D., Wenigerkind, H., Ledda, S. and Wolf, E. (2004). Materno-fetal transplacental leakage of mitochondrial DNA in bovine nuclear transfer pregnancies-potential implications for offspring and recipients. *Cloning and Stem Cells*,6:150-156.
- Hiiragi T., Solter D. (2005) Reprogramming is essential in nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 70:417-421.
- Hochedlinger, K. and Jaenisch, R. (2002). Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 415: 1035-1038.
- Houdebine, L.M. (2003). Cloning by numbers. *Nat Biotechnol* 21: 1451-1452.
- Hwang, W.S., Ryu, Y.J., Park, J.H., Park, E.S., Lee, E.G., Koo, J.M., Jeon, H.Y., Lee, B.C., Kang S.K., Kim S.J., Ahn C., Hwang J.H., Park K.Y., Cibelli J.B., Moon S.Y. (2004). *Science* 303:1669-1674.
- ICSU (2003). New genetics and agriculture: Scientific Discoveries- Societal Dilemmas, The Doyle Foundation for the International Council for Science, G.J. Persley 'ed), 56pp. (also available as pdf file at <http://www.icsu.org>).
- Jenness, R. (1988). Composition of milk. In *Fundamentals of Dairy Chemistry*. Wong, N.P., Jenness, R., Keeney, M., et al., eds. 5Van Nostrand Reinhold Company: N. York) pp. 1 – 38.
- Jouneau, A. and Renard, J.P. (2003). Reprogramming in nuclear transfer. *Curr Opin Genet Dev* 13: 486-491.
- Kaufman, W. and Hagemester, H. (1987). Composition of milk in dairy cattle production. H.O. Gravert ed. (Elsevier Science Publishers, Amsterdam) pp. 107 – 172.

- Kubota C., Tian X.C., Yang X. (2004). Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnol.* 22: 693-694.
- Kuroiwa, Y., Kasinathan, P., Matsushita, H., Sathiyaselan, J., Sullivan, E.J., Kakitani, M., Tomizuka, K., Ishida, I. and Robl, J.M. (2004). Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-micro and prion protein in cattle. *Nat Genet* 36: 775-780.
- Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J. and Reik, W. (2003). Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 35 : 88-93.
- Lee K.Y., Huang H., Ju B., Yang Z., Lin S. (2002). Cloned Zebrafish by nuclear transfer from long-term cultured cells. *Nature Biotechnology.* 20:795-799.
- Li X., Li Z., Jouneau A., Zhou Q., Renard J.P. (2003). Nuclear transfer :Progress and quandaries. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 84-89.
- Liu S.Z., Zhou Z.M., Chen T., Zhang Y.L., Wen D.C., Kou Z.H., Li Z.D., Sun Q.Y., Chen D.Y. (2004). Blastocysts produced by nuclear transfer between chicken blastodermal cells and rabbit oocytes. *Mol Reprod Develop* 69: 296-302.
- Loi P., Ptak G., Barboni B., Fulka J., Jr. Cappai P., Clinton M. (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol* 19: 962-964.
- McLay D.W., Clarke H.J. (2003). Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 125 : 625-633.
- M.I.C. : Mendelian Inheritance in Cattle (2000). EAAP PUBLICATION N° 101
- NAS - National Academy of Science (2002). *Animal biotechnology : science-based concerns*. Washington, DC, National Academies Press.
- Norman H.D., Walsh M.K. (2004). Performance of dairy cattle clones and evaluation of their milk composition. *Cloning and Stem Cells*,6: 157-164.
- OMIA/ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS/URL www.angis.su.oz.au/databases/BIRX/omia/
- Pearson H. (2002). Dual identities. *Nature* 417: 10-11.
- Pew initiative (2002). *Animal Cloning and the Production of Food Products- Perspectives from the Food Chain*, September 26, 2002, Dallas, Pew initiative (<http://pewagbiotech.org/events/0924/sept26.php>).
- Pomerantz J., Blau H.M. (2004). Nuclear reprogramming: a key to stem cell function in regenerative medicine. *Nature Cell Biol* 6: 810-816.
- Powell K. (2003). Regulators equivocate on safety of clones. *Nat Biotechnol* 21: 1415-1416.
- Powell A.M., Talbot N.C., Wells K.D., Kerr D.E., Pursel V.G., Wall R.J. (2004). Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 71:210-216.
- Rhind S.M., Taylor J.E., De Sousa P.A., King T.J., McGarry M., Wilmut I. (2003). Human cloning: can it be made safe? *Nat Rev Genet* 4: 855-864.
- Robert D., Dumas C., Bajon. (1994). *Biologie végétale : Caractéristiques et stratégie évolutive des plantes*. Tome 3 : La reproduction. Doin Editeurs. Paris 390p.
- Rudenko L., Matheson J.C., Adams A.L., Dubbin E.S, Greenless D.K. (2004). Food consumption risks associated with animal clones: what should be investigated?. *Cloning and Stem Cells*,6: 79-93.
- Santos F., Zakhartchenko V., Stojkovic M., Peters A., Jenuwein T., Wolf E., Reik W., Dean W. (2003). Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol* 13: 1116-1121.
- Seamark R.F. (2003). Review on the current status of the extent and use of cloning in animal production in Australia and New Zealand.

- Shiels P.G., Jardine A.G. (2003). Dolly, no longer the exception: telomeres and implications for transplantation. *Cloning and Stem Cells* 5: 157-160.
- Smith L.C., Murphy B.D. (2004). Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals. *Cloning and Stem Cells*,6:126-132.
- Sullivan E.J., Kasinathan S., Kasinathan P., Robl J.M., Collas P. (2004). Cloned calves from chromatin remodeled *in vitro*. *Biology of reproduction*, 70, 146-153.
- Takahashi S., Ito Y. (2004). Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. *Cloning and Stem Cells* 6: 165-171.
- Takeda K., Kaneyama K., Kojima T., Takahashi S., Imai H., Yamanaka M., Onishi A., Hanada H. (2003). Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Mol. Reprod. Dev.* 64:429-437.
- Tamashiro K.L., Wakayama T., Akutsu H., Yamazaki Y., Lachey J.L., Wortman M.D., Seeley R.J., D'Alessio D.A., Woods S.C., Yanagimachi R., Sakai R.R. (2002). Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat Med* 8: 262-267.
- Tian X.C., Kubota C., Sakashita K., Izaika Y., Okano R., Tabara N., Curchoe C., Jacob L., Zhang Y., Smith S., Bormann C., Xu J., Sato M., Andrew S., Yang X. (2005). Meat and milk compositions of bovine clones. *PNAS* 10.1073/pnas.0500140102 (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500140102).
- Tomé D., Dubbarry M., Fromentin G. (2004). Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning and Stem Cells*, 6:172-177.
- Vogel G. (2003). Oocytes spontaneously generated. *Science*, 300, p 721.
- Wakamatsu Y, Ju B, Pristayzhyuk I, Niwa K, Ladygina T, Kinoshita M, Araki K, Ozato K. (2001) Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30, 98(3), 1071-6.
- Wakayama T. (2004). On the road to therapeutic cloning. *Nat Biotechnol* 22: 399-400.
- Wakayama T., Shinkai Y., Tamashiro K.L.K., *et al.* (2000). Cloning of mice to six generations. *Nature*, 407:318-319.
- Walsh M.K., Lucey J.A., Govindasamy-Lucey S., Pace M.M., Bishop M.D. (2004). Comparison of milk produced by cows cloned by nuclear transfer with milk from non-cloned cows. *Cloning and Stem Cells*, 5: 213-219.
- Walstra P., Jenness R. (1984). *Dairy chemistry and physics* (Wiley, New York).
- Wells D.N., Forsyth J.T., McMillan V., Oback B. (2004). The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning and Stem Cells*,6: 101-110.
- Wilmot I., Beaujean N., de Sousa P.A., Dinnyes A., King T.J., Paterson L.A., Wells D.N., Young L.E. (2002). Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583-586.
- Wilmot I. (2002). Are there any normal cloned mammals? *Nat Med* 8: 215-216.
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
- Woolliams J.A., Wilmot I. (1999). New advances in cloning and their potential impact on genetic variation in livestock. *Animal Science* 68: 245-256.
- Xue F., Tian X.C., Du F., Kubota C., Taneja M., Dinnyes A., Dai Y., Levine H., Pereira L.V. and Yang X. (2002). Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet* 31: 216-220.
- Yan S.Y. (1989). The nucleo-cytoplasmic interactions as revealed by nuclear transplantation in fish. In: *Cytoplasmic organization systems* (ed. G.M. Malacinski), pp. 61-81, McGraw-Hill, New York.
- Yan S.Y. (1998). *Cloning in fish: Nucleocytoplasmic hybrids*. Educational and Cultural Press, Hong-Kong.
- Zhou Q., Renard J.P., Le Fric G., Brochard V., Beaujean N., Cherifi Y., Fraichard A., Cozzi J. (2003). Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302: 1179.