

# Le clonage chez l'animal : Etat des lieux, enjeux et perspectives

Dr Pascale Chavatte-Palmer  
Biologie du Développement et Reproduction  
INRA Jouy en Josas



ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT

INRA



# Plan du cours

- La technique et les résultats
- Les clones sont-ils identiques? Role de l'épigénétique
- Pourquoi cloner?
- Perspectives

# La technique

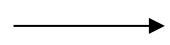


# La reproduction sexuée chez les mammifères

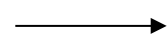
oeuf (ovocyte)

+

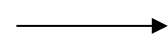
spermatozoïde



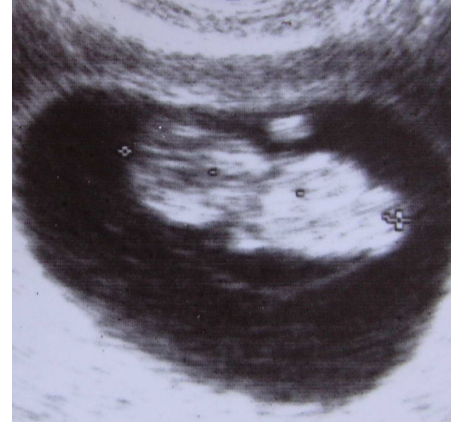
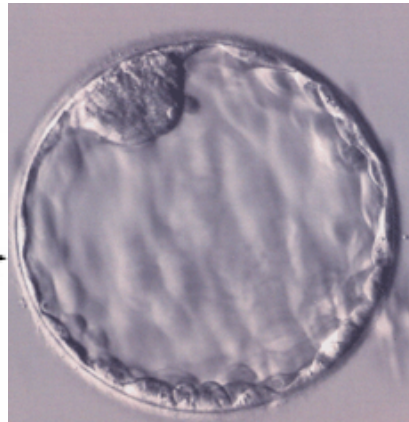
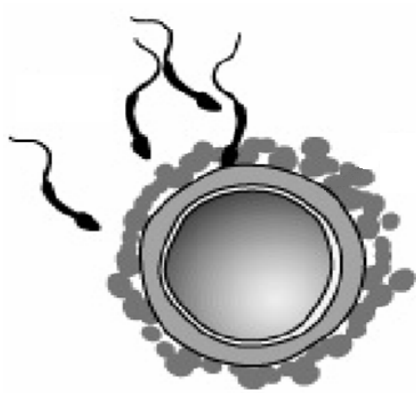
embryon



foetus



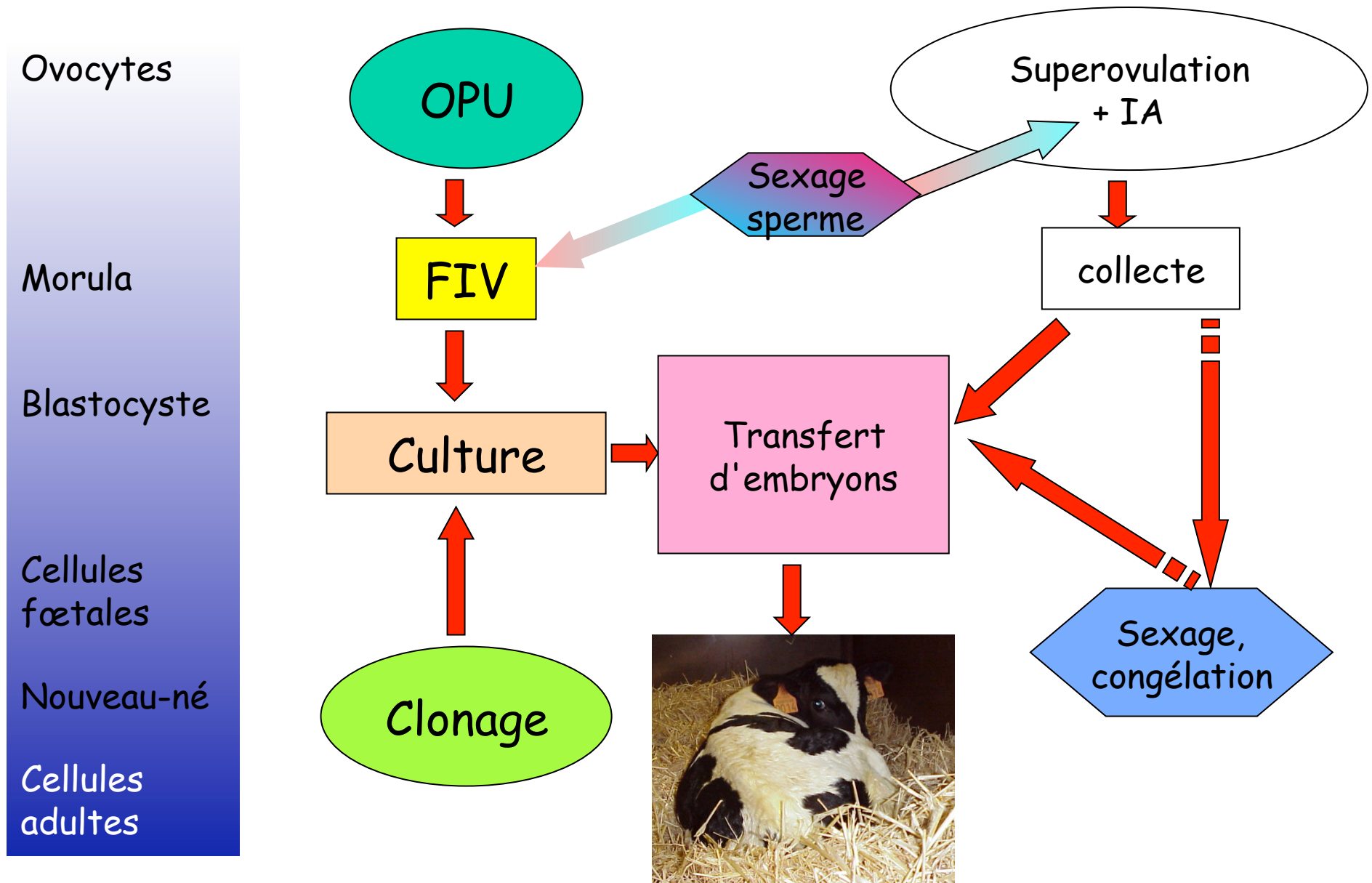
descendant



Développement pré-implantatoire

Développement post-implantatoire

# Techniques in vitro et reproduction chez les bovins

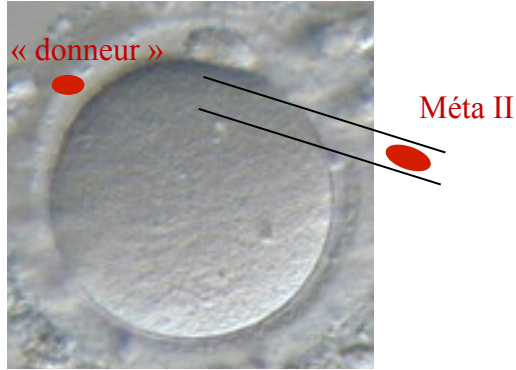


# Fécondation versus clonage

**Fécondation**  
=  
**Fusion de 2 gamètes haploïdes (1n)**



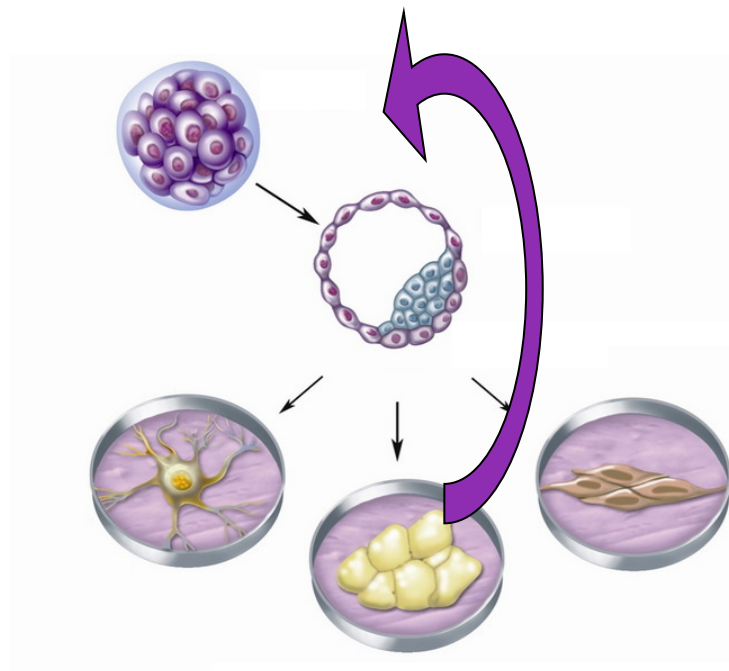
**Clonage**  
=  
**Introduction d'un noyau donneur diploïde (2n)**



**Embryon**  
=  
**diploïde (2n)**



# Naissance de Dolly en 1997



Cellule différenciée  
de glande mammaire



# Le Clonage dans le règne Animal: quelques dates

1938	1er Concept du clonage par transfert de noyaux	H.Speeman
1952	Démonstration de la totipotence des noyaux embryonnaires (rana pipiens)	R.Briggs et Th King
1975	Développement au stade larvaire après transfert cellules de peau (xenopus)	J.Gurdon
1983	1er échange de noyaux entre zygotes chez le mammifère (souris)	J.Mc Grath et D.Solter
1986	Naissance du 1er clone d'agneaux	S.Willadsen
1987	1er bovin par clonage embryonnaire	R. Prather et col.
1990	Clonage d'embryons de lapin	Heyman et coll
1996	Clonage à partir de cellules embryonnaires cultivées (mouton)	Campbell et al

## Depuis « Dolly » 1997 (Wilmot et al.)....Clonage somatique

1998	Bovins Souris	Renard/Robl Wakayama et al.
1999	Chèvre	Baguisi et al
2000	Porc	Polejaeva et al.
2002	Chat Lapin	Shin et al. Chesné et al
2003	cheval Rat	Galli et al Zhou et al
2006	Chien furet	Jang et al Li et al
En 2012: 14 espèces de mammifères sont clonées		

### Totipotence cellulaire

Aptitude d'une cellule à assurer par elle-même la totalité du développement embryonnaire et foetal

ex : le zygote

### Pluripotence cellulaire

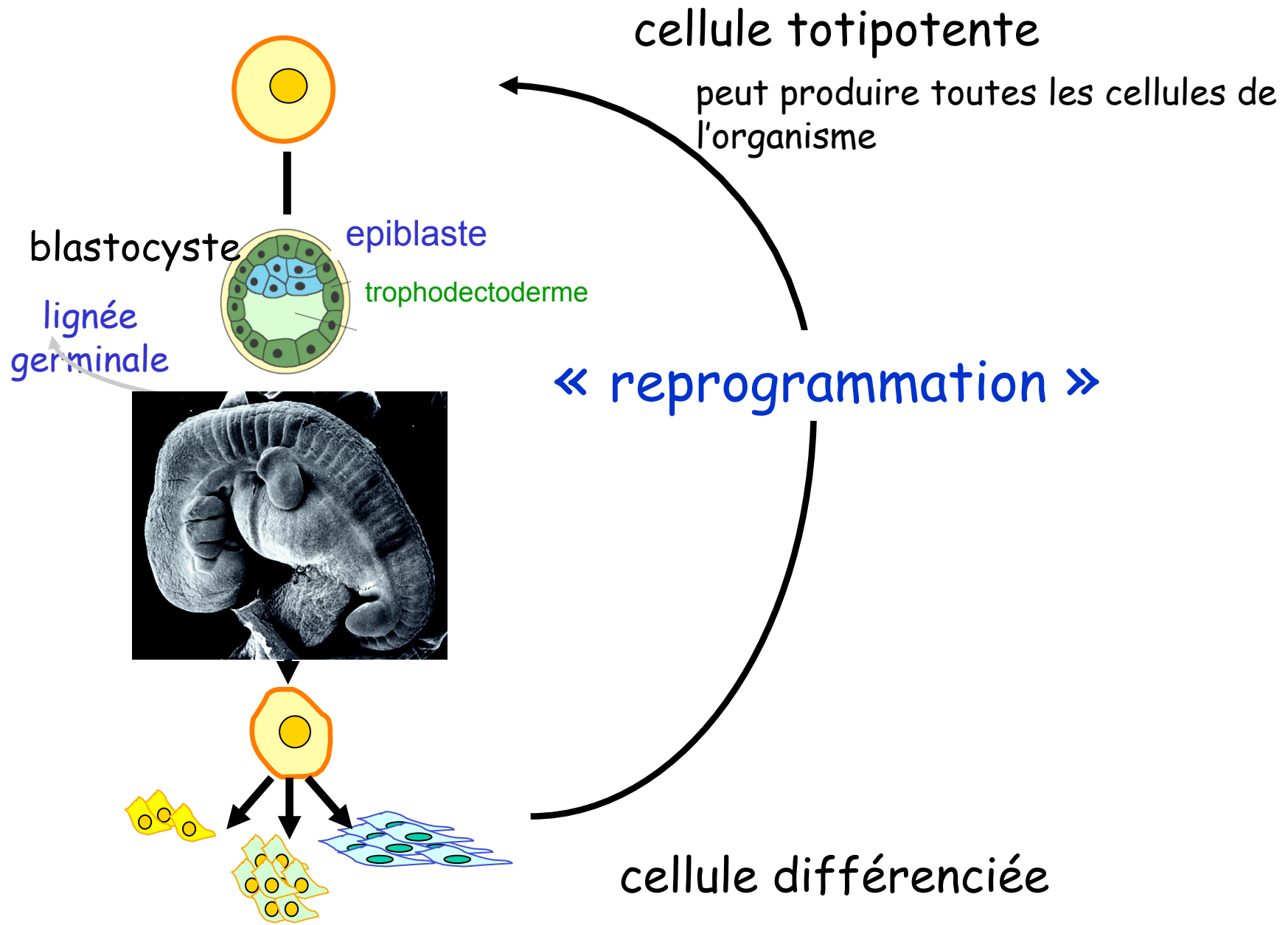
Aptitude d'une cellule à se différencier en plusieurs types cellulaires distincts

ex: cellule ES, EC, EG, cellule de la MCI

### Unipotence ou multipotence cellulaire

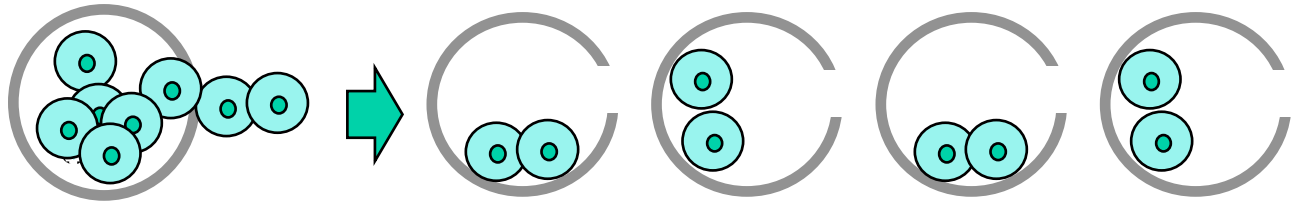
Aptitude d'une cellule d'organe ou de tissu à produire au moins un type de descendant hautement différencié.

ex : cellules souches hématopoïétiques, cellules souches de l'épiderme, du foie, du cerveau...



# Les techniques de clonage chez les mammifères

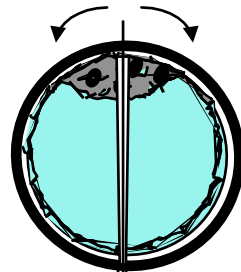
dissociation



stades 2 à 8 cellules

\_totipotence cellulaire

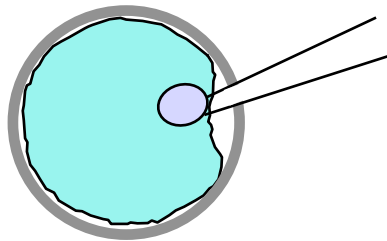
bissection



blastocystes

totipotence embryonnaire

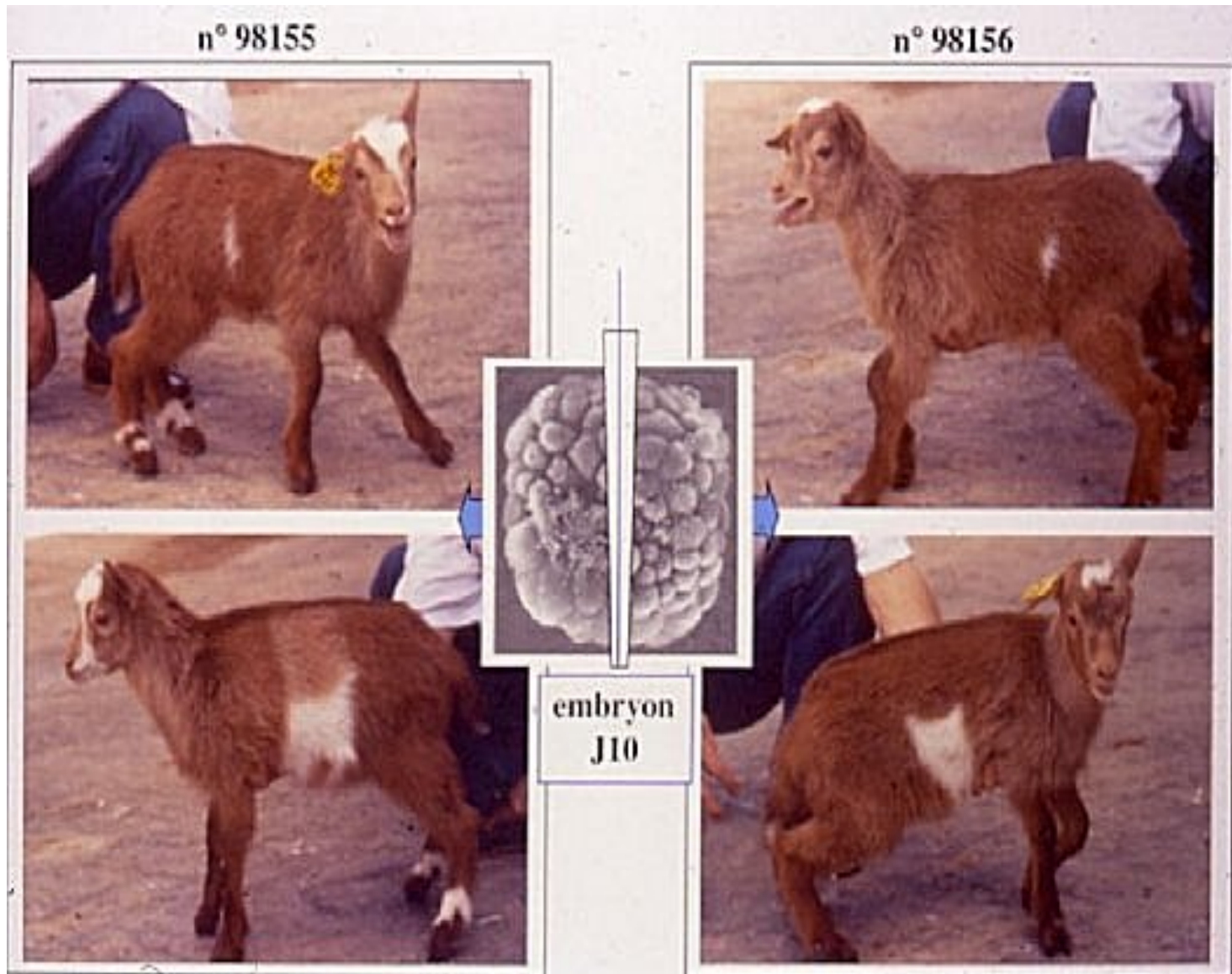
transfert de  
noyaux

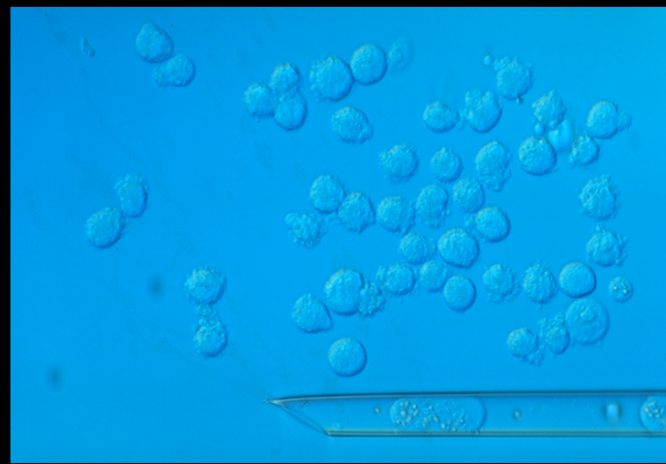
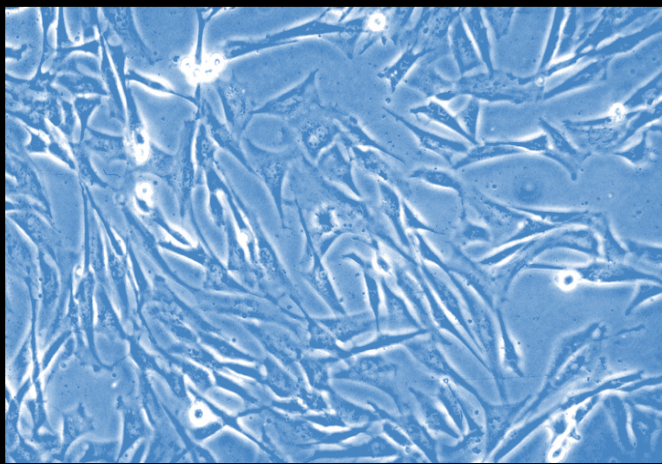
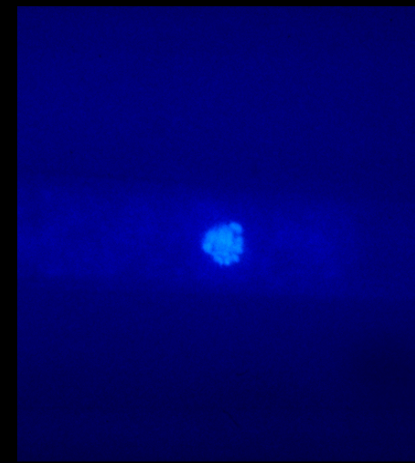
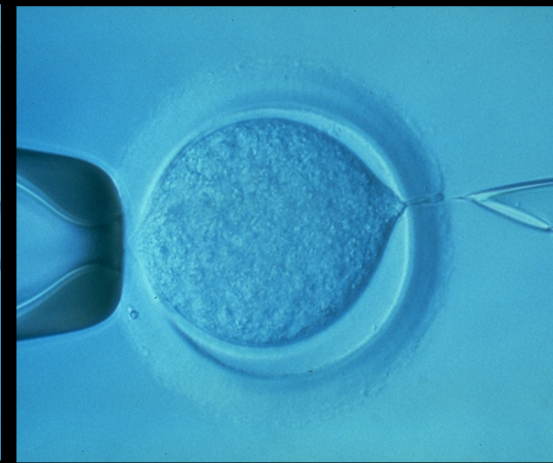
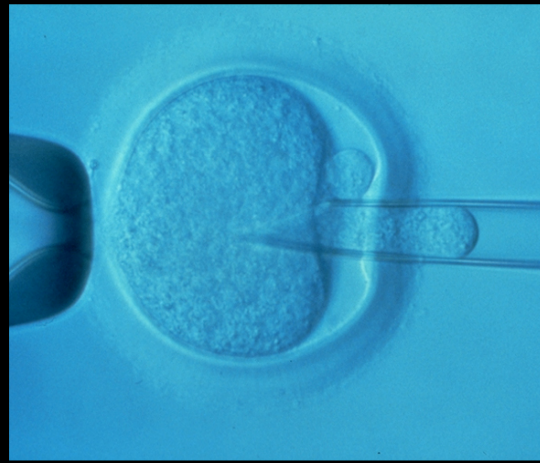


ovocyte énucléé

totipotence nucléaire

Chevreaux jumeaux « vrais » obtenus par scission d'un blastocyste










< 5% des embryons reconstitués produisent un jeune



# The potential of somatic cells for full term reprogramming can markedly differ between donor genotypes

	donor cell line	blast (%)	nb blast transplanted	D21	D35	calvin g
<b>good</b>						
	5538	41.3% (n=201)	110	71% (G=78)	55% (G=50)	21.8% (n=24)
<b>bad</b>						
	7711	36,7% (n= 386)	203	53% (G= 108)	30.1% (G= 62)	6.4% (n=13)
<b>ugly</b>						
	029	40.8 % (n=127)	123	57% (G=70)	32.5% (G=40)	2.3% (n=3)

# Clonage somatique bovin:

## Efficacité des différentes étapes in vitro

	Nombre	taux
Enucléation des ovocytes MII	293/315	93.0%
Fusionnés /reconstitués	223/293	76.1
Clivage in vitro	182/223	81.6
Développement en blastocystes	131/223	58.7
Efficacité globale (blastocystes/ ovocytes)	131/315	41.6%

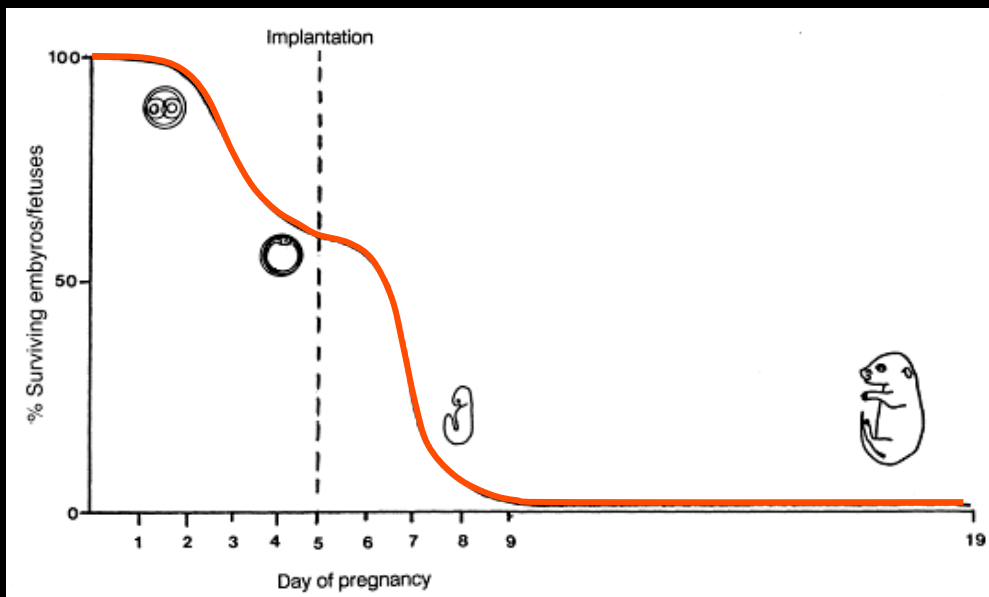
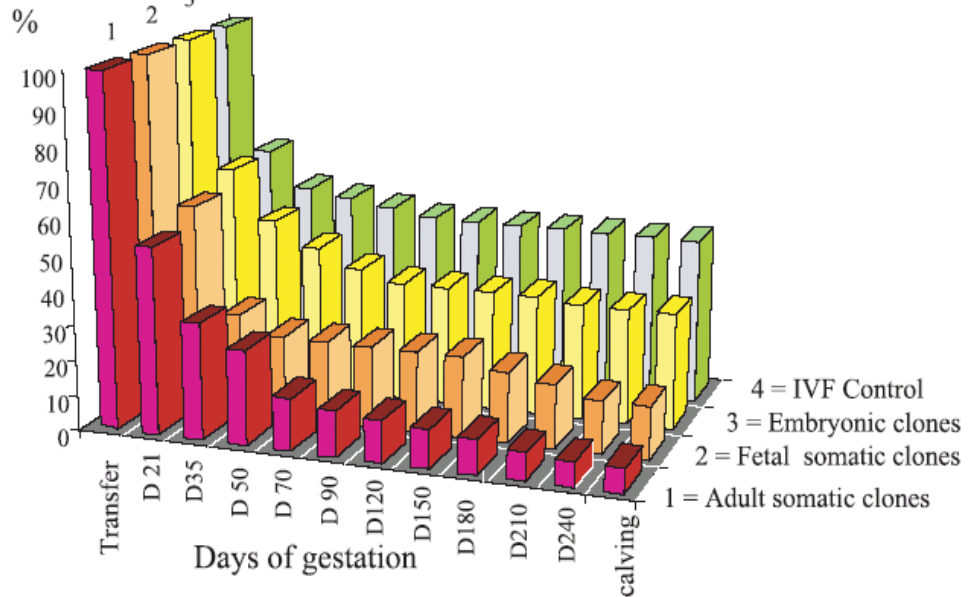
LeBourhis 2010

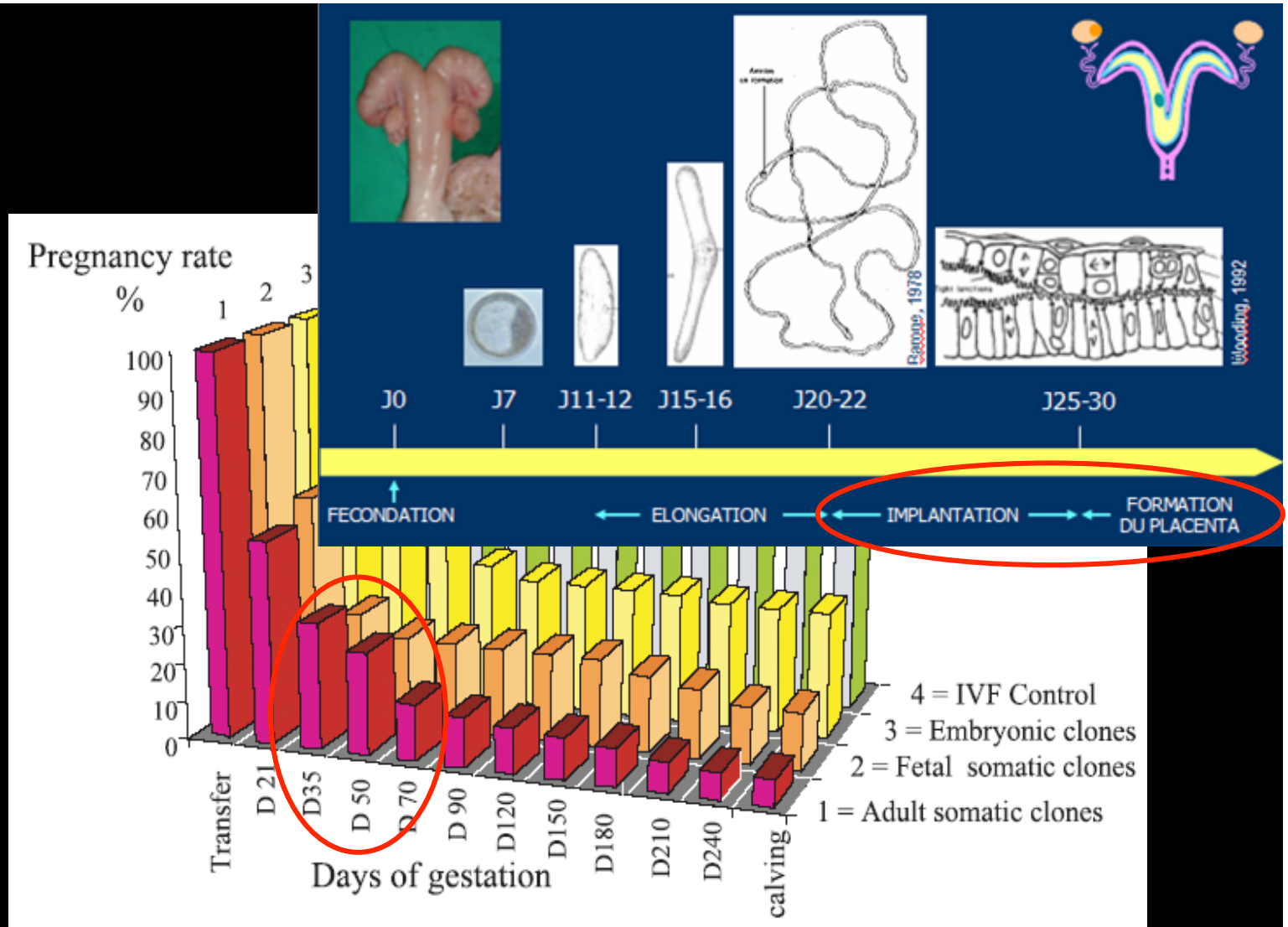
# Caractéristiques du développement **in vivo** des embryons clonés

- Taux de gestations initiées
- Pertes embryonnaires péri-implantatoires
- Pertes tardives
- Mise bas et incidence du « LOS »
- viabilité des produits



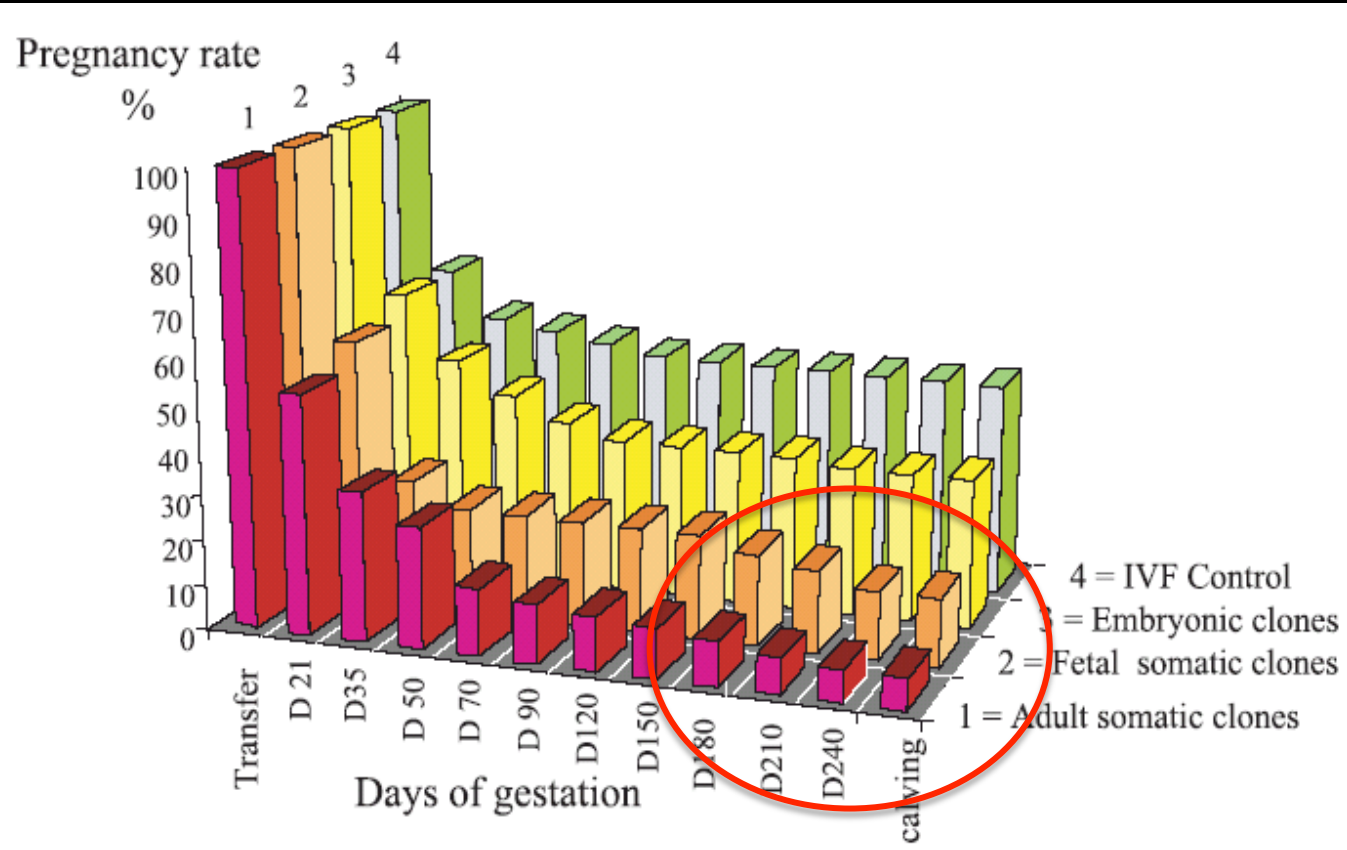
### Pregnancy rate





1<sup>st</sup>-2<sup>nd</sup> month

3<sup>rd</sup> trimester



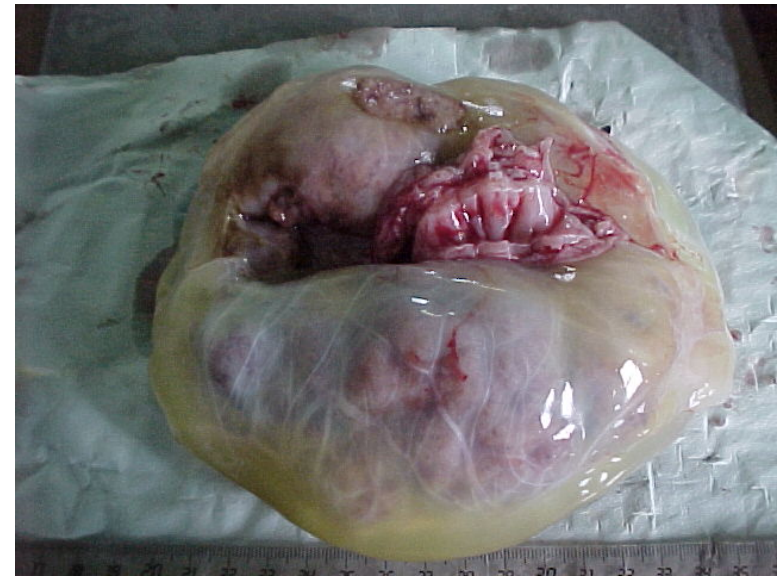
1<sup>st</sup>-2<sup>nd</sup> month

Syndrome du gros veau

Anomalies placentaires qui affectent jusqu'à 50% des gestations



Normal placentome

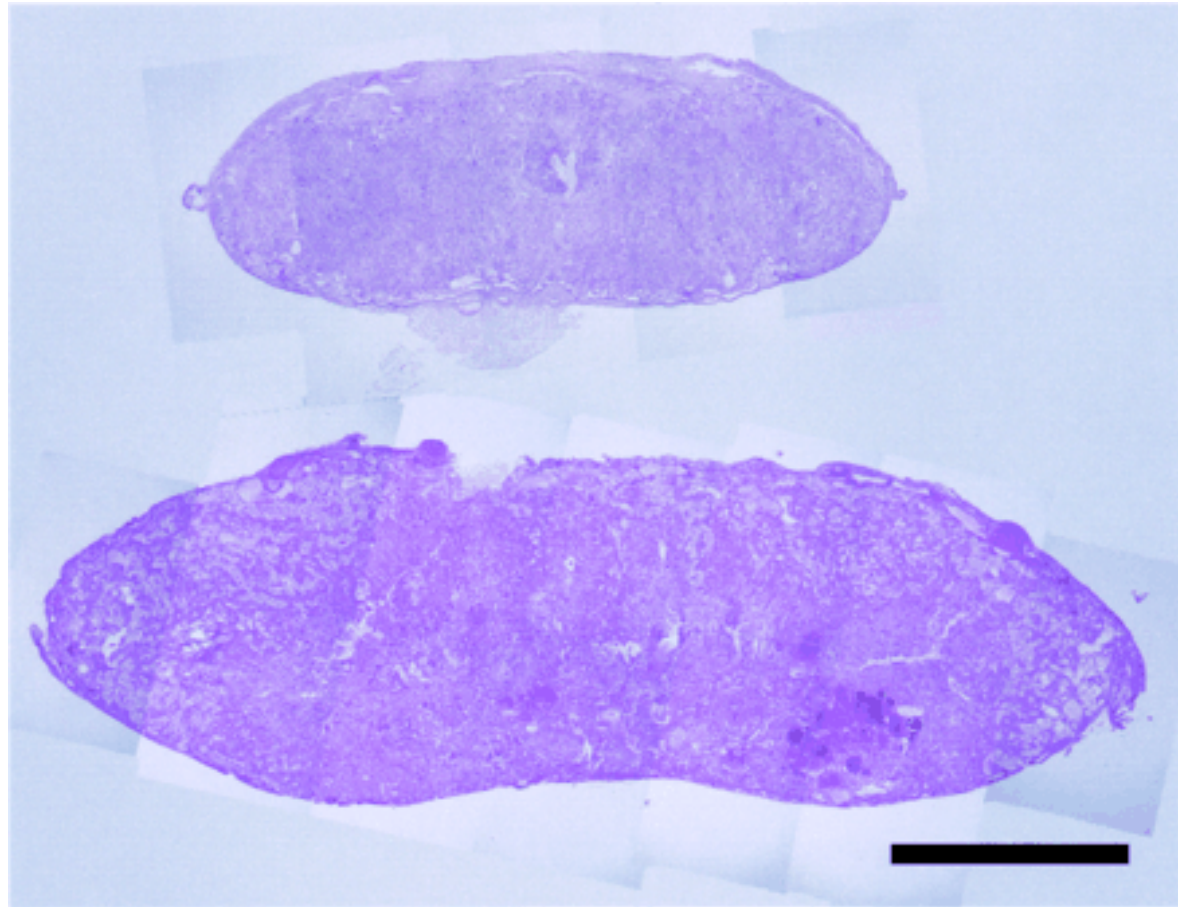


Large offspring syndrome

normal  
nb = 100-130  
mean weight 30-40g

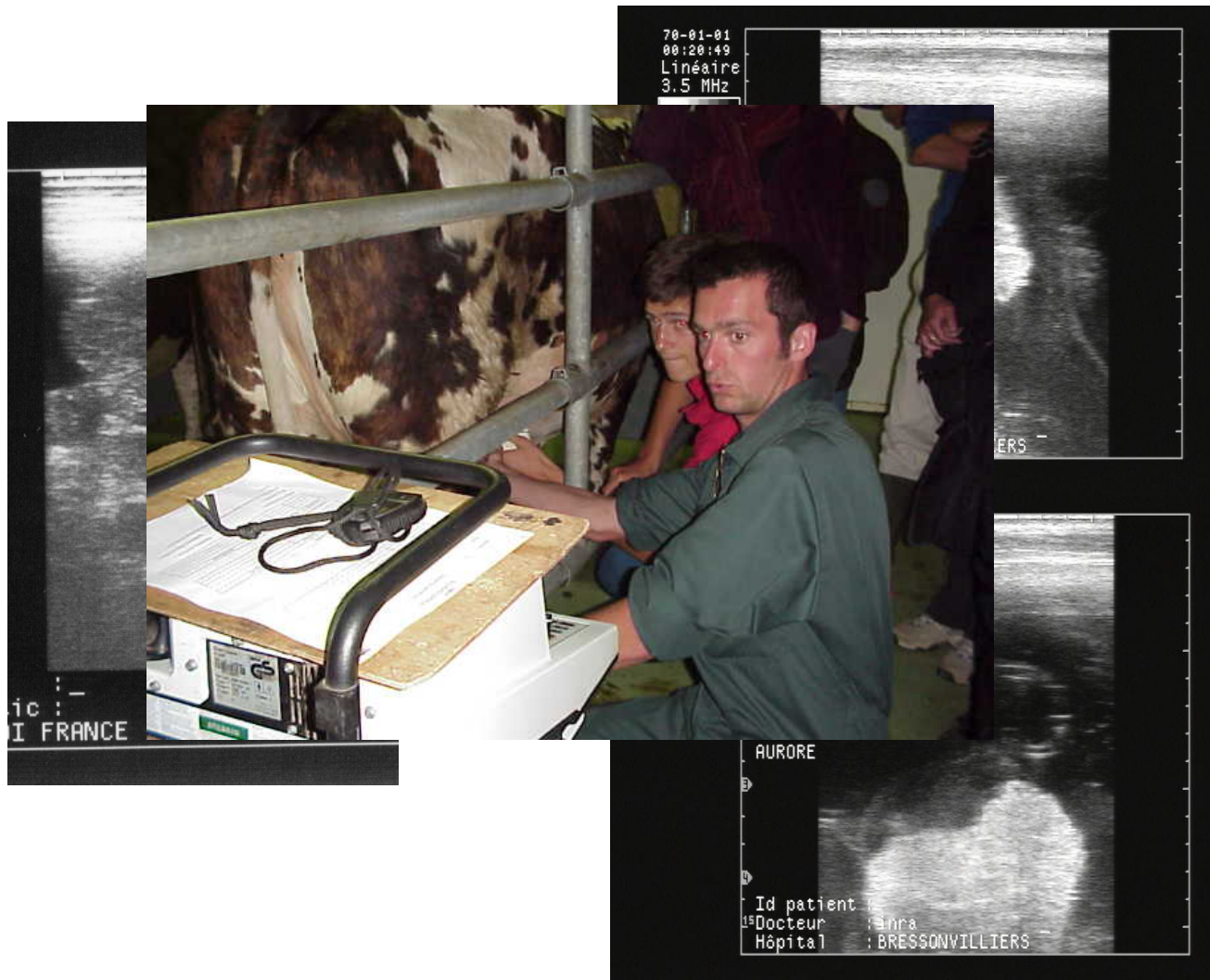
Edematous,  
nb <100 (NS)  
mean weight : 80-200g\*

# Placentomegaly in mice associated with decreased birthweight



*Wakayama and Yanagimachi, 1999; Tanaka et al., 2001*

# Ultrasound detection of placental edema



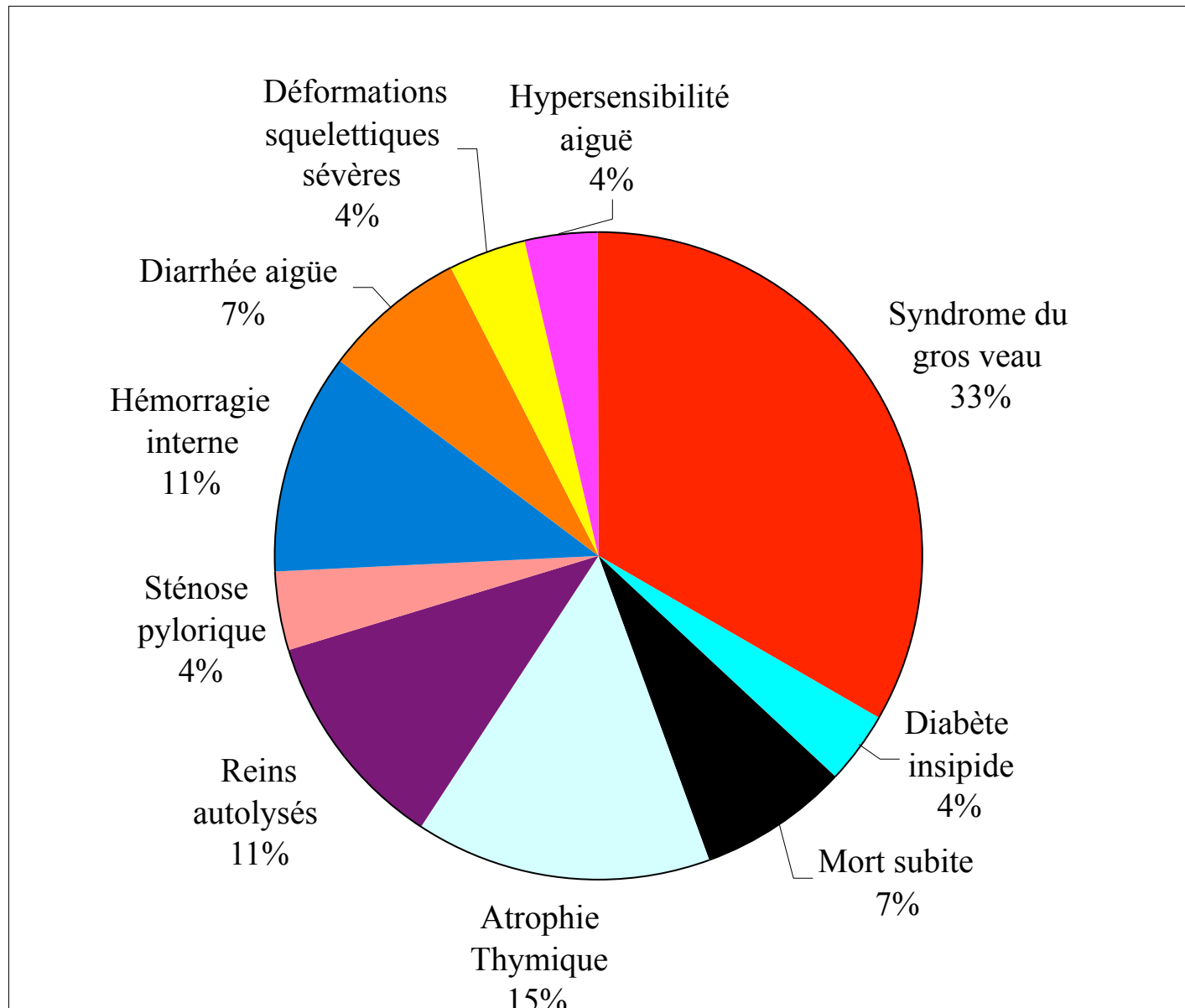
# Fetal abnormalities in cases of hydrops



# Survie post natale des bovins clonés

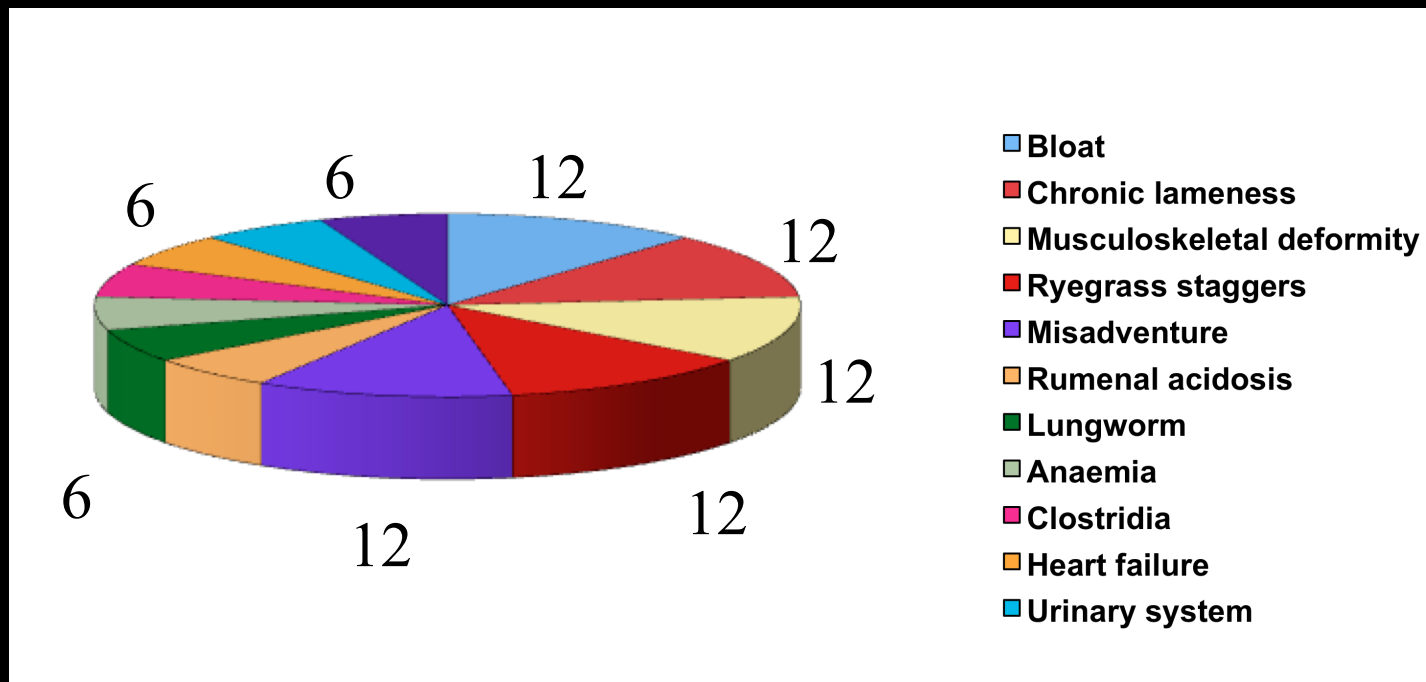
Condition	/total born	% survival
Live at birth	79/90	87.7 %
Live at 48h	73/90	81.1 %
Live > 1 week	67/90	74.4 %
Live > 1 month	63/90	70.0 %
Live > 2 months	61/90	67.8 %
Live > 6 months	57/90	63.3 %
Adults >15 months	57/90	63.3 %

# Mortalité



*Chavatte-Palmer et al, 2004; Heyman Chavatte-Palmer & Lee, 2010*

# Etiologies des mortalités de clones de 3 mois à 3 ans chez AgResearch (NZ)





**Cloned cattle can be healthy and normal**  
*Lanza et al, Science, 2001*

????

**Are there any normal cloned mammals?**  
*Wilmut, Nature Medicine, 2002*

Toutes les données scientifiques concourent à  
confirmer que les clones **adultes** sont des  
animaux **normaux**



EFSA Journal 2012;10(7):2794

**STATEMENT OF EFSA**

**Update on the state of play of**

**Animal Health and Welfare and Environmental Impact of Animals derived  
from SCNT Cloning and their Offspring, and Food Safety of Products  
Obtained from those Animals<sup>1</sup>**

**European Food Safety Authority<sup>2,3</sup>**



ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT



Les clones sont-ils totalement identiques? ?

Le rôle de l'épigénétique



# Un clone





# Differences phénotypiques entre 3 femelles clones (Genotype 5538)



# Cloning induces a high phenotypic variability

## ■ Variability of development efficiency

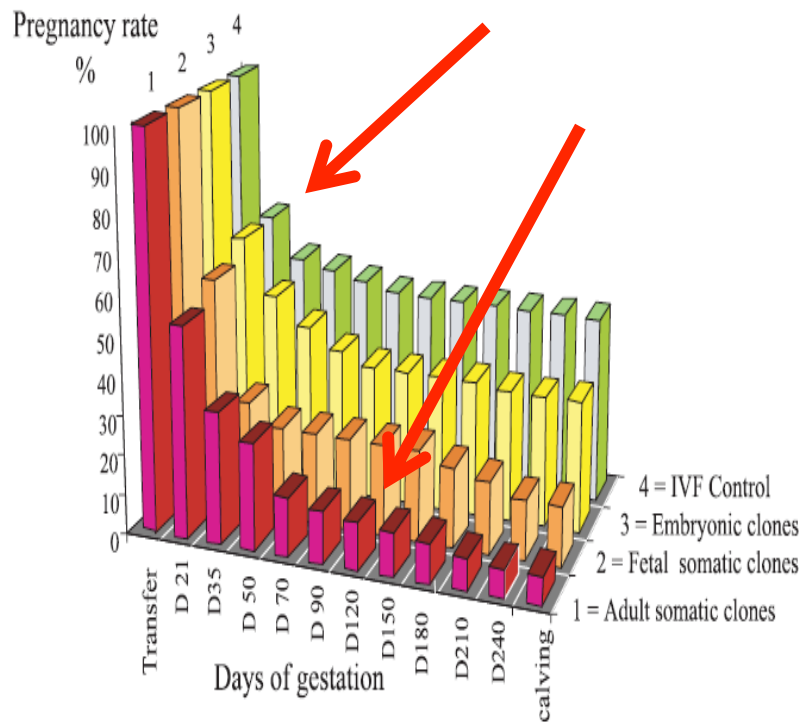
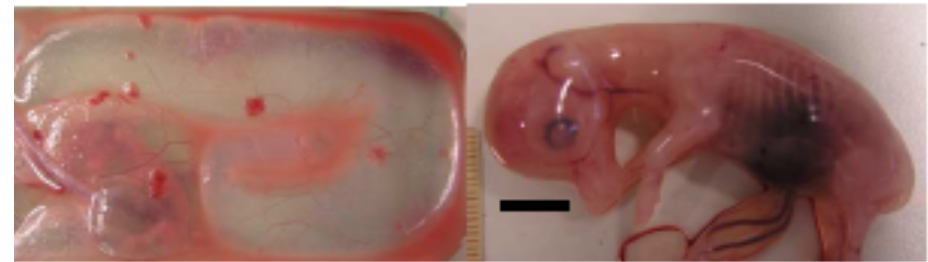


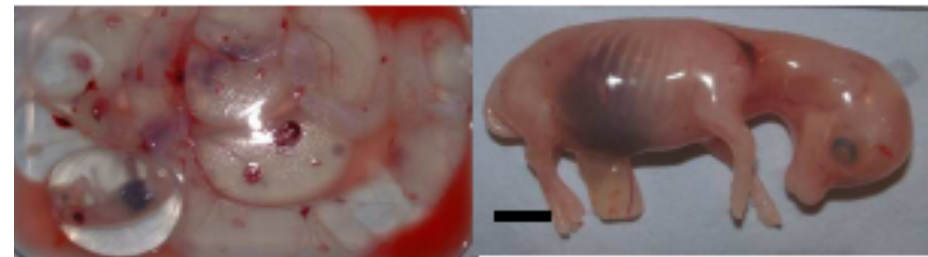
Figure 2. Evolution of pregnancy profiles in bovine recipients after transfer of cloned embryos.

(Heyman et al., 2005)

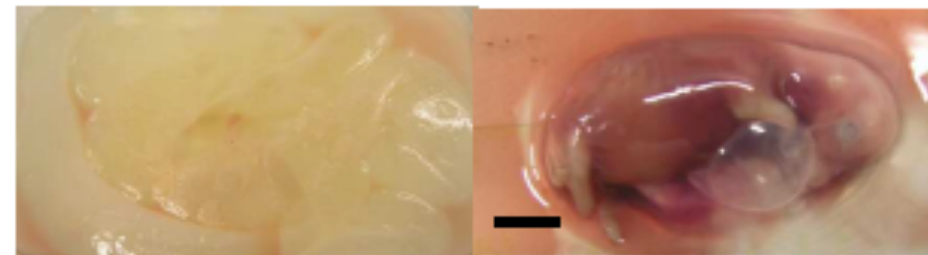
AI, GD 62



Normal clone, GD 62

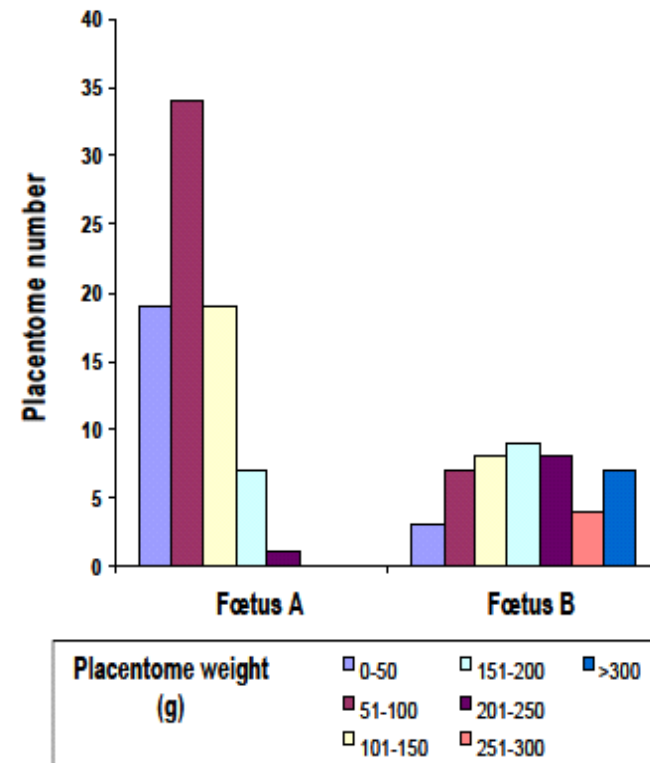
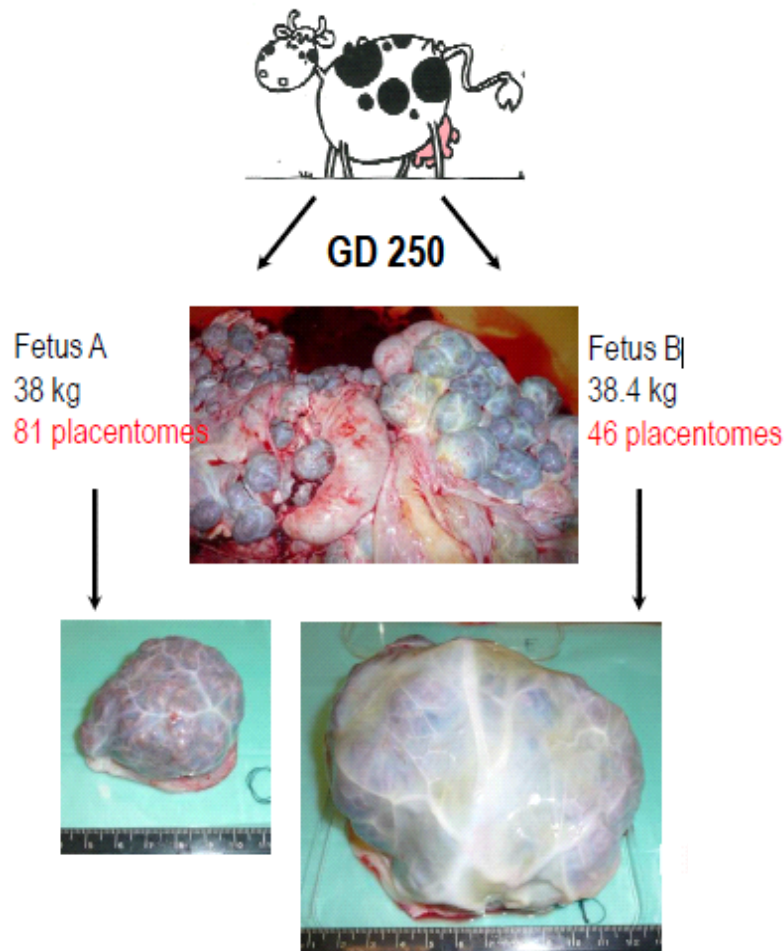


Pathological clone, GD 64



## ■ Variability of gestational pathology occurrence (2)

In the **same maternal environment**,  
**two cloned embryos** may have different development :  
**normal versus pathologic**



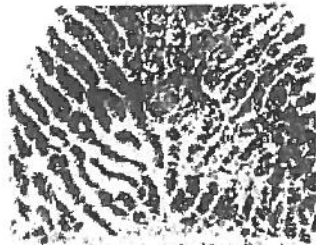
## Epigenetics: 1) gestation



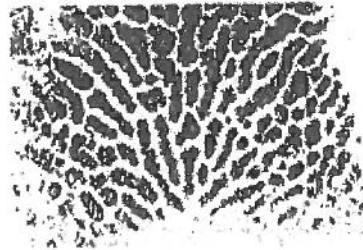
Hardy  
55 kg

Laurel  
23 kg

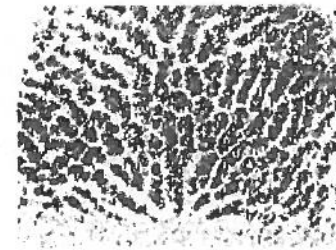
Same genome, same birthday  
**But different surrogate mother**  
= environment --→ different development



Nuclear donor



Clone 1



Clone 2

**EMPREINTES NASALES**  
**National Institute of Livestock**  
**and Grassland, Tsukuba, Japon**

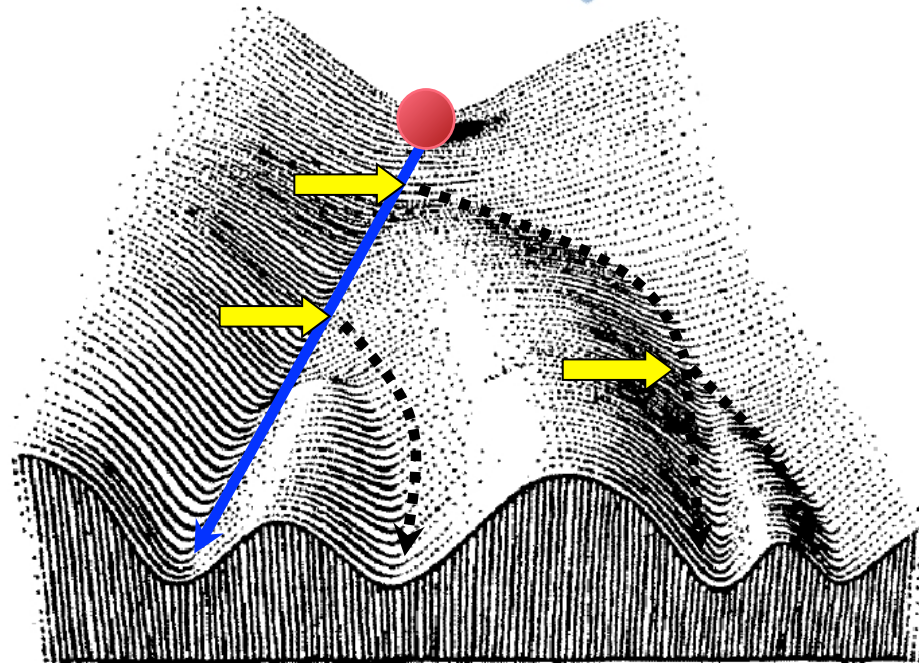


*CH Waddington*  
1905-1975

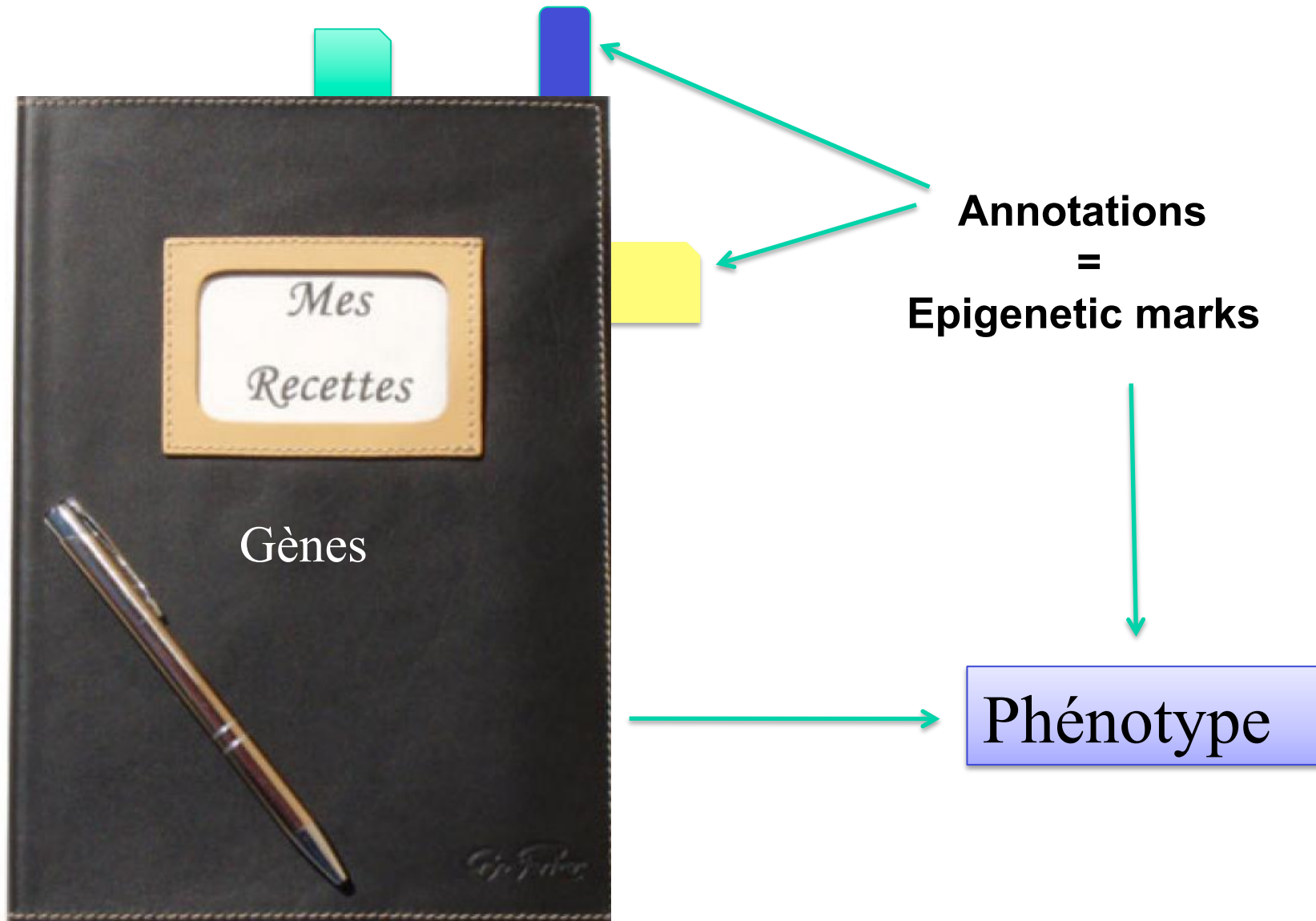
*The Strategy of the Genes*  
1957

# Epigenetics

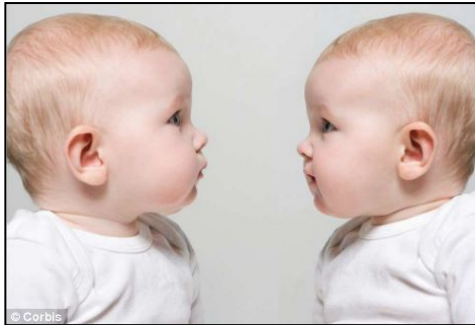
«...processes by which the genotype gives rise to the phenotype»  
« The epigenotype » 1942



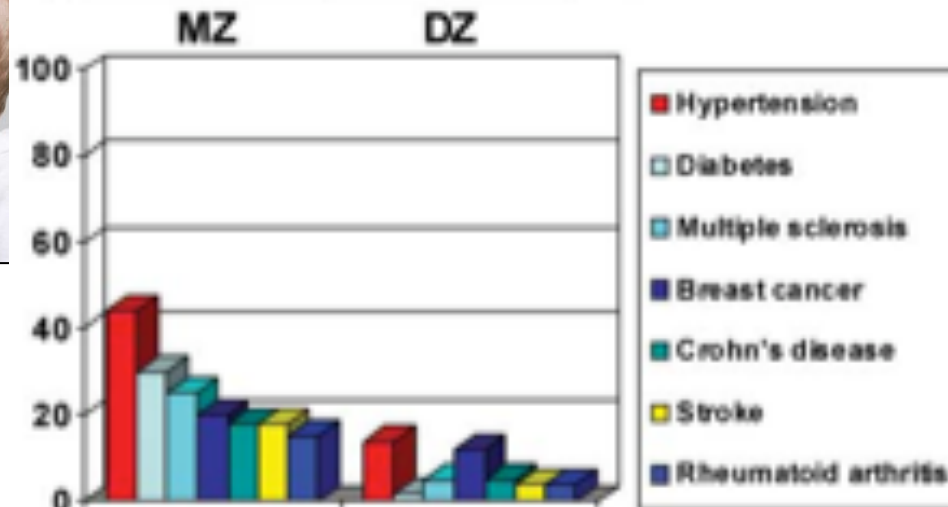
“... stably maintained mitotically (and potentially meiotically) heritable patterns of gene expression that occur without changes in the DNA sequence”



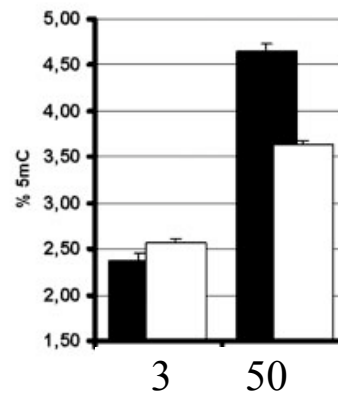
# Epigenetics: 2) throughout life



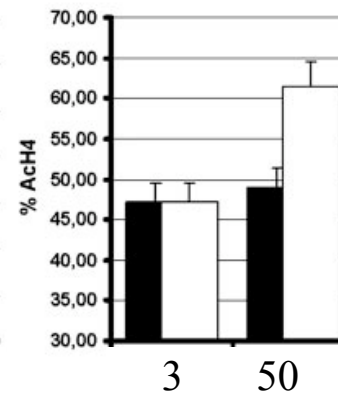
environment → epigenome



meDNA



acHistone

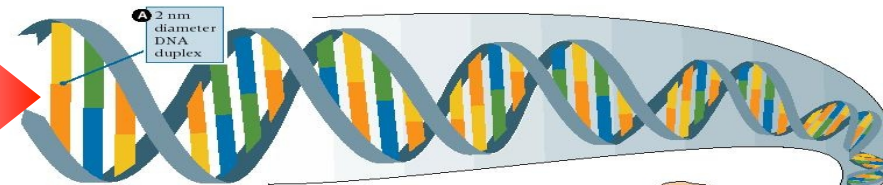


*(Fraga et al, PNAS, 2005)*

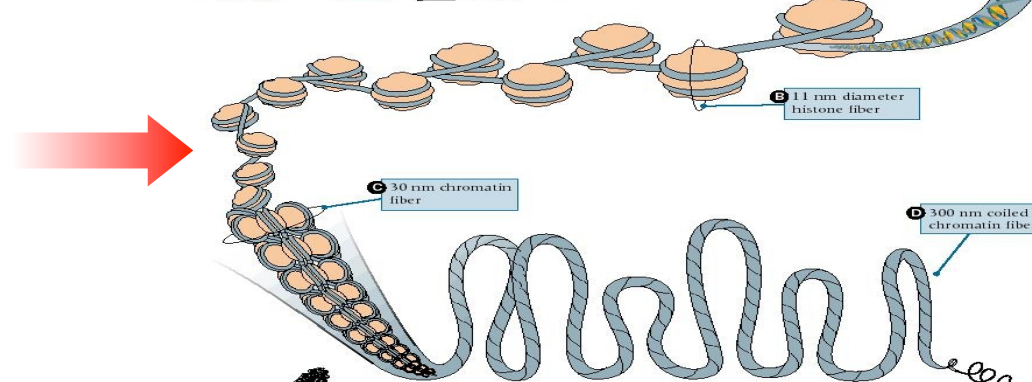
# What is Epigenetics?

**Molecular processes involved in the regulation of gene expression without change of DNA sequence**

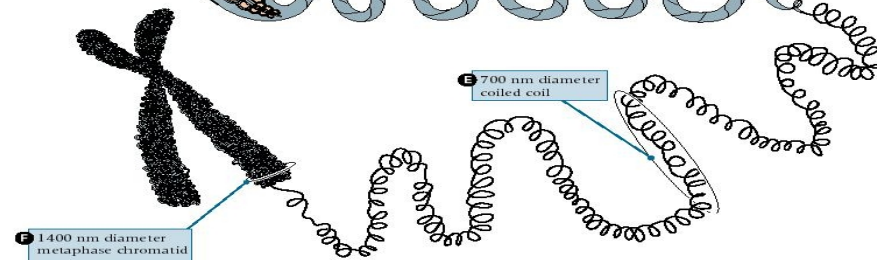
① DNA methylation/  
hydroxymethylation



② Histone  
modifications



③ Non-coding  
RNAs



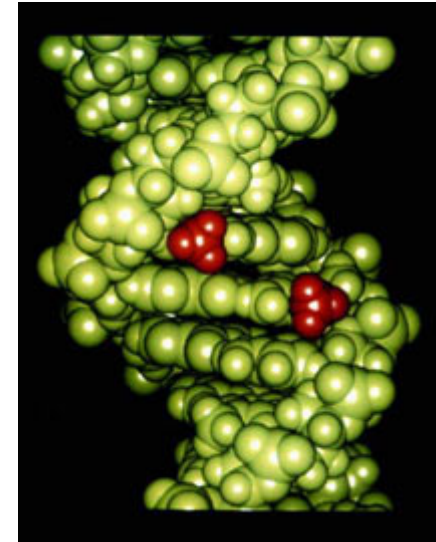
# DNA methylation: the most stable epigenetic mark

In mammals, DNA methylation concerns only the Cytosine nucleotide

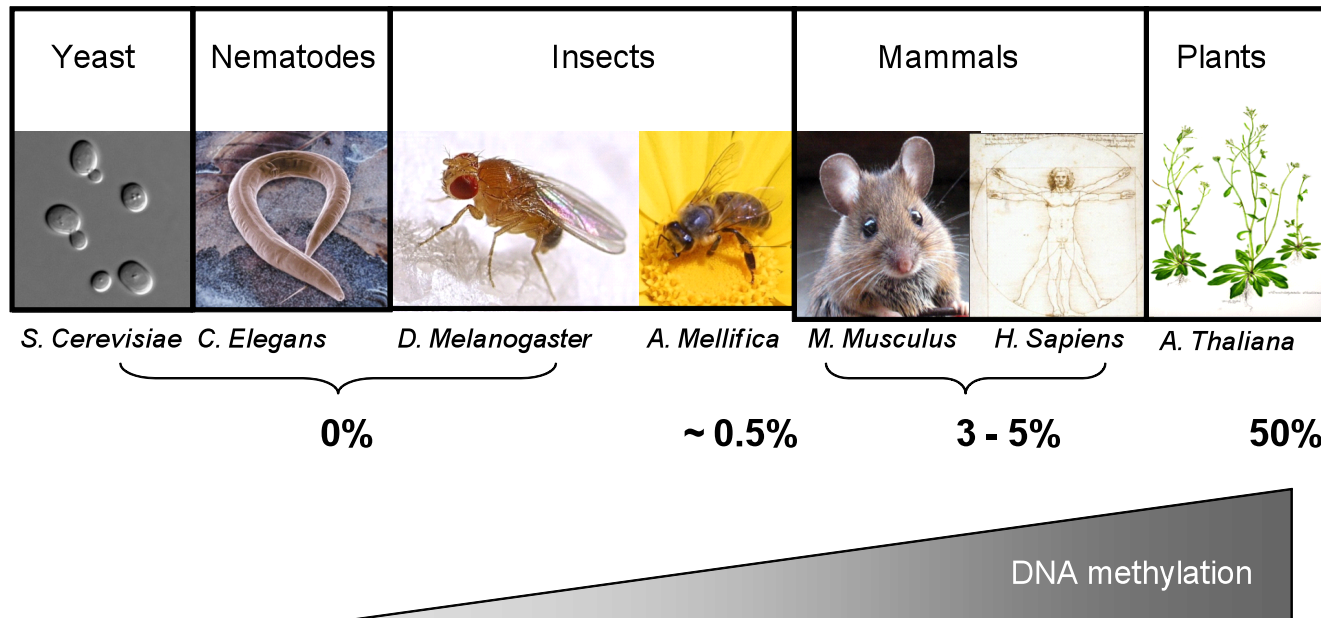


Mostly observed sites, the CpG dinucleotides

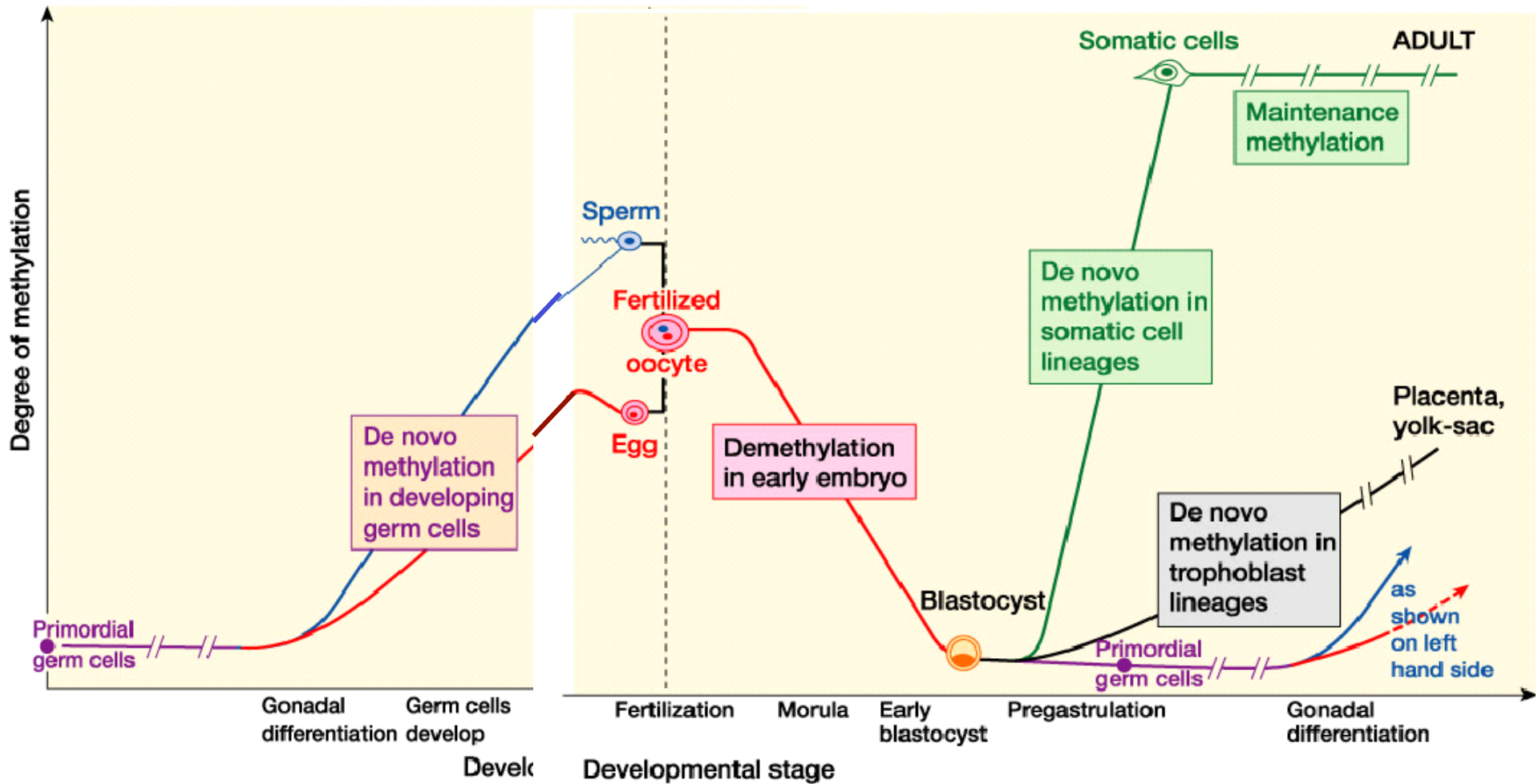
Also CpA observed in ES cells



In eucaryotes, DNA methylation is common but not universal



# DNA methylation during development



# Epigenetics: 1) gestation



Hardy  
55 kg

Laurel  
23 kg

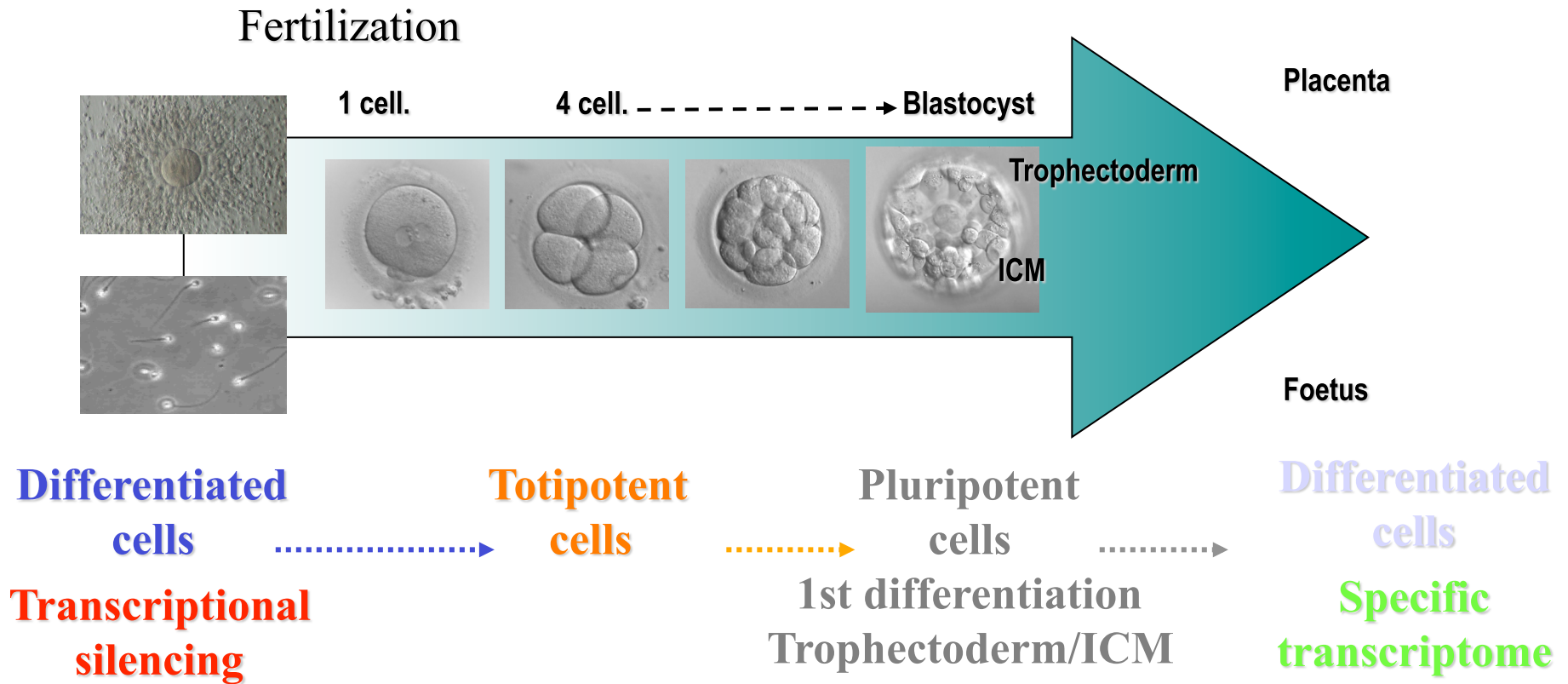


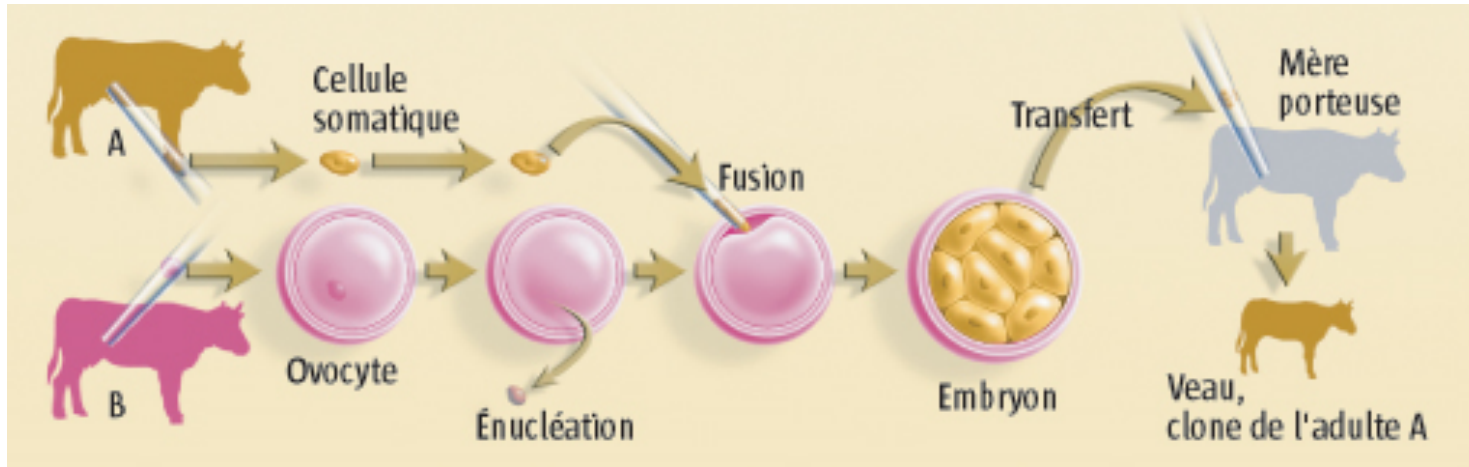
UMR  
Biologie du  
Développement  
et  
Reproduction

Same genome, same birth day  
But different environment  
= environment --> different development



# During embryo development, successive waves of epigenetic reprogramming induce changes in transcriptomic patterns

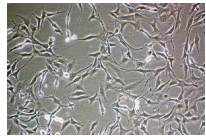




**Fibroblastes**

**Cellules embryonnaires**

**Individus**



**Cellules  
différenciées**

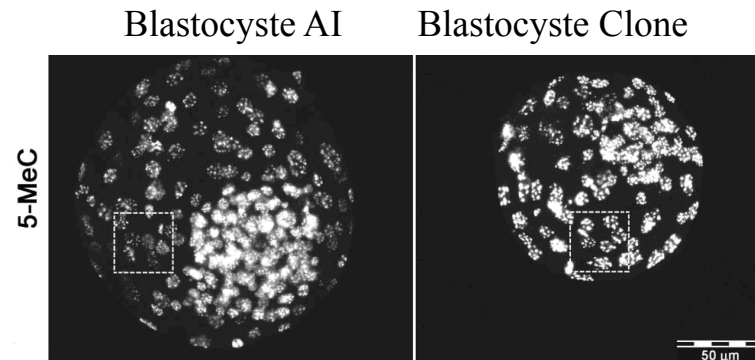
**Cellules  
totipotentes**

**Cellules  
différenciées  
Transcriptome**

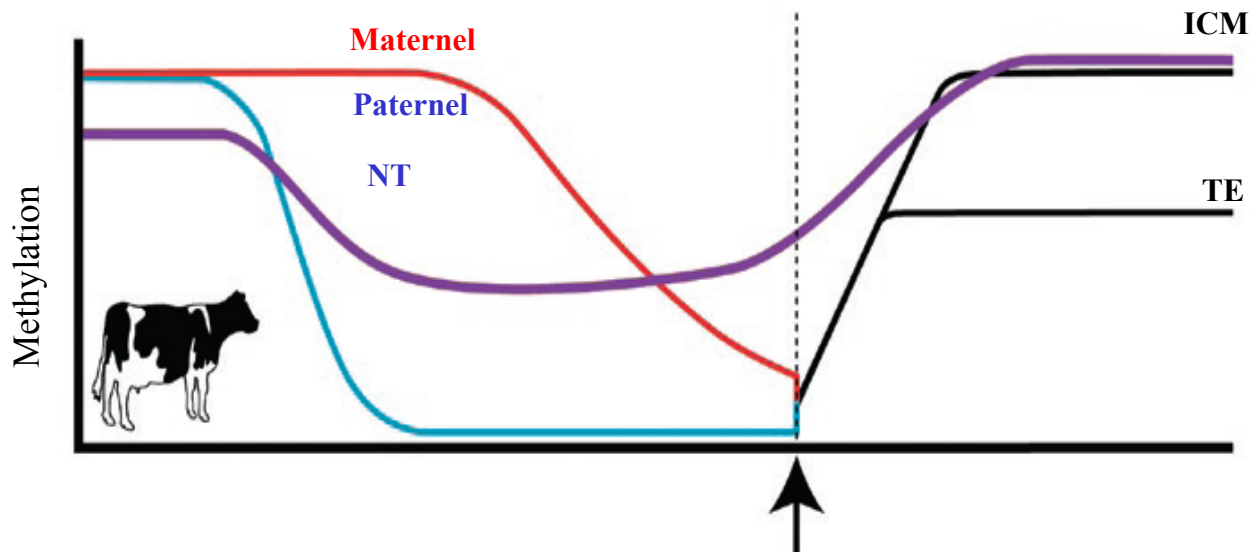
**Transcriptome**

**These reprogramming steps are crucial for embryo development and may be incomplete or aberrant**

# Cloning affects the DNA methylation during the first step of development



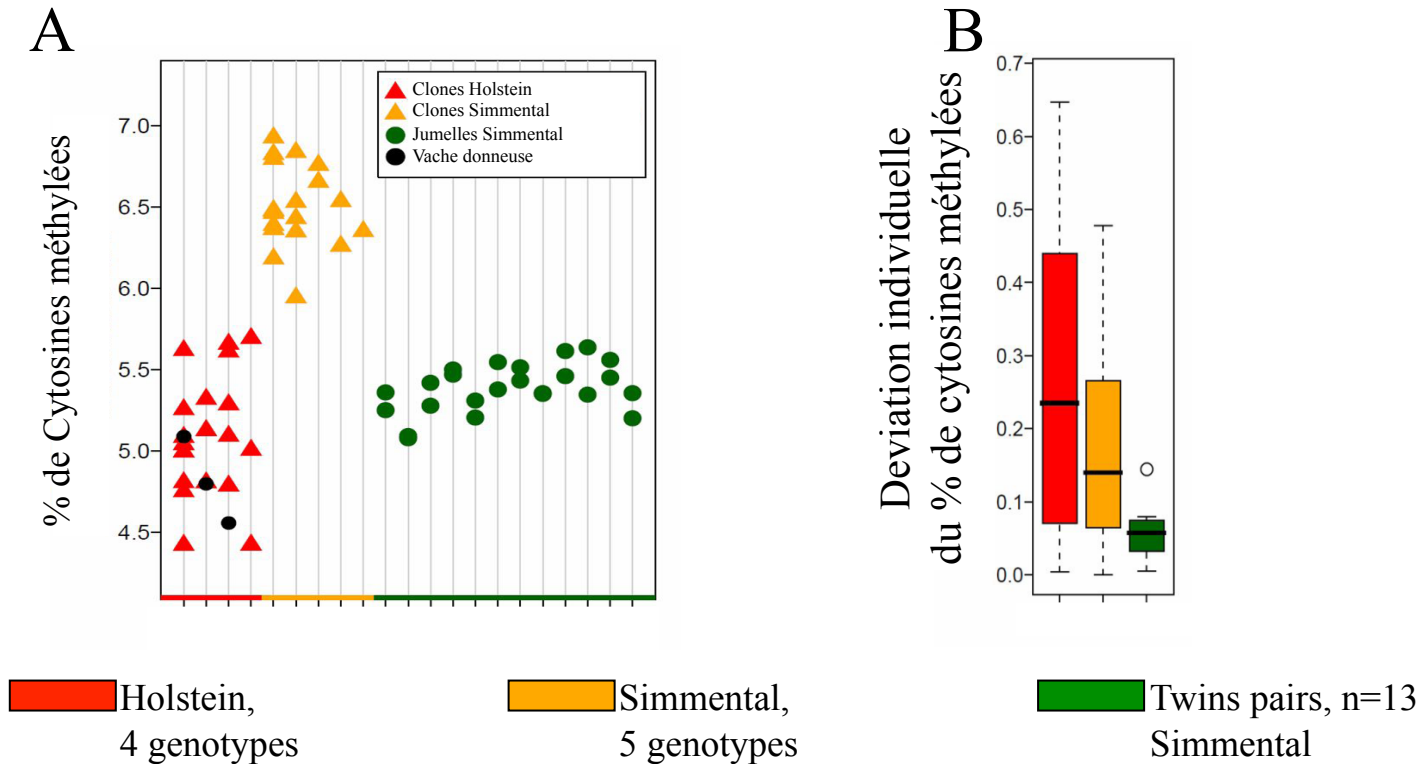
(Santos *et al.*, 2003)



Yang *et al.*, *Nature Genetics*, 2007 ; Maalouf *et al.*, *Epigenetics*, 2008

# Epigenetic perturbations induced by cloning are maintained throughout the life

Variability of global methylation rate in lymphocytes of adult bovine clones



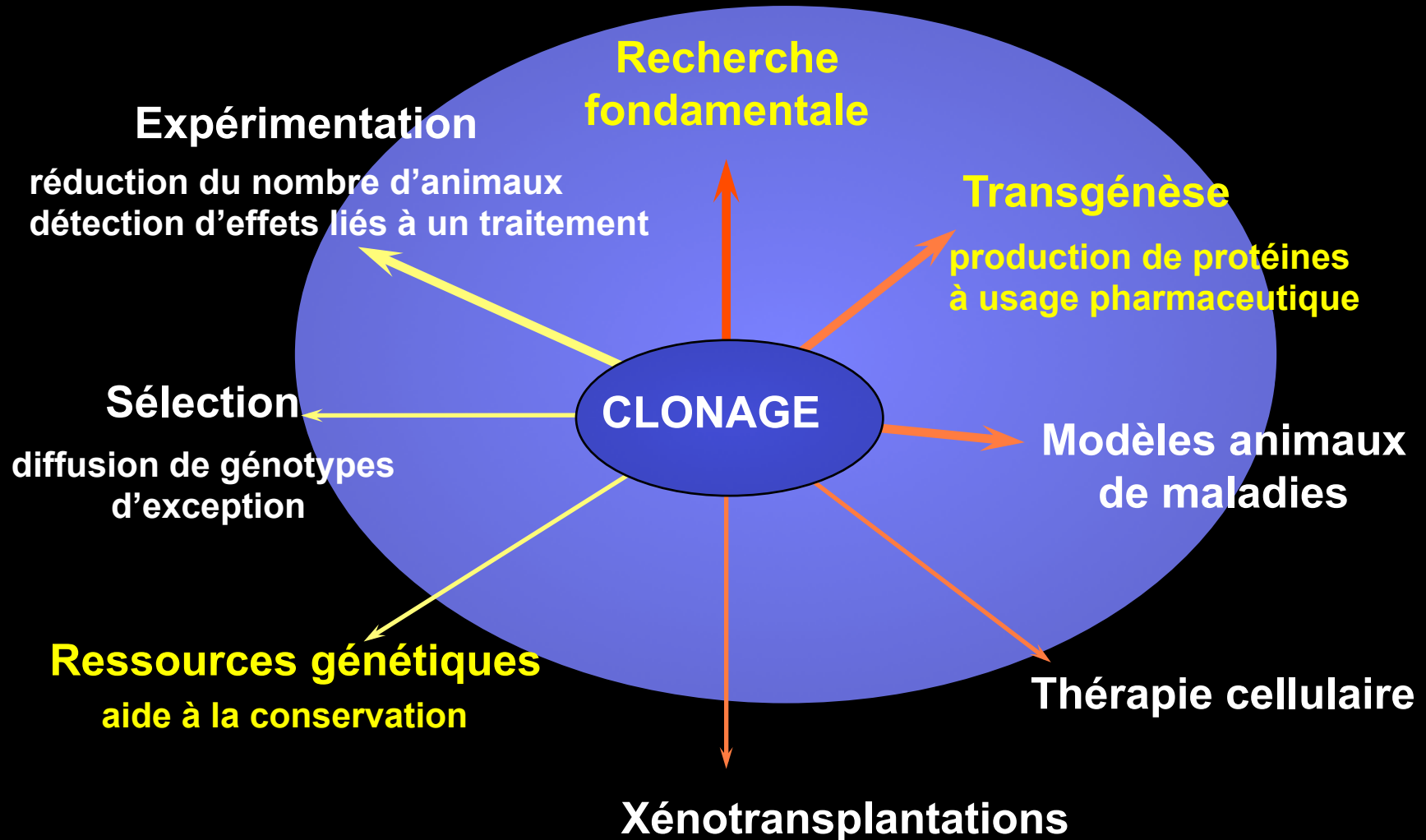
(De Montera et al., 2010)

# Pourquoi cloner ?

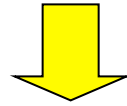
Les enjeux



# Les perspectives d'utilisation du clonage animal



# Expérimentation



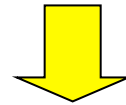
La naissance de Dolly a révolutionné les théories sur la plasticité du génome



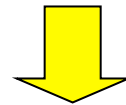
- Biologie cellulaire: l'établissement de cellules souches
- Biologie du développement: génomique et reprogrammation du fonctionnement du génome
- Comprendre les interactions noyau/ cytoplasmes
- Physiopathologies de la gestation: rôle de l'épigénèse

# Limitation du nombre d'animaux en recherche

↓ Variabilité génétique



↑ Pouvoir statistique



↓ Nombre d'animaux pour tester un produit



*3x10 vaches au lieu de 53 vaches*  
*Caviat : variabilité épigénétique!*

# Clones = modèles animaux pour la recherche

Exemple : étude du comportement alimentaire des herbivores

	Coefficient of variation (%)		
	Clones Holstein N=5	Controls Charolais n=16	Controls BB, n=6
<b>Voluntary Intake</b>	<b>3.2</b>	<b>8.9</b>	<b>7.5</b>
<b>Eating time (min/d)</b>	<b>7.6</b>	<b>11.0</b>	<b>15.8</b>
<b>Number of meals</b>	<b>4.6</b>	<b>19.0</b>	<b>14.9</b>
<b>Rumination time (min/day)</b>	<b>4.3</b>	<b>10.2</b>	<b>11.2</b>
<b>Rumination periods/day</b>	<b>2.3</b>	<b>10.3</b>	<b>9.8</b>

(D'après Baumont et al., 1995)



**BOVANCE**

*advancing genetic opportunities*

Clod

### **Panhandle Slim**

Panhandle Slim not only has become a legendary name in the bucking bull industry, he's become a common

"I watched Panhandle Slim from atop the bucking chutes for years, and #115 Mr. Slim is so similar, in so many ways; it was fun to see that again," Accomazzo comments. "Mr. Slim was rowdy in the chutes and hard to get out on, just like Slim (Panhandle Slim) himself."

and brood cows. In the height of his career, Panhandle Slim averaged 90 points – when riders could stay on – and he owns the title of 1997 PBR Bucking Bull of the Year. Sired by the also-legendary White Sports Coat sire, and out of a famous cow named Kung Fu, Scott Accomazzo and Superior Genetics purchased Panhandle Slim at the end of his bucking career, in 2005.





# ET Cryozootech Z (CL)

Sperme congelé disponible en France et dans le monde

Contact@cryozootech.com



E.T.CRYOZOOTECH

**Juin 2012 :**  
**les clones et**  
**leurs descendants**  
**autorisés**  
**dans les competitions**  
**FEI**



E.T.FRH

E.T. Cryozootech Z est le clone d' E.T. FRH.

Il détient l'intégralité des gènes du fabuleux hongre performer génie de l'obstacle.

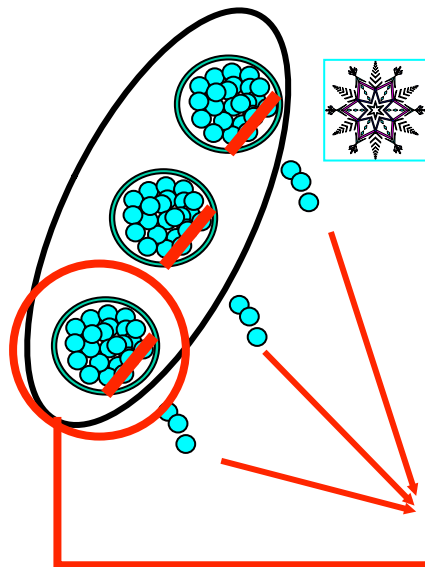
# Intégration dans des schémas de sélection

## Clonage somatique



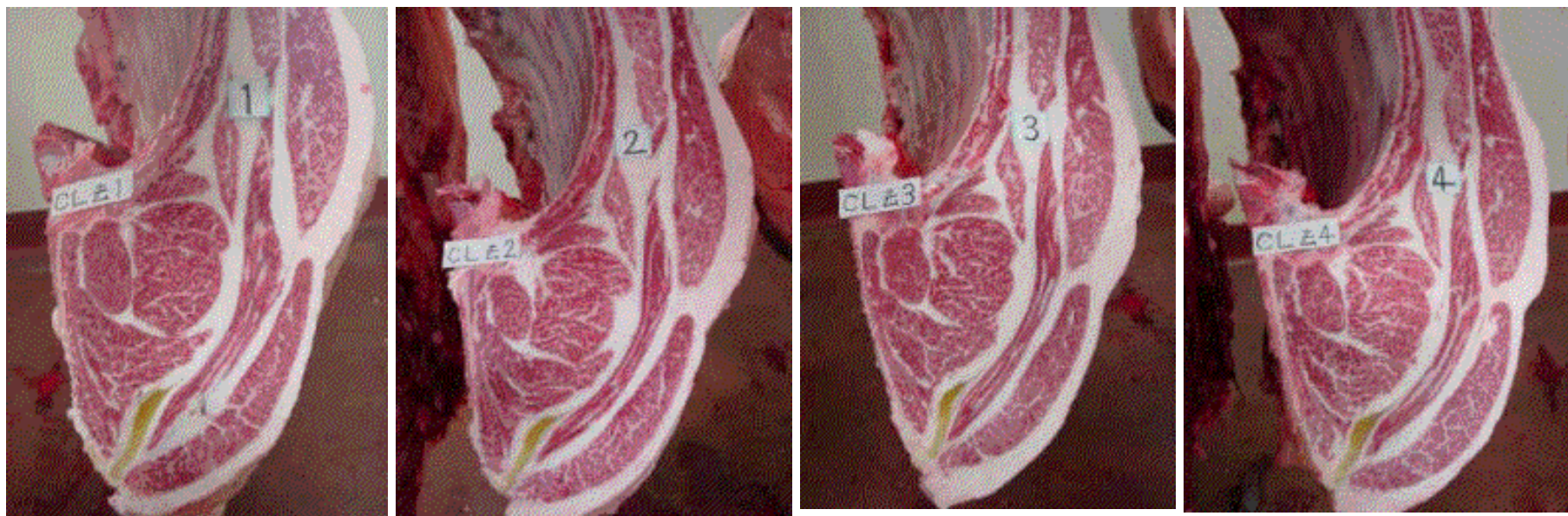
- Réduction des coûts pour la période de Lay-Off

## Clonage embryonnaire



- Sélection assistée par marquage ou séquençage

# Standardisation de la qualité



Coefficient de Variation  
Poids de carcasse : 2.3%  
Epaisseur de la graisse: 3.9%  
REA : 5.3%

(NLBC 2002)

# Sécurité alimentaire

Garantie sans GH recombinante



# Assurance

En cas de catastrophe sanitaire, d'accident, ...

la génétique est sauvegardée



Fièvre aphteuse



Grand National 2012

# Sauvegarde de races ou d'espèces en danger



*L'animal peut être mort depuis longtemps!*

## Races en voie de disparition

- Enderby Island cattle (NZ)
- Baudet du Poitou (France)...



## • Espèces en voie de disparition

- Saola (*Pseudoryx nghetinhensis*)



- Gaur (*bos gaurus*)

- Banteng (*bos javanicus*)

- Chèvre Bucardo des Pyrénées

- Lapin Amami

- Chats sauvages: African wild cat...



# Quid du clonage inter-espèces

- Taux d'embryons **blastocystes** très faibles: **< 5%**
- Important blocage lors de la **mise en route du génome embryonnaire**
- Problèmes de dégradation des **ANRs maternels** présents dans l'ovocyte receveur
- Incompatibilité entre les **mitochondries** de l'ovocyte receveur et du génome donneur introduit

*Jiang et al., 2011 / Kwon et al., 2011/ Sansinena et al., 2011 / Hosseini et al., 2012*

# Pour des raisons sentimentales?



Clones de labradors (Corée)



Copy cat (Texas A&M)

# Le Clonage pour la création d'animaux transgéniques

## ○ Biomédecine

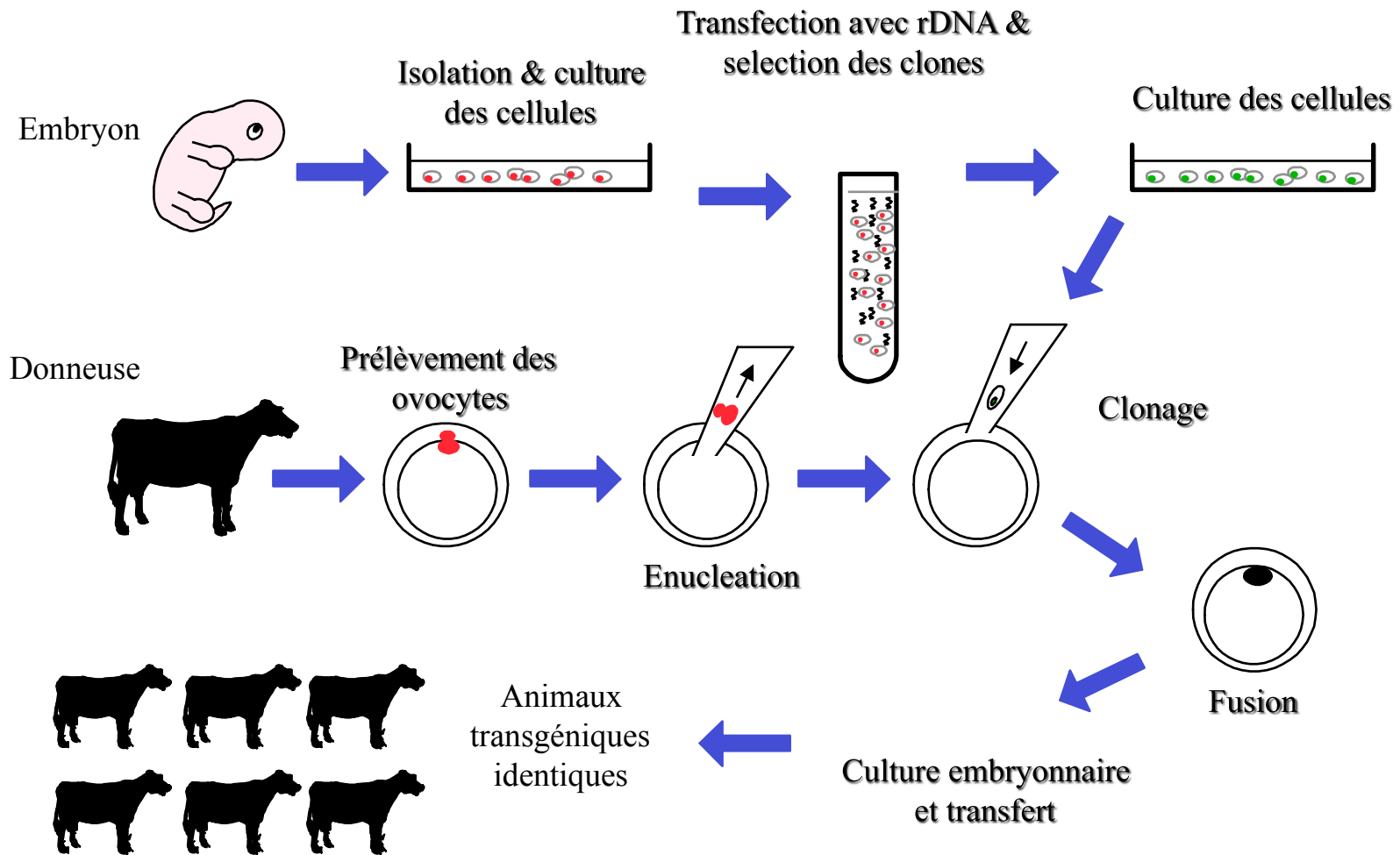
- Production de protéines recombinantes dans le lait ou le sang ("moleculture")
  - ATRYN® (antithrombine  $\alpha$ )
- Xénogreffes chez l'homme
- Animaux modèles de certaines pathologies humaines
- Production de lait "humanisé" pour la prévention et le traitement des diarrhées...

## ○ Agro-industrie

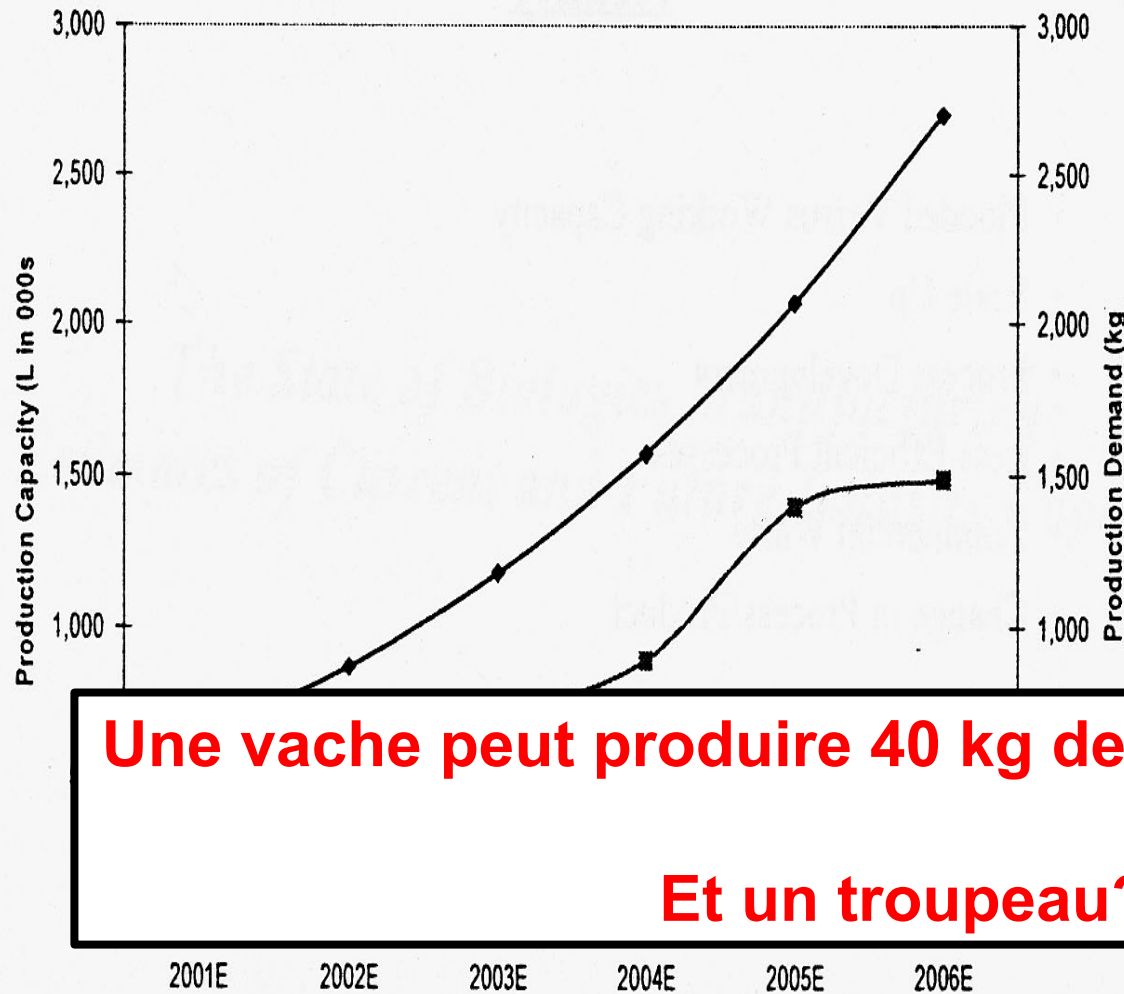
- Bovins sans prion (Hematech®)
- Biomatériaux (ex monomères de soie d'araignée)
- Résistance aux maladies
- Environnement (phytase chez le porc)...



# Clonage en association avec la transgénèse



# Protéines recombinantes: un écart croissant entre offre et demande?



Les capacités de production en culture de cellules: le meilleur scénario

Réacteur de 10 000L taux de production x 1.25g/L = 12.5Kg moyen

12.5 Kg x 65% = 8.1 Kg produit brut

8.1 Kg x 95% produit terminal

**Une vache peut produire 40 kg de protéines par an...**

**Et un troupeau?**

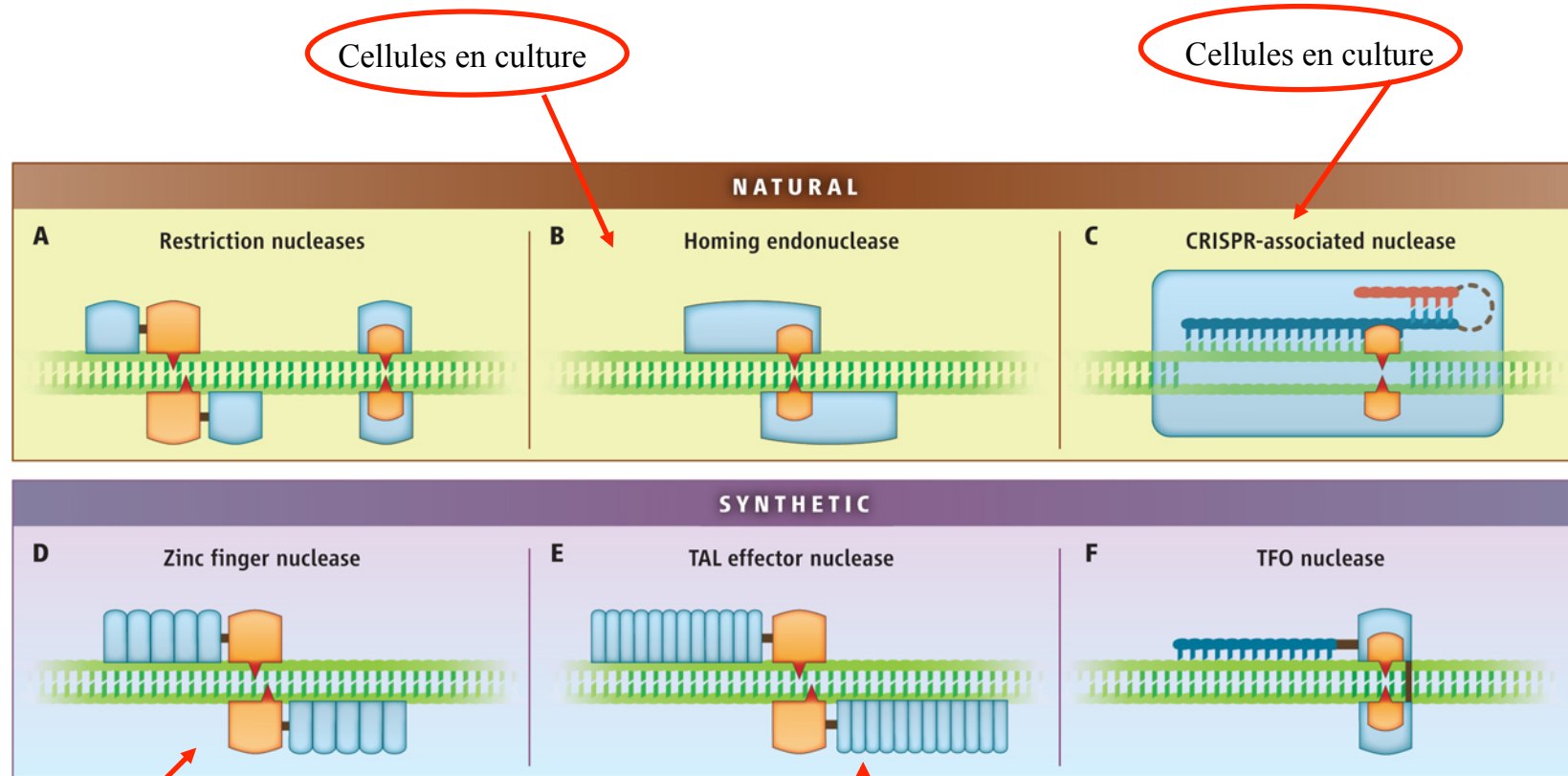
154 Kg / 10 000L / an

- Production Capacity of Biopharmaceutical Industry
- ◆ Manufacturing Demand of Biopharmaceutical Industry



Lactation Parlor for individual or pooled milk collection

Potential genome editing. Schematic comparison of nucleases with DNA-binding (blue) and DNA-cleaving domains (red).



Cellules en culture

Cellules en culture

Poisson zèbre, Souris, rat, lapin, cellules en culture, clonage à partir de cellules GM (porc, bovins)

Poisson zèbre, Souris, rat, cellules en culture, clonage à partir de cellules GM (porc, bovins)

J v d Oost Science 2013;339:768-770

Published by AAAS



# Perspectives



# Perspectives

## Situation internationale

Nombre de clones nés et vivants:

≥ 5000 bovins

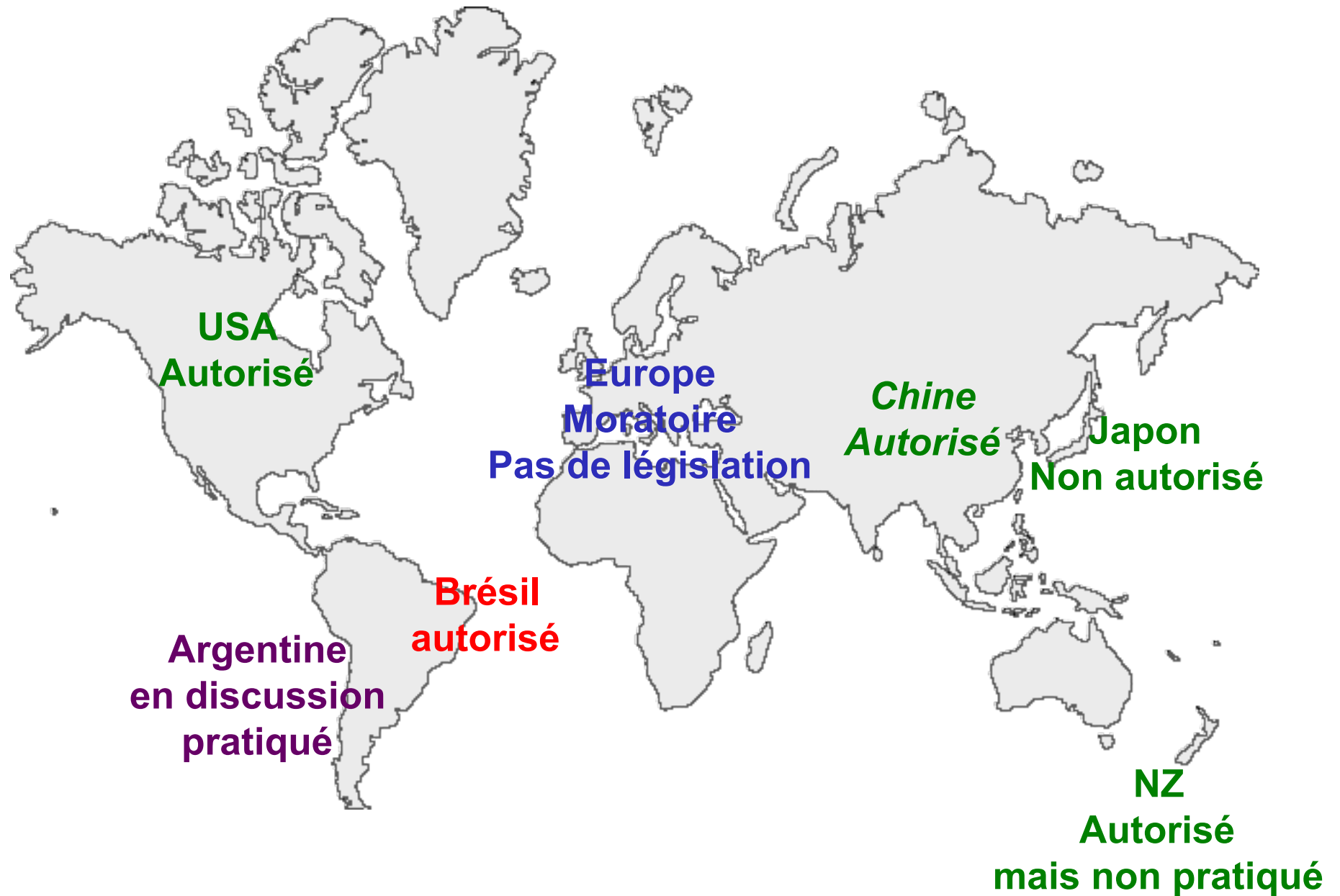
≥ 1500 porcs

≈ 120 chevaux

Nombre réel?

Transgéniques ou non?

# Passage dans la chaîne alimentaire



# Perspectives

## Situation européenne



Welcome to the web site of the  
European Group on Ethics in Science and New Technologies

Considering the current level of suffering and health problems of surrogate dams and animal clones, the EGE has doubts as to whether cloning animals for food supply is ethically justified. Whether this applies also to progeny is open to further scientific research.

=> Le problème pour l'Europe est la souffrance animale



ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT





# Perspectives

## Enjeux internationaux

Dernier vote au parlement : 98% des parlementaires contre

Dernier débat entre Parlement et Conseil de l'Europe  
=> pas de conclusions?

Automne 2012: vote du parlement européen pour l'interdiction des clones et descendants de clones dans l'alimentation humaine

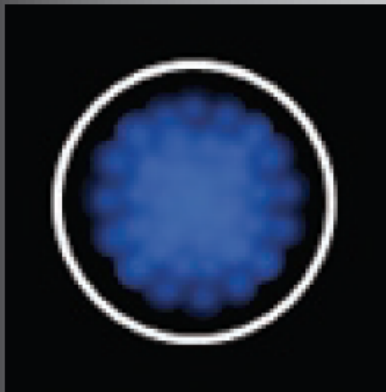
Enquête publique sur internet => résultats attendus en mars

**=> Mais est-il possible de refuser les clones ou les descendants de clones sans fermer nos frontières?**

# Le rôle de l'IETS

## International Embryo Transfer Society

Améliorer la prise en charge des gestations et des nouveaux-nés

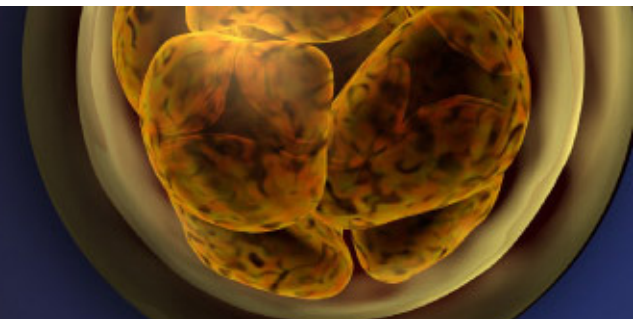


### Chapter 10. Health care and well being of animal clones

*Pascale Chavatte-Palmer<sup>1,2</sup> and Rita Lee<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup>INRA, UMR 1198 Biologie du développement et reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France <sup>2</sup>ENVA, UMR 1198 Biologie du développement et reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France <sup>3</sup>Reproductive Technologies, AgResearch, East Street, Private Bag 3123, Hamilton, New Zealand*

**IETS**  
INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY



# Le rôle de l'IETS

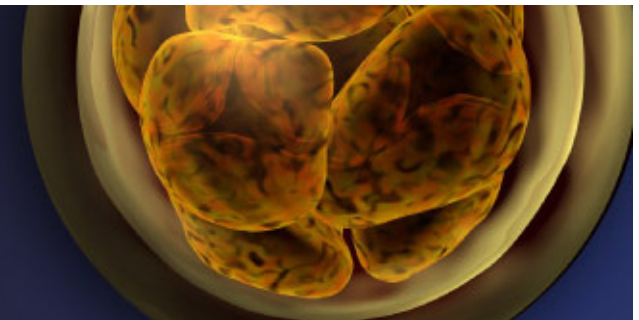
## International Embryo Transfer Society

### Position Statement of the IETS

The International Embryo Transfer Society (IETS) encourages and strongly supports freedom to conduct research on animal "cloning" by somatic cell nuclear transfer and related techniques using embryonic, fetal, and adult animal cells. The IETS believes that such research will provide avenues to improved understanding of the genetic regulation of development and should ultimately result in improved health, welfare, and reproductive efficiency of animals.

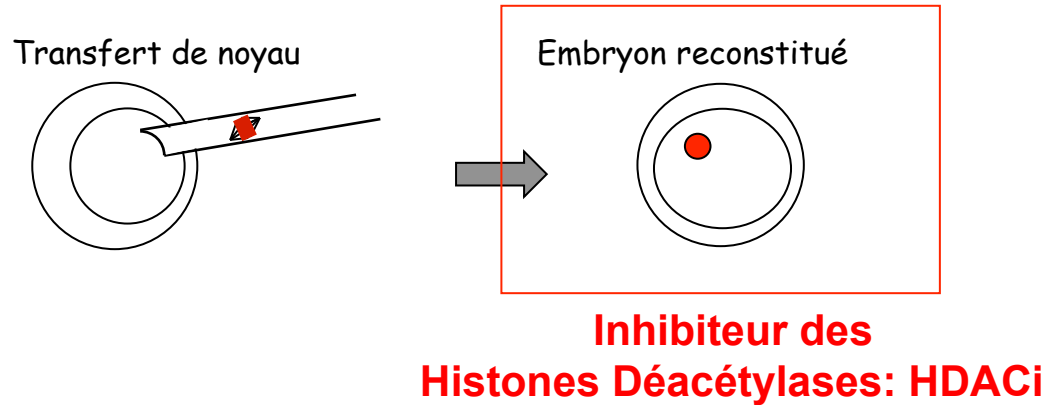
The Board of Governors of the IETS  
March, 7th, 2003  
Reaffirmed on January 5, 2007

=> Il faut continuer la recherche



# Interventions précoces?

## Traiter les embryons pour aider la « reprogrammation »



**Survie  
à terme  
x3 à x10**



Hypothèse: l'acétylation des histones favorise l'ouverture de la chromatine et par conséquent l'expression des gènes

**=> Mais pas aussi prometteur chez bovins**

# Le rôle de l'IETS

## International Embryo Transfer Society

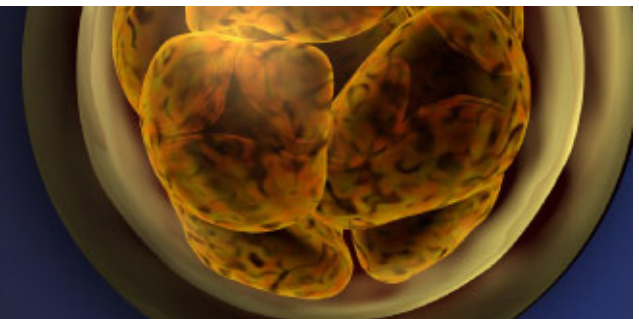
**Based on the scientific evidence, and based on the conclusion of the European Food Safety Agency and the US FDA that there is no scientifically proven safety concern for food derived from clones and offspring of clones and their products, there is no necessity to label products from clones or offspring of clones.**

The Board of Governors of the IETS  
January 10, 2012

=> Il n'est pas nécessaire d'étiqueter les produits de clones pour des raisons de sécurité alimentaire



**IETS**  
INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY





**Technique réservée à une élite génétique, au domaine biomédical  
ou à la recherche fondamentale**

**Recherche nécessaire pour améliorer l'efficacité et le bien-être**

**Nécessite un encadrement (formation des équipes vétérinaires)**

**Peu de risques pour la variabilité génétique**

**... il serait dommage de s'en priver**



ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT





**Jean-Paul Renard**



**Rita Lee et Yvan Heyman**

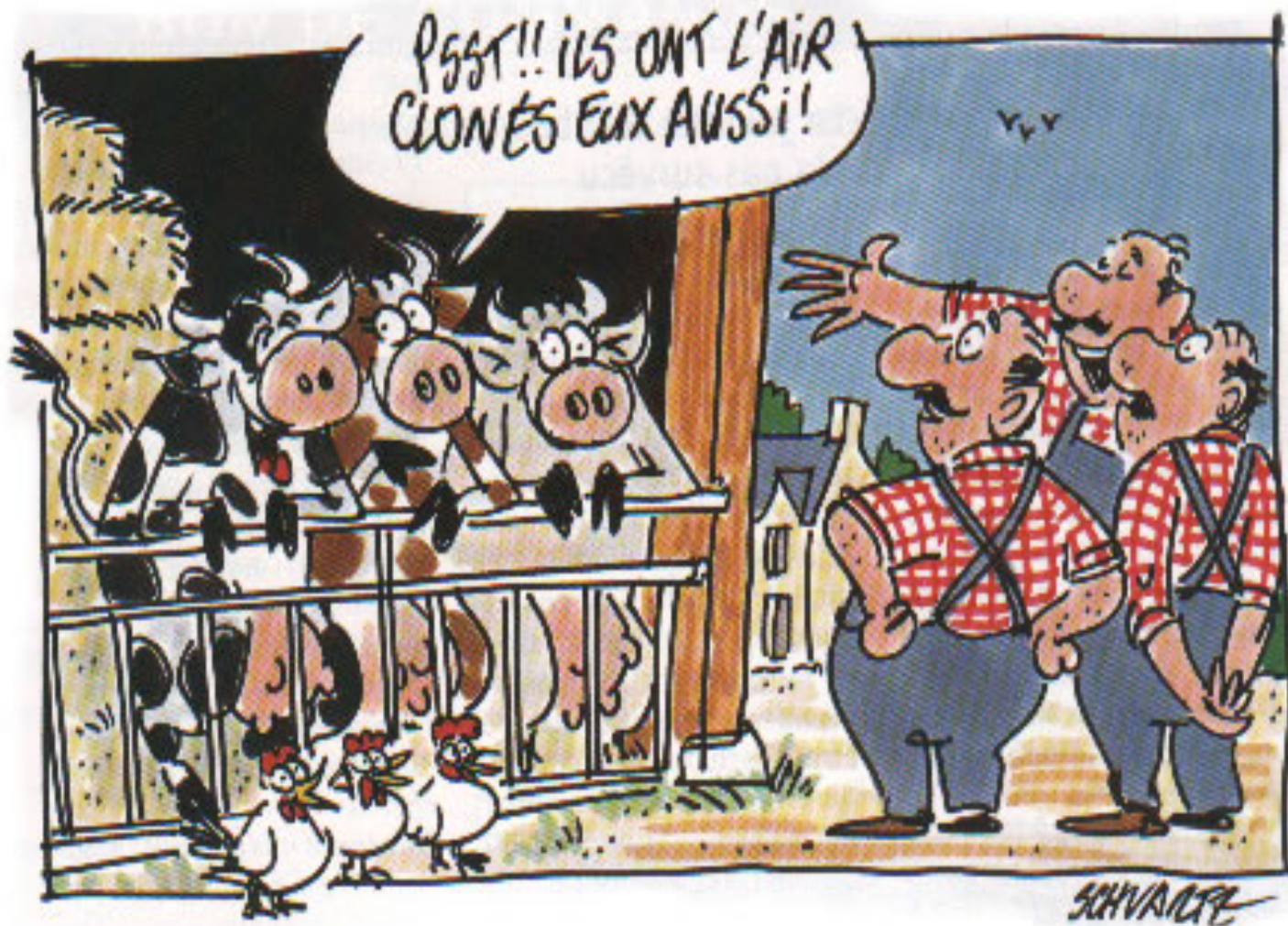


**UMR BDR  
Equipe ODEEPHA**



**Eric Palmer**







ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT

