

# REPRODUCTION

## PERPECTIVES D'APPLICATION DU CLONAGE REPRODUCTIF AUX ÉQUIDÉS

L'INRA a été saisi par une société privée d'une demande d'utilisation du brevet INRA sur le clonage. Le Conseil Scientifique du département de physiologie animale de l'INRA a examiné le projet et donné un avis scientifique favo-

nable. L'INRA a également sollicité Les Haras nationaux pour connaître l'intérêt du clonage pour la filière équine. Saisi par le Directeur général, le Comité d'Orientation Scientifique et Technique (COST), réuni en séance plénière le

24 septembre 2002 sous la présidence de E. Landais a entendu diverses interventions présentées ci-dessous puis après en avoir délibéré à huis clos, a rendu son avis.

### Le clonage dans l'espèce équine, présent et avenir

par Eric Palmer, PDG société CRYO-ZOOTECH SA

#### RÉSUMÉ

La clonage somatique consiste à produire une copie génétique d'un individu adulte par transfert du noyau d'une cellule somatique provenant de cet individu dans un ovocyte d'une femelle quelconque de la même espèce que l'on a préalablement énucléé. En pratique, il faut maîtriser les étapes suivantes :

- collecte des cellules du donneur (par exemple des fibroblastes à partir d'une petite biopsie de peau), mise en culture et conservation dans une cryobanque,
- collecte d'ovocytes de jument (ovaire d'abattoir, jument donneuse...) et prélèvement de leur noyau,
- micro-injection du noyau de la cellule donneuse dans l'ovocyte receveur,
- mise en culture de la cellule "clone" obtenue,
- transfert de l'embryon dans une jument receveuse qui assurera la gestation.

Quelle que soit l'espèce (vache, souris, chèvre, porc, lapin, chat), le rendement, mesuré par le nombre de produits vivants sur le nombre de tentatives de reconstruction d'embryon, est très faible (entre 0,2 et 2 %). Cinq à six équipes aux USA et en Europe travaillent sur le clonage équin.

Le clone produit est porteur de 100 % du patrimoine génétique nucléaire du donneur. Le clonage peut servir à la recherche (biologie de la période embryonnaire et périnatale), à la conservation de patrimoine génétique en danger, à la production d'un reproducteur à partir d'un donneur stérile (hongre notamment). La production d'animaux pour l'utilisation finale sort de l'objectif

actuel. Les rendements sont actuellement si faibles que la seule utilisation envisageable est celle de la production d'étalon à partir d'un hongre performeur.

#### INTRODUCTION

Le COST est amené à réfléchir aujourd'hui sur l'opportunité de favoriser ou de s'opposer à la réalisation de travaux de recherche et développement sur le clonage équin. La question n'est pas posée en terme de financement mais de position de principe. En effet un programme privé (la société CRYOZOOTECH dirigée par E. Palmer et soutenue par GENOPOLE) s'est engagé dans cette direction et souhaite fonder son travail sur une collaboration nationale en adaptant au cheval la technique développée par l'INRA dans le cadre de ses recherches sur les bovins. Avant de s'engager dans cette collaboration, l'INRA a souhaité connaître la position du COST des Haras Nationaux sur le sujet. Ce texte préparé par E. Palmer présente autant que possible tous les aspects positifs et les zones d'ombres encore présentes.

#### 1. ASPECTS SCIENTIFIQUES

##### 1.1 De quel type de clonage parle-t-on ?

Le clonage a dans le langage scientifique et dans le langage commun des sens assez divers, tous relevant d'une reproduction asexuée mais avec des modalités assez différentes. Nous parlerons du clonage somatique animal.

Il s'agit de la production d'une copie génétique d'un individu adulte par transfert du noyau d'une cellule somatique provenant de cet individu dans un ovocyte d'une femelle quelconque de la même espèce que l'on a préalablement énucléé. Les cellules donneuses comme les ovocytes receveurs et l'embryon

reconstitué reçoivent des traitements visant à synchroniser l'état du génome avec le stade du développement.

Le produit est porteur de 100 % du patrimoine génétique nucléaire du donneur, comme son vrai jumeau.

Il faut noter que quelle que soit l'espèce, le rendement, mesuré par le nombre de produits vivants sur le nombre de tentatives de reconstruction d'embryon est très faible (entre 0,2 et 2 %). La technique est donc très coûteuse et ne permet pas aujourd'hui de production de grands nombres.

##### 1.2 En quoi le clone peut-il différer du modèle :

###### 1. phénotypiquement

###### 1.2.1 Effets épigénétiques :

###### reprogrammation imparfaite du génome

L'initiation du redémarrage de la transcription des gènes de l'embryon est parfois imparfaite. Certains gènes, en particulier ceux qui régulent la croissance intra-utérine, peuvent être dérégulés. La conséquence la plus connue est le "syndrome du gros veau". Il en résulte des pertes pendant la gestation et autour de la naissance. En revanche, passé le cap d'un ou deux mois les animaux semblent normaux.

###### 1.2.2 Effets de milieu/maternel, d'élevage, incidents...

Comme tout individu issu de transfert d'embryon, le produit se développe dans un environnement maternel différent. De plus, comme tout individu, le clone a son histoire individuelle, ses propres accidents de santé, qui sont regroupés par les généticiens sous le terme d'effet de milieu.

###### 1.2.3 Effets aléatoires : les taches de couleur

Contrairement à ce que l'on croyait, les taches de couleur d'individus génétique-

ment identiques ne sont pas parfaitement identiques. Il s'agit du développement de lignées cellulaires dont les frontières sont quelque peu aléatoires. Contrairement au typage ADN qui sera identique, le signalement graphique des clones permettra de les distinguer de leur modèle.

## 1.2.4 L'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial est totalement d'origine maternelle. Ainsi le clone a-t-il l'ADN mitochondrial de l'ovocyte receveur. On ne connaît pas bien les conséquences, si ce n'est que la mitochondrie est la machinerie énergétique de la cellule. Il est possible que des conséquences sur des performances faisant appel à la mobilisation énergétique soient constatées chez les clones.

### 1.3 En quoi le clone peut-il différer du modèle :

#### 2. génétiquement (comme reproducteur)

##### 1.3.1 L'ADN mitochondrial

(pour la femelle)

Comme mentionné plus haut, les clones femelles transmettront l'ADN mitochondrial de l'ovocyte receveur et sont par là différents de l'animal donneur (femelle). Au contraire, pour les mâles, le spermatozoïde qui ne transmet pas son ADN mitochondrial est seulement le vecteur de matériel nucléaire. Il est de ce point de vue strictement identique au spermatozoïde du donneur de cellules.

### 1.4 Le clone peut-il faire un bon reproducteur?

Si le clone est imparfait du point de vue de la reprogrammation du génome, lors de son utilisation comme reproducteur, un nouveau cycle de programmation a lieu lors de la succession méiose-fécondation qui doit rétablir la situation. Les premiers résultats de reproduction de bovins clonés confortent cette hypothèse: leur descendance ne présente pas particulièrement d'anomalies, en particulier pas de syndrome du gros veau.

## 2. ASPECTS D'ACTUALITE

### 2.1 Chaque année une ou plusieurs nouvelles espèces sont clonées, demain le cheval.

Depuis la naissance de la brebis Dolly, des clones somatiques ont été obtenus chez la vache, la souris, la chèvre, le porc, le lapin et le chat. Les scientifiques s'accordent pour dire qu'il n'existe pas de

raison théorique pour que le cheval fasse exception. Tout est question de temps et d'effort de recherche.

Le pronostic est généralement que le premier clone équin naîtra dans les 3 prochaines années.

### 2.2 Cinq ou six équipes mondiales travaillent sur le clonage équin

Lors du 8<sup>e</sup> symposium international sur la reproduction équine, quatre équipes ont présenté des résultats préliminaires de travaux visant au clonage équin. D'après nos informations, au moins quatre équipes travaillent le sujet aux USA et deux en Europe.

Les approches sont variées pour chaque étape de la production du clone, ce qui montre que des travaux d'optimisation sont nécessaires.

L'équipe la plus avancée a présenté une gestation de mule clonée jusqu'au stade de 35 jours mais qui a avorté. Une autre gestation serait aujourd'hui en cours à plus de 60 jours.

### 2.3 De nombreux acteurs économiques se préparent au clonage du cheval

Les équipes de recherche sur le clonage des USA sont en général associées à des start-ups qui envisagent le clonage de toutes les espèces dont le cheval sur leurs sites Internet. Certaines sociétés, pas forcément sérieuses, annoncent une commercialisation sur des bases irréalistes (de production de dizaines de clones chaque semaine, et de vente sous forme d'embryons congelés!).

Dans ce contexte, CRYOZOOTECH avec son partenaire GENOPOLE espèrent par le réalisme de ses hypothèses et par la fiabilité de ses engagements faire la preuve qu'une ambition Française est souhaitable et possible sans avoir à s'expatrier.

Un Stud-Book Européen (Z) a annoncé qu'il inscrirait les clones de chevaux de sport de qualité dans son registre. Aux USA la question mérite à peine d'être posée car personne n'a d'état d'âme au sujet du clonage animal et de nombreuses disciplines sportives ne demandent pas l'inscription à un livre généalogique.

### 3. A QUOI PEUT SERVIR LE CLONAGE?

#### 3.1 A la recherche

Le clonage pose les questions fondamentales de la programmation du génome, de la croissance embryonnaire, et permet de nombreuses manipulations génétiques. Il

permet d'aborder le rôle de l'ADN mitochondrial. Il complète les études sur la biologie des cellules somatiques ou reproductrices. Il prolonge aussi les travaux sur la maturation de l'ovocyte.

Il pose des questions fondamentales sur la croissance foetale et la période périnatale. Dans le cas particulier du cheval, il devrait prolonger les recherches menées sur l'ovocyte, l'ovulation, la gestation et la médecine périnatale.

#### 3.2 A produire des molécules transgéniques

Cela est vrai pour la lapine ou la chèvre mais certainement pas pour le cheval compte tenu des coûts et de la faible efficacité prévisible.

#### 3.3 A produire des reproducteurs améliorateurs

Les éleveurs bovins et leurs coopératives envisagent le clonage d'individus de haute valeur génétique comme moyen de diffusion du progrès génétique. Les hypothèses sont selon les pays la production de nombreux mâles pour la monte naturelle (Australie), la production de la copie d'un mâle améliorateur âgé (Canada) ou accidenté, ou exceptionnel (Italie, Nouvelle Zélande).

Le gros avantage est que la valeur génétique du produit est déjà connue par la performance du donneur de cellules; le coût est alors acceptable pour la production "à coup sur" d'un reproducteur d'élite.

Nous développerons plus loin notre vue de l'utilisation chez le cheval.

#### 3.4 A préserver des patrimoines génétiques races en danger

Les chercheurs sur la préservation des races ou espèces en danger envisagent cette solution pour sauver les patrimoines génétiques dont un tout petit nombre d'exemplaires est encore vivant. Cette approche est envisageable pour les races équines menacées de disparition.

Il faut cependant remarquer que certains opposent à cette stratégie celle de la préservation de l'environnement nécessaire à leur survie.

#### 3.5 Pour produire des animaux pour l'utilisation finale

C'est d'ores et déjà le cas au Japon où l'on consomme de la viande de clones bovins (issus de cellules embryonnaire). Ce n'est pas l'objectif actuel du clonage

du cheval, compte tenu du coût et de la faible efficacité. Il faut cependant s'attendre à ce qu'un jour ou l'autre, lorsque les techniques auront évolué, des clones seront phénotypiquement égaux au donneur de cellules. Certains pays ne se priveront pas de les utiliser.

### 3.6 Pour participer au clonage humain ?

Nous ne mentionnons ici cette éventualité que pour clairement la rejeter: Le monde médical n'attend certainement pas le clonage équin pour réaliser le clonage humain! On peut être clairement opposé au clonage humain et ne pas avoir de problème avec le clonage animal.

## 4. LES ETALONS ISSUS DU CLONAGE D'UN HONGRE CHAMPION

### 4.1 Quel progrès génétique si l'on n'a pas de données sur ascendance et si les performers sont castrés ?

Les généticiens ont développé un schéma de sélection utilisant toutes les informations disponibles sur un individu pour le qualifier comme reproducteur. Ce schéma est opérationnel par exemple pour les courses où la base de données généalogiques permet un premier tri des animaux sur ascendance, où les compétitions sont organisées pour comparer des jeunes candidats reproducteurs entre eux et où les étalons sont rapidement testés sur descendance. Ainsi la somme de ces informations (synthétisées par une estimation telle que le BLUP) est elle de plus en plus précise avec l'âge des animaux.

A l'opposé, certaines disciplines développées par le secteur sportif n'ont pas été conçues dans une optique de sélection. L'exemple le plus évident est la course d'endurance à laquelle participent des individus de toutes origines et pour laquelle il n'existe pas de données au delà d'une génération. Privé d'information sur ascendance on voudrait choisir les reproducteurs sur performance propre, mais pratiquement tous les performers sont des hongres. Quant à sélectionner les reproducteurs d'endurance sur descendance... il faudra attendre plusieurs décennies avant que le schéma soit opérationnel. Dans ce cas il est indiscutable que de grands champions ont toutes chances d'être améliorateurs.

Si l'on considère la partie variable du patrimoine génétique, il convient de rappeler que deux propres frères n'ont en commun que 50 % de leurs gènes ce

qui est bien loin de l'identité du clone avec son modèle. La stratégie de l'utilisation du clone est ici très supérieure à celle de l'utilisation de son apparenté.

### 4.2 Quelles sont les disciplines où les hongres prédominent ?

Nous avons étudié les quinze meilleurs performers mondiaux dans un certain nombre de disciplines pratiquées en France et les résultats sont éloquentes (>75% de hongres) pour l'endurance, le dressage, le CCE et la course d'obstacle. La proportion est encore proche de 50 % pour le CSO.

Cette étude du marché n'est bien entendu pas exhaustive et de nombreuses disciplines pratiquées outre-Atlantique sont certainement dans le même cas.

### 4.3 Quelle est la valeur génétique d'un performer du plus haut niveau mondial sur ses seules performances ?

Une modélisation en fonction de l'hérédité doit permettre de définir le niveau de performance minimal pour qu'un individu soit améliorateur.

## 5. ASPECTS ECONOMIQUES POUR LE MONDE DU CHEVAL

### 5.1 Le clonage une étape supplémentaire parmi les techniques de reproduction assistée

Le clonage n'est pas une rupture par rapport aux différentes techniques mises au point antérieurement.

L'insémination artificielle a permis la multiplication d'individus d'élite et une première accélération du progrès génétique. La France a été la première à aligner une équipe de saut d'obstacle composée d'étalons qui étaient utilisés simultanément en I.A. C'était le temps des Galoubet, Narcos, Le Tot de Sémilly...

Dans un deuxième temps le transfert d'embryon a permis d'augmenter la production de juments et de leur autoriser une double carrière de performer et de reproductrices.

Le clonage arrive pour valoriser des hongres aux performances exceptionnelles et pour lesquels on regrette a posteriori la castration.

Dans les trois cas, on y voit une accélération du progrès génétique ainsi qu'une opportunité de rentabilisation des performers. Cette rentabilisation est essentielle si l'on ne veut pas voir partir à l'étranger nos meilleurs valeurs.

### 5.2 Actuellement des rendements très faibles, soit un coût très élevé

Les taux de succès actuels du transfert nucléaire sont tels que pour le moment la seule rentabilisation possible est celle de la production d'étalons. Ce n'est qu'après des années de progrès sans doute très lents que les coûts s'abaisseront; alors apparaîtront sur le marché international les clones de juments et/ou les clones performers.

### 5.3 L'histoire se répète: après une phase de refus, les techniques nouvelles utiles finissent par s'imposer.

Est il aujourd'hui nécessaire de rappeler les polémiques qu'ont suscité en leur temps l'apparition de l'insémination artificielle, de l'échographie et du transfert d'embryon ?

### 5.4 Quelle sera la situation d'un élevage qui s'interdit le clonage face à des concurrents qui en disposent ?

La question posée aujourd'hui n'est pas de savoir dans l'absolu si l'on souhaite le développement de cette technique, ou même seulement si l'on veut l'utiliser en France. La question est de savoir si l'on peut s'interdire une recherche et des développements dans un domaine où nos concurrents se sont engagés et laisser se creuser un écart technologique et économique.

## 6. ASPECTS ETHIQUES, SOCIETAUX ET DE COMMUNICATION

### 6.1 Refuser l'amalgame avec le clonage humain

Il est clair que le débat ne doit pas être biaisé par des considérations anthropomorphiques et que l'on doit se cantonner dans le champ de nos compétences; à savoir l'amélioration génétique animale et l'économie d'une filière agricole.

Les membres du comité national d'éthique consultés par Genopole avant de s'associer à ce programme ont fait clairement la distinction et n'ont pas vu de problème éthique dans un tel programme.

### 6.2 Distinguer Clonage et OGM.

Il faut également distinguer clairement l'enjeu du clonage comme reproduction à l'identique d'un individu issu de la reproduction naturelle de toute production d'OGM. Le débat sur ce sujet aura lieu plus tard et il est souhaitable de bien les séparer.

### 6.3 Distinguer multiplication en nombre et restauration de la capacité de préservation et de transmission d'un patrimoine de qualité.

De même nous suggérons de bien distinguer dans le débat l'utilisation comme reproducteur de l'utilisation comme performer.

L'une relève de l'élevage et de sa réglementation qui sont du domaine de l'économie agricole et de la génétique. Rappelons à ce titre que les clones de hongres performers utilisés comme reproducteurs n'ont pas besoin de réaliser de performances propres: ils les ont déjà réalisées.

L'utilisation de clones dans des compétitions de quelque discipline que ce soit relève de la gestion pratique des sports concernés. La réponse sera peut être différente pour la pratique sportive et pour l'élevage.

## Influence du clonage sur le progrès génétique chez les chevaux

par Anne RICARD, chercheur à la station de génétique quantitative et appliquée de l'INRA

### RÉSUMÉ

Dans les disciplines sportives où ce sont les hongres, plutôt que les mâles, qui réalisent les performances, le clonage somatique, en permettant la reproduction de clones des hongres grands performeurs, engendre-t-il du progrès génétique?

Dans une population théorique mais proche du selle français de CSO (10 000 juments et 250 étalons) avec un schéma de sélection classique (50 % des poulains nés réalisent des performances à 5 ans,  $h^2$  de la performance = 0,3), la sélection par la voie mâle sur performances propres est plus efficace que:

- la sélection en utilisant les performances des collatéraux (la perte de précision sur la performance n'est compensée ni par le gain réalisé en intensité de sélection puisque tous les mâles et non les 50 % de performers sont candidats, ni par la baisse de l'intervalle de génération puisque l'étalon peut commencer la monte à 3 ans sans attendre d'avoir des performances),
- que la sélection sur descendance (le gain de précision ne compense pas ni l'allongement de l'intervalle de génération puisqu'il faut attendre les performances des produits à 5 ans, ni la faible intensité de sélection puisqu'un pool restreint de mâles peut être testé).

Quand les mâles ne peuvent avoir de performances et que seuls les hongres et les juments participent aux compétitions, on peut alors imaginer d'utiliser les clones de hongres performeurs. La précision et l'intensité de sélection res-

sent identiques à la sélection sur performances propres, mais l'intervalle de génération est allongé d'au moins 3 ans puisqu'il faut attendre que le clone soit apte à la reproduction. Le bilan reste positif par rapport à une sélection sur collatéraux (4 %).

En pratique, nos races de sport se situent dans une situation intermédiaire, avec une certaine proportion de mâles et de hongres participant aux compétitions. On montre que le clonage de hongres permet une amélioration du progrès génétique dès que l'on dépasse 40 % de hongres parmi les performeurs mâles + hongres.

En conclusion, le clonage permet d'augmenter le progrès génétique dans le cas d'une proportion importante de hongres en compétition (40 % ou plus des mâles + hongres), ce qui est largement le cas en endurance, courses d'obstacles, mais également dans les disciplines olympiques.

### INTRODUCTION

Suite à votre demande, j'ai tâché d'explorer succinctement les différentes pistes que le clonage m'inspire en tant qu'acteur dans un plan de sélection. Dans ce document, on n'envisage le clonage que sous son influence génétique, indépendamment de tout avantage économique qui découlerait du clonage sans engendrer de progrès génétique (un marché existe sans doute sans que cela génère collectivement un progrès génétique).

### 1. DIFFUSION DU PROGRÈS GÉNÉTIQUE

Le premier avantage à attendre du clonage est la diffusion du progrès génétique réalisé. Il est évident que d'avoir

10, 20, 30... DIABOLO DU PARC II ou DOLLAR DU MURIER ou tout autre grand performeur plutôt qu'un seul est un avantage considérable pour une nation en compétition internationale, et une situation beaucoup plus agréable pour les cavaliers désireux de prendre plaisir à faire des compétitions de saut d'obstacle. Cependant cette exploitation d'une population déjà existante ne crée pas en elle-même un progrès, ni ne génère de diversité génétique, il faut donc aussi envisager l'avantage du clonage en tant que générateur de progrès.

L'utilisation de clones peut influencer un schéma de sélection en augmentant la précision du candidat à la sélection en multipliant les performances réalisées par un même individu génétique sous la forme de plusieurs clones vivants. Chez les juments on peut considérer que cela va aussi de paire avec une augmentation du pouvoir reproducteur: le clonage de cellules embryonnaires peut permettre la naissance de plusieurs clones par an pour une même jument. Enfin le clonage somatique peut aboutir à la naissance puis à la mise à la reproduction de clones de hongres déjà grand performeurs. C'est cette dernière voie qui semble motiver le projet et c'est donc celle que nous étudierons particulièrement.

### 2. DIFFUSION DE GENOTYPES D'ELITES BIEN CONNUES: REPRODUCTION DES HONGRES

Même dans une population où ce sont les hongres qui réalisent des performances plutôt que des mâles pour des raisons techniques ou pratiques, il existe d'autres alternatives que le clonage pour réaliser une sélection. On peut imaginer une sélection par les collatéraux