

Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection

Dans les années soixante, le recours massif à l'insémination artificielle a permis d'organiser l'amélioration génétique des bovins laitiers. De nouvelles technologies sont apparues depuis, issues du progrès des connaissances sur la fécondation et le développement de l'embryon. Elles vont certainement contribuer à améliorer indirectement la qualité génétique des taureaux d'insémination. Dans certaines conditions, elles pourraient même influencer directement le niveau génétique des femelles dans les élevages et donc la rentabilité de ceux-ci.

On appelle biotechnologies de l'embryon l'ensemble des techniques mises au point à partir des connaissances de base acquises sur le développement de l'embryon. Leur essor est récent et encore à bien des égards modeste. Elles se sont développées chez les mammifères domestiques à partir des années 80, d'abord dans l'espèce bovine où la reproduction des animaux était, depuis déjà trente ans, largement organisée autour de l'insémination artificielle. Chez cette espèce, l'embryon a d'abord été produit exclusivement *in vivo* après stimulation hormonale des femelles donneuses. Ce mode de production a permis le développement de la technologie du transfert d'embryons associée à leur congélation. Plus récemment, une deuxième génération de technologies est apparue qui s'appuie sur la production d'embryons en culture, après maturation et fécondation *in vitro* d'ovocytes prélevés sur l'animal vivant. Les progrès de nos connaissances sur la physiologie

de l'embryon de mammifère permettent maintenant l'émergence d'une troisième génération de techniques. Celles-ci tirent parti de l'extraordinaire plasticité des premiers stades de l'embryogénèse et visent à modifier encore plus en avant les caractéristiques de l'embryon : le transfert nucléaire qui aboutit à la production de clones, et la transgénèse qui consiste à introduire un gène étranger dans les cellules de l'embryon en sont les illustrations.

Pour présenter ces trois générations de technologies, nous avons donc choisi l'espèce bovine comme modèle. Notre propos est d'examiner quels sont les apports potentiels des biotechnologies de l'embryon pour l'économie des productions animales et particulièrement pour la sélection des reproducteurs, sans évoquer les technologies qui modifient les caractéristiques génétiques des embryons. Ceci nous a conduit à ne pas traiter de la transgénèse (voir l'article de L.-M. Houdebine, ce numéro) et à présenter chaque technologie en deux temps : une description des techniques et de leur efficacité, puis une analyse de leur impact réel ou potentiel dans les programmes d'amélioration génétique.

Résumé

Cet article décrit les bases de plusieurs biotechnologies de la reproduction chez les bovins : superovulation et transplantation embryonnaire, sexage des embryons, ponction des ovocytes *in vivo* et fécondation *in vitro*, clonage embryonnaire et clonage somatique. On précise leurs limites techniques actuelles, leurs perspectives d'amélioration et leurs coûts respectifs. Les conséquences de leur utilisation dans les programmes d'amélioration génétique sont analysées tant au niveau de la situation actuelle que des perspectives. Il apparaît que la transplantation embryonnaire est efficace et rentable dans les programmes de sélection bovins. Les perspectives à long terme les plus intéressantes sont fournies par le clonage si les obstacles techniques sont surmontés.

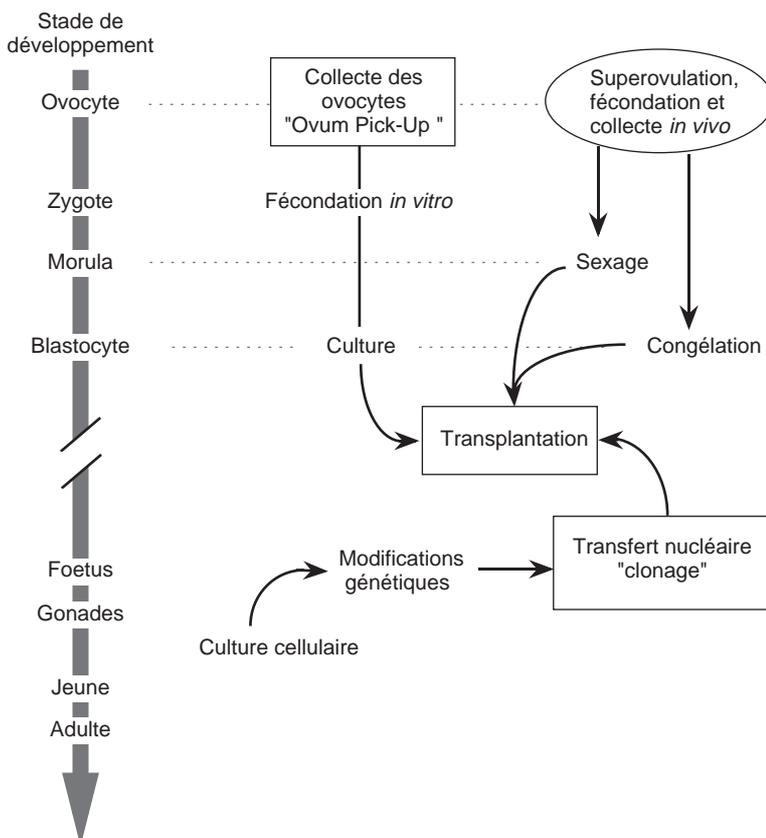
1 / Des bases biologiques aux techniques

Les interventions sur l'embryon de mammifère concernent essentiellement la période du développement qui précède son implantation

définitive dans l'utérus. Cette période dure selon les espèces de 4 (souris, lapin) à environ 14 jours (vache). Elle est marquée par la mise en activité du noyau zygotique et la réalisation des premières différenciations cellulaires. L'étude des mécanismes fondamentaux qui assurent la réalisation de ces deux événements révèle deux caractéristiques de la vie au début du développement : le rôle essentiel du gamète femelle dans le contrôle de la mise en activité du génome zygotique, et la grande plasticité de l'embryon notamment vis-à-vis du milieu environnant jusqu'au moment de l'implantation (Menezo et Renard 1991).

C'est à partir de ces deux caractéristiques du début de l'embryogenèse que se sont constituées et que continuent à se développer les biotechnologies de l'embryon (figure 1). Historiquement, les premières applications des données de la recherche ont été développées en collectant des embryons développés *in vivo*, au stade blastocyste. Dans un deuxième temps, mais à partir des années 80 seulement, les interventions ont concerné les ovocytes matures fécondés *in vitro* (Brackett *et al* 1982) puis les ovocytes immatures (Leibfried-Rutledge *et al* 1987). Cette évolution a été rendue possible par les progrès réalisés dans la définition de conditions de culture appropriées (Heyman et Menezo 1987). Elle a permis de multiplier les interventions sur les embryons, créant une combinatoire de techniques intégrant toujours plus en avant les données de base de la biologie du développement.

Figure 1. Les principales biotechnologies de l'embryon.



Ces techniques se sont organisées autour de trois technologies principales : la transplantation embryonnaire, associant la production et la collecte d'embryons *in vivo* et intégrant maintenant le plus souvent les possibilités offertes par leur congélation ou l'examen de leur cellules (sexage) ; le prélèvement *in vivo* d'ovocytes par ponction folliculaire (OPU) suivi de leur maturation, leur fécondation *in vitro* (FIV) puis de la culture des embryons ; enfin le clonage qui ouvre la voie à la multiplication de génotypes embryonnaires identiques et pourrait demain être étroitement associé à la modification contrôlée du génome par transgénèse.

2 / Les applications actuelles du transfert d'embryons

2.1 / Une activité en constante progression

Le transfert d'embryons est utilisé en pratique dans les élevages depuis le début des années 80. Cette technologie a pu voir le jour grâce aux connaissances accumulées sur la physiologie de la reproduction des mammifères domestiques, notamment à partir des progrès décisifs obtenus avec le contrôle hormonal de la croissance folliculaire (Mauléon *et al* 1970) et celui du moment de l'ovulation (Thimonier *et al* 1975). Le transfert d'embryons, qui s'est d'abord développé par transposition des méthodes chirurgicales proposées par la recherche vétérinaire (Rowson *et al* 1969), n'est véritablement devenu une pratique d'élevage qu'avec la mise au point d'une méthode de transplantation adaptée de l'insémination artificielle (IA), consistant à déposer l'embryon au-delà du col de l'utérus, par voie vaginale (Renard *et al* 1977). Avec cette approche, en moyenne 60 % des femelles deviennent gestantes après transfert d'un embryon et 56 % mettent bas (tableau 1a), un rendement identique à celui de l'insémination artificielle (52 % après une IA, Boichard et Manfredi 1995).

Le nombre de transplantations d'embryons bovins connaît ces dernières années une progression régulière en Europe et en France (tableau 2), mais ce nombre reste très faible par rapport à celui des inséminations artificielles (23 millions en Europe, dont 5 millions en France en 1995 ; Malafosse 1995). Toutefois, ce n'est pas tant le nombre de transplantations effectuées qui donne aujourd'hui son importance à cette technologie, que la place qu'elle occupe désormais dans la filière de la sélection bovine : près de 95 % des taureaux laitiers actuellement mis en testage sont en effet issus d'embryons transplantés (le plus souvent congelés). Ce chiffre illustre bien l'impact de cette biotechnologie dans la conduite des programmes de sélection.

La transplantation d'embryons est maintenant étroitement associée à la congélation, le

Tableau 1. Principales caractéristiques du transfert d'embryons bovins produits in vivo.

a - Taux de gestation et estimation du nombre moyen de veaux par femelle donneuse et par traitement.

Type d'embryon	Taux de gestation	Taux de mise bas (estimations)	Nombre moyen de veaux (estimations)
Frais	estimation 60 %	56 %	5,6 ⁽²⁾ x 56 % = 3,1
Congelé	estimation 50 %	46 %	5,6 ⁽²⁾ x 46 % = 2,6
Frais et sexé	377/833 ⁽¹⁾ 45 %	41 %	0,5 x (5,6 ⁽²⁾ x 41 %) = 1,1
Sexé et congelé	26/92 ⁽¹⁾ 28 %	24 %	0,5 x (4 ⁽³⁾ x 24 %) = 0,5

⁽¹⁾ D'après Thibier et Nibart (1995).

⁽²⁾ Nombre moyen d'embryons utilisables par traitement.

⁽³⁾ Nombre moyen d'embryons de qualité 1 seulement.

b - Nombre moyen (± s.e.) d'embryons utilisables par femelle et par traitement (Negrao *et al* 1997, P. Humblot, données non publiées).

Nombre total	7,8 ± 5,6
Utilisables (%)	5,6 ± 5,2 (72 %) dont : qualité 1 : 4,0 (estimation) ; qualité 2 : 1,6 (estimation)

Qualité 1 : aucun défaut de morphologie ; qualité 2 : quelques défauts, cellules exclues du développement.

c - Distribution des femelles selon le nombre d'embryons utilisables par traitement (P. Humblot et M. Nibart, communications personnelles).

Nombre d'embryons	0	moins de 3	3 à 6	plus de 6
% femelles	20 %	10 %	45 %	25 %

plus souvent au stade blastocyste, par des méthodes compatibles avec une décongélation réalisée juste avant la transplantation (Renard *et al* 1982). En Europe, 47 % des embryons récoltés (46 % en France) sont congelés avant d'être transplantés (tableau 2). Un taux moyen de mise bas de 46 % (cf. tableau 1a) est obtenu quand on ne congèle que les embryons d'aspect morphologique normal (qualités 1 et 2) qui représentent environ 72 % des embryons collectés (cf. tableau 1b). La congélation a permis une réduction du coût des interventions puisque le nombre de femelles receveuses qu'il faut préparer peut être ajusté au nombre d'embryons collectés. Elle a ouvert la voie aux échanges d'embryons entre élevages (de tous pays) et commence à être utilisée en complément du maintien d'animaux vivants pour conserver la diversité génétique des races domestiques (Ollivier et Renard 1995).

Le typage génétique des embryons avant leur transplantation peut être réalisé en prélevant par micromanipulation 1 à 4 cellules

sur des embryons au stade morula ou jeune blastocyste (J6 et J7). Quand l'opération est effectuée par une personne expérimentée, l'aptitude de l'embryon biopsié à se développer à terme après transfert dans une femelle receveuse n'est pas altérée. Cette approche a été mise en œuvre chez les bovins, essentiellement à ce jour pour un diagnostic du sexe de l'embryon avant son transfert. Le « sexage » a pu devenir une réalité grâce à l'isolement de sondes génomiques spécifiques du chromosome Y dont la présence est détectée dans le génome des cellules isolées d'embryons mâles (Leonard *et al* 1987). Le diagnostic du sexe peut être porté pour 95 % des embryons biopsiés et son exactitude est voisine de 100 %. En moyenne 4 embryons par femelle et par traitement ont la qualité morphologique requise (qualité 1) pour supporter une biopsie sans réduction de viabilité (53 %) ; avec les autres embryons (qualité 2), le taux de gestation après biopsie est plus faible (34 %). On peut donc considérer qu'environ 60 % des embryons utilisables pour la transplantation

Le nombre de transplantations d'embryons progresse en France et en Europe. Près de la moitié sont réalisées avec des embryons congelés.

Tableau 2. Evolution récente de l'activité de transfert d'embryons bovins en Europe et en France (source : Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE), 1993-1996).

	1993		1994		1995		1996
Nb de femelles collectées	21 542	+ 4,7 %	22 557	+ 11,1 %	25 075	- 3,7 %	24 133
dont en France	6 680		5 890		6 680		6 657
Nb d'embryons collectés	176 470		194 589		215 046		214 293
dont en France	50 270		55 249		60 298		56 797
Nb d'embryons transplantés	96 470	+ 6,6 %	102 887	+ 9,3 %	112 531	+ 4,8 %	117 942
dont congelés (%)	46 263 (48 %)		54 485 (53 %)		60 848 (54 %)		55 786 (47 %)
dont nb transplantés en France	22 744		24 288		27 260		28 793
dont congelés (%)	9 915 (44 %)		10 664 (44 %)		12 505 (46 %)		13 105 (46 %)
Stock d'embryons congelés	46 986	+ 2,3 %	48 062	+ 29,0 %	62 008	- 11,9 %	54 586
dont en France	14 404		14 404		19 803		12 396

d'embryons peuvent subir une biopsie (Thibier et Nibart 1995, Nibart *et al* 1996). Le nombre moyen de veaux sexés que l'on peut obtenir par femelle donneuse et par traitement en associant le diagnostic de sexe n'est donc en moyenne seulement que de 2,2 soit moins qu'après transplantation d'embryons non sexés (cf. tableau 1a). Le coût du veau produit en est d'autant augmenté. Enfin, l'association avec la congélation réalisée après la biopsie, quoique compatible avec le maintien de la viabilité de l'embryon se traduit en moyenne par un taux de gestation faible, de l'ordre de 25 %, ce qui constitue une limite supplémentaire pour l'application du sexage en élevage. Ainsi, malgré l'engouement qu'a suscité en France le diagnostic de sexe appliqué ces dernières années à plus de 3 000 embryons bovins (Thibier et Nibart 1995), son intérêt économique reste très marginal. Cette approche pourrait dans l'avenir se révéler très utile, mais pour caractériser simultanément la présence de variants alléliques de plusieurs gènes, ce qui est techniquement possible à partir d'un même prélèvement.

Deux facteurs limitent aujourd'hui l'efficacité de la transplantation : le nombre relativement faible d'embryons que l'on obtient après un traitement hormonal de superovulation et la variabilité de production entre femelles traitées. Aucun progrès décisif n'a été réalisé depuis plus de vingt ans dans ce domaine. Une femelle donneuse donne en moyenne 7 à 8 embryons par traitement mais seulement 5 à 6 d'entre eux (embryons de qualité 1 et 2) ont de réelles chances de se développer à terme après transfert (cf tableau 1b). En outre, 20 à 30 % des femelles traitées ne donnent pas d'embryons transférables (Greve *et al* 1995), alors que 25 % produisent plus de 6 embryons ce qui limite les possibilités de planification rigoureuse du nombre de femelles receveuses (tableau 1c). Il en résulte un coût technique environ 10 fois plus élevé que celui de l'insémination artificielle (Chupin 1985). C'est ce qui explique pourquoi la transplantation d'embryon n'est utilisée que pour la naissance de veaux dont la valeur génétique est élevée, permettant ainsi une diffusion efficace des meilleurs génotypes.

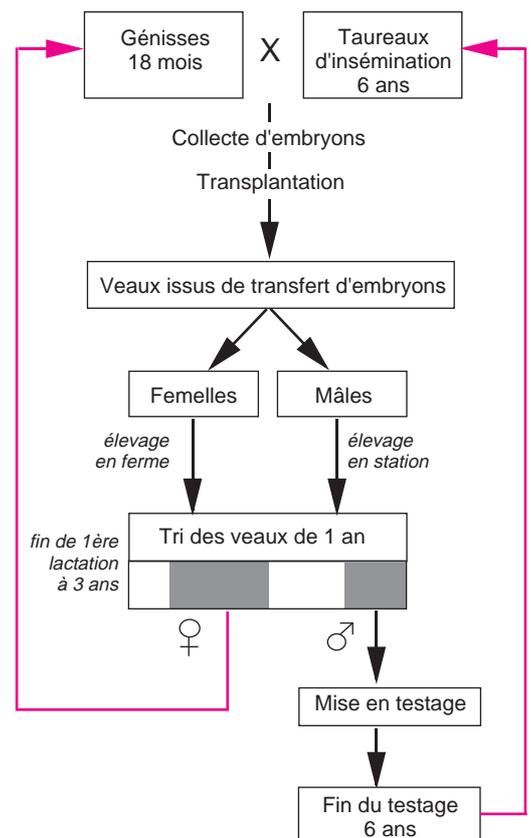
2.2 / Une contribution à la rénovation des schémas de sélection

La transplantation embryonnaire mise au point chez les bovins depuis la fin des années 70 a créé incontestablement, depuis le début des années 1980, des opportunités nouvelles pour la rénovation des schémas de sélection. En effet, malgré les handicaps dus au nombre relativement faible d'embryons utilisables par traitement, et malgré le fait qu'une partie des femelles donneuses ne produit aucun embryon, la technique contribue à augmenter de plus de 70 % la prolificité des femelles qui répondent le mieux au traitement. Elle permet aussi de réduire notablement l'intervalle de génération puisque les collectes précoces

d'embryons sont possibles sur des génisses de 15 mois. Ainsi, alors qu'avec la reproduction naturelle, une vache a produit en moyenne 3 veaux à l'âge de 6 ans, ce même résultat peut être obtenu dès l'âge de 2 ans avec la transplantation. La transplantation embryonnaire peut donc être mise à profit pour intensifier la sélection des mères des taureaux d'insémination. En effet, le rajeunissement des mères permet de tirer parti plus rapidement du meilleur niveau génétique moyen des jeunes générations. L'amélioration de la prolificité permet de sélectionner les mères plus renouveau pour assurer les besoins de renouvellement (figure 2). Au total, ces deux facteurs contribuent à augmenter le progrès génétique annuel de l'ordre de 20 à 30 % pour un critère comme la production laitière (Nicholas et Smith 1983, Colleau 1985, Meuwissen 1990, Nicholas 1996) et d'une proportion encore supérieure en ce qui concerne les programmes de sélection des bovins allaitants (Colleau et Elsen 1988). Les parties du programme de sélection concernant les mâles sont alors inchangées, notamment le contrôle de la descendance (testage).

Nicholas et Smith (1983) ont proposé d'utiliser la transplantation embryonnaire en apportant des modifications aux schémas de sélection classiques : sélection des reproducteurs dans des troupeaux spécialisés et sélection des taureaux à l'âge de 4 ans et non plus de 6 ans, à partir des performances de leurs

Figure 2. Programme de sélection utilisant la transplantation embryonnaire chez les bovins laitiers.



collatérales (demi-sœurs et pleines-sœurs). En fait, ceci n'est justifié que si le contrôle de performances en ferme est peu fiable ou s'il existe un traitement préférentiel des femelles (par exemple utilisation non déclarée d'hormones) ce qui est encore peu fréquent dans les pays développés (Lohuis 1995).

L'efficacité de l'utilisation de la transplantation embryonnaire a d'abord été étudiée quand la sélection porte sur des caractères héréditaires et d'expression non tardive comme la production laitière. Les schémas de sélection utilisant de jeunes mères à taureaux sont également efficaces quand la sélection porte sur des caractères d'expression tardive comme la longévité, caractère potentiellement important économiquement mais moins héréditable que la production laitière, (Colleau et Phocas 1994). La raison est que les reproductrices sont sélectionnées pour de tels critères non d'après leurs propres performances (« censurées », c'est-à-dire inconnues), mais d'après les caractéristiques moyennes (taux de réformes constatés) de leurs très nombreuses demi-sœurs paternelles. On remarquera que la nécessité de sélectionner sur de tels critères est un argument de plus pour ne pas abandonner le testage sur descendance des taureaux.

L'utilisation accélérée de la transplantation embryonnaire en complément de procédures classiques est actuellement la méthode la plus générale. On peut l'observer dans les programmes de sélection mis en œuvre au Danemark, en France, en Allemagne et aux Pays-Bas (20 à 30 % des taureaux laitiers sont issus de femelles jeunes). Les résultats pratiques obtenus en France ont été conformes à ce qui était attendu (Colleau 1993). Concrètement, on a observé que les index sur descendance de taureaux Holstein produits en France à partir de jeunes mères étaient équivalents à ceux de taureaux Holstein importés des USA (pays ayant le meilleur niveau génétique laitier pour cette race) mais issus de mères plus âgées.

Le rendement économique des sommes investies collectivement dans le transfert embryonnaire pour l'amélioration des tau-

reaux d'insémination est nettement positif alors que cela n'est pas le cas pour un éleveur individuel utilisant cette technique (Colleau 1993). Cette question sera présentée plus en détail au paragraphe 4.3.b.

2.3 / La place actuelle du sexage des embryons

Le sexage des embryons n'est pas utile dans le cadre de schémas où les mères de taureaux d'insémination ont bénéficié d'un raccourcissement maximum de l'intervalle de génération. La carrière des mâles dépendant de la connaissance de la lactation de leur mère génétique (figure 2), il faut attendre environ 6 mois avant de pouvoir décider de leur utilisation. Le recours systématique à de jeunes donneuses (sans sexage) serait alors associé à des coûts importants, car il faudrait élever tous les jeunes mâles pendant la période d'attente des résultats de leur mère. Des études théoriques (tableau 3, Colleau 1991) montrent que même en tenant compte du surcoût technique lié au sexage des embryons, on a intérêt à utiliser des donneuses plus âgées, sélectionnées d'après leurs premières lactations, et à sexer leurs embryons de façon à produire exactement le nombre de mâles à mettre au testage. En effet, la réduction relative des coûts totaux (transfert d'embryons et frais d'élevage des jeunes obtenus) est bien plus importante que la réduction de progrès génétique provenant du réallongement de l'intervalle de génération.

Aujourd'hui, le diagnostic du sexe de l'embryon est très peu utilisé dans les schémas d'amélioration génétique. Le coût du veau produit reste dissuasif, et le fait que seulement 60 % des embryons jugés aptes à la transplantation puissent être « sexés » constitue une perte économique non négligeable. En race Holstein par exemple, dans laquelle 30 % environ des taureaux sont issus d'embryons importés (congelés mais non sexés) les sélectionneurs préfèrent utiliser tous les embryons, les jeunes mâles étant mis en testage et les femelles superovulées. Le recours au diagnostic de sexe des embryons permet-

La collecte précoce d'embryons et le nombre plus élevé de veaux produits, et donc testés, permettent une sélection plus efficace.

Tableau 3. Bilan génétique et bilan économique du sexage d'embryons chez les bovins laitiers. Bilan génétique = % d'augmentation du progrès génétique annuel par rapport au schéma classique ; bilan économique = kF par taureau mis en testage. (J.-J. Colleau 1994, non publié).

Type de schéma	Coût (kF /taureau)				Coût total en %	Progrès génétique annuel en %
	TE	Station 0-1 an	Station 0-6 ans	Total		
Classique	0	30	250	280	0 (référence)	0 (référence)
Transfert embryonnaire (TE)						
- donneuses : génisses, pas de sexage, 20 embryons produits par taureau en testage	20	120	250	390	+ 40 %	+ 20 %
- donneuses : vaches en 2 ^e lactation, 10 embryons femelles (sexés) produits par taureau en testage	30	30	250	310	+ 11 %	+ 17 %

trait toutefois de valoriser d'autres biotechnologies comme le clonage de l'embryon (Heyman *et al* 1996).

3 / La production d'embryons *in vitro*

3.1 / Un nouveau développement pour le transfert d'embryons

Trois étapes jalonnent la longue période qui a permis à la production d'embryons bovins *in vitro* de pouvoir être considérée comme une biotechnologie parvenue à maturité : la définition de milieux synthétiques adaptés aux besoins métaboliques de l'embryon bovin au début de son développement (Menezo 1976) ; les premiers succès dans la mise en œuvre des techniques de fécondation *in vitro*, (FIV) initialement à partir d'ovocytes collectés *in vivo* (Brackett *et al* 1982), puis eux-mêmes produits *in vitro* par ponctions d'ovaires récupérés en abattoir (Leibfried-Rutledge *et al* 1987) ; enfin, le développement d'une méthode de récolte des ovocytes sur animal vivant par ponction échoguidée des follicules ovariens (Pieterse *et al* 1988). Cette méthode, dite OPU pour « Ovum Pick Up », est directement dérivée de celle utilisée en routine en clinique humaine.

La collecte est réalisée à l'aide d'une aiguille introduite par le vagin sur l'animal debout et sous simple tranquillisant et anesthésie locale. L'opération peut être répétée une à deux fois par semaine pendant plusieurs mois (jusqu'à cinq) sans affecter apparemment la fertilité ultérieure des animaux (Nibart et Marquant-Leguienne 1995). Cette technique présente deux avantages par rapport à la collecte d'embryons *in vivo*. Tout d'abord, elle permet de produire des blastocystes à partir de femelles considérées comme infertiles ou n'ayant pas répondu à des traite-

ments de superovulation, donc de maintenir l'ensemble du pool de gènes formé par les animaux engagés dans un programme de sélection (ou de conservation) génétique. Ensuite, elle peut être employée tout au long des trois premiers mois de la gestation (génisses ou vaches), donc ne pas interférer avec la conduite de la reproduction des animaux au sein d'un troupeau. En pratique, les sessions d'OPU sont aujourd'hui réalisées soit une fois par semaine avec des animaux superovulés, soit deux fois par semaine, sans superovulation. Dans tous les cas, le nombre d'ovocytes et donc d'embryons viables produits par collecte est très variable d'un animal à l'autre (et aussi d'une équipe à l'autre). Un bilan de la production d'embryons est présenté au tableau 4 pour des animaux de différents statuts physiologiques.

En moyenne, on peut considérer que la technologie de l'OPU permet de produire 0,7 à 2 blastocystes par session. Pour des vaches laitières en production, des sessions bihebdomadaires de prélèvement, pendant 4 mois consécutifs, permettent d'obtenir en moyenne 40 blastocystes transplantables par an, certains animaux pouvant en produire plus de 120 (Merton, communication personnelle). Les mêmes performances sont obtenues avec des femelles réputées infertiles pour lesquelles le rythme d'une collecte par semaine est étendu sur la plus grande partie de l'année (Hasler *et al* 1995). Enfin, avec des génisses collectées pendant deux mois en début de gestation, on obtient en moyenne 20 blastocystes. Ces données constituent une base pour estimer le potentiel d'une technologie encore récente, mais en plein développement (tableau 5). Avec un taux de gestation à terme de 50 %, une vache laitière donnera en moyenne 20 veaux par an, soit 5 fois plus que ne le permet la collecte *in vivo* après traitement hormonal des femelles. Une génisse pourra être la mère génétique de dix veaux avant la fin de sa première gestation. La maîtrise complète de cette technique passe

Tableau 4. Production d'embryons *in vitro* après récolte des ovocytes (OPU) ; principales données physiologiques.

Référence	Type d'animaux (n)	Sessions de prélèvement		Nombre moyen d'embryons transférables produits par femelle	
		Fréquence	Nb moyen par femelle (écarts)	par session (écarts)	total (écarts)
Hasler <i>et al</i> 1995	échecs production d'embryons	1 par semaine 8 mois par an ⁽¹⁾	22,6 (6 - 31) ⁽¹⁾ <i>in vivo</i> (n = 6)	0,73 ⁽²⁾ (0,33 - 1,86)	41,3 ⁽²⁾ (7 - 97)
Den Daas <i>et al</i> (non publié)	vaches laitières (n = 63)	2 par semaine 4 mois par an	29,9 (3 - 91)	1,33 (0,33 - 2,67)	37,4 (1 - 128)
Donnay <i>et al</i> 1996	génisses (n = 6)	2 par semaine pendant 2 mois	16	1,6	20 (8 - 35)
INRA 1997 (non publié)	génisses (n = 5)	2 par semaine pendant 1,5 mois	12	2,04 (0,5 - 3,16)	24 (6 - 37)

⁽¹⁾ Estimation.

⁽²⁾ Calcul pour une année à partir d'un travail conduit sur 2,5 ans.

Tableau 5. Estimation du nombre moyen de veaux produits par femelle donneuse et par an après récolte des ovocytes et fécondation *in vitro* (OPU/FIV) ; comparaison avec la production d'embryons *in vivo*.

Statut physiologique	OPU/FIV		Collecte <i>in vivo</i>
	Vaches en production	Génisses	Vaches/génisses
Collectes - fréquence	2 par semaine pendant 4 mois	2 par semaine pendant 2 mois	2 collectes + superovulation
- nombre total par an	32	16	2
Nombre d'embryons transférables par an	40	20	11
% de femelles donnant plus de 3 embryons	100 %	100 %	70 %
Taux moyen de gestation	50 %	50 %	56 %
Nombre de veaux attendus	20	10	4

aujourd'hui par une compréhension fine des effets à long terme que peuvent exercer les milieux de culture sur le développement du fœtus voire du jeune une fois né. En effet il a été montré récemment chez les bovins (mais aussi chez les ovins) que certaines conditions de fécondation et de culture *in vitro*, encore mal connues, pouvaient, occasionnellement, être responsables de la naissance de veaux viables mais de poids anormalement élevé (Behboodi *et al* 1995), ou même de déviations du sex-ratio en faveur des mâles (Xu *et al* 1992), ce dernier effet n'étant toutefois pas systématiquement observé (Keefer *et al* 1994, Grisard *et al* 1995).

3.2 / Coût de l'embryon produit par OPU/FIV

Les premières estimations faisaient état d'un coût du veau produit après OPU-FIV d'environ le double de celui d'un veau issu d'embryon produit *in vivo* (Nibart et Marquant-Leguienne 1995) et soulignaient l'importance du coût de main d'œuvre pour cette technique. Toutefois, une organisation en station spécialisée pour la production et l'utilisation d'embryons exclusivement produits *in vitro* permet de tirer le meilleur parti des possibilités de cette technique. Sur la base des données établies dans le cadre d'un programme mis en place depuis un an en station expérimentale (Domaine expérimental INRA de Bressonvilliers) et à raison de deux sessions d'OPU/FIV par semaine sur des séries de 5 animaux, il ressort que le prix de revient du veau issu d'OPU-FIV est seulement 1,2 fois celui du veau issu de transplantation embryonnaire classique (Y. Heyman *et al*, en préparation). Cette estimation prend en compte le coût de main d'œuvre (40 % environ du coût total), mais pas celui de l'amortissement des installations dont une utilisation optimale est obtenue en associant l'activité d'OPU-FIV à celle du clonage (voir plus loin). Le volume d'activité annuel est déterminant, et une réduction du coût de 30 à 40 % peut même être envisagée à partir d'une production régulière d'embryons tout au long de l'année en augmentant le nombre de sessions d'OPU/FIV par semaine.

3.3 / Les conséquences pour la sélection

La technique de l'OPU-FIV présente trois intérêts principaux pour la sélection. A raison de deux sessions d'OPU par semaine et d'environ 1,5 embryon transférable par session, le nombre de veaux qui peut être obtenu par unité de temps est pratiquement multiplié par 4 par rapport au nombre de veaux produits après superovulation et collecte classique. Il devient donc possible d'augmenter encore la pression de sélection sur les mères à taureaux.

Le deuxième intérêt est d'améliorer l'efficacité de la sélection même en raisonnant à niveau constant de prolificité. En effet, l'OPU-FIV permet de réaliser des « accouplements *in vitro* » et donc de mieux planifier le choix des reproducteurs mâles (à la limite ovocyte par ovocyte). On peut en particulier augmenter considérablement le nombre de mâles accouplés à une même femelle, nombre qui n'est pas très élevé en superovulation classique (égal au maximum au nombre de collectes). Ceci a pour effet d'améliorer la précision des index de sélection (meilleure « connexion » entre reproducteurs) et surtout de diminuer la parenté moyenne entre les produits de la génération suivante, ceux-ci ayant plus rarement leurs deux parents communs. De ce fait, le taux de consanguinité à long terme est diminué et avec lui le risque de voir apparaître une fixation fortuite de gènes à effets défavorables. Woolliams (1989) montre déjà, avec la superovulation classique, qu'on a tout intérêt à changer de taureau à chaque collecte.

Un troisième intérêt potentiel de l'OPU-FIV est qu'il devient possible d'obtenir des descendants des femelles qui ne répondent pas à la superovulation. On ne dispose toutefois pas encore de données suffisantes sur les performances de telles femelles pour la production d'embryons *in vitro*.

En cumulant tous les effets positifs de l'OPU-FIV pour la sélection (et en anticipant sur son intérêt potentiel), Leitch *et al* (1995) trouvent que le rythme de progrès génétique annuel avec un schéma OPU-FIV est supé-

L'association de la ponction ovocytaire *in vivo* et de la fécondation *in vitro* permettrait d'obtenir en moyenne 5 veaux par donneuse et par mois.

rieur de 10 à 30 % à celui d'un schéma avec superovulation et fécondation *in vivo*, les donneuses ayant le même âge dans les deux cas.

L'OPU-FIV permet aussi de diminuer l'âge des donneuses par rapport à la production d'embryons *in vivo* car il est possible d'effectuer des ponctions répétées d'ovocytes dès l'âge de 9 mois. Ceci pourrait être considéré comme un avantage pour la réduction de l'intervalle de génération dans un programme de sélection. Mais même en admettant que de tels ovocytes aient des probabilités de fécondation non diminués, ce qui fait encore l'objet de données contradictoires (Revel *et al* 1995, Lazzari *et al* 1996), l'effet d'un tel raccourcissement de l'intervalle de génération serait nul sur le progrès génétique annuel. En effet, les descendants naîtraient beaucoup trop tôt par rapport à la connaissance des performances de la donneuse (lactation notamment) et celle-ci serait donc insuffisamment sélectionnée, parce qu'évaluée avec une précision trop faible.

L'OPU-FIV est incontestablement une technique dont peuvent bénéficier les schémas d'amélioration génétique des reproducteurs. Il importe maintenant de définir les conditions de mise en œuvre pour son développement, notamment en ce qui concerne les normes techniques et sanitaires à respecter lors des sessions de ponction. Il reste aussi à confirmer qu'une organisation efficace d'un « atelier » de production d'embryons *in vitro* permet bien de ramener le coût du veau à celui que l'on obtient aujourd'hui en transplantation embryonnaire classique. Mais il faudra pour cela améliorer les méthodes de congélation de ces embryons, dont les taux de survie après décongélation sont aujourd'hui encore largement inférieurs à ceux des embryons produits *in vivo*.

4 / Les perspectives d'application des techniques de clonage

4.1 / Une technologie en pleine évolution

Cloner signifie reproduire à l'identique, en plusieurs exemplaires. C'est, en biologie, le contraire de la reproduction sexuée qui permet la naissance d'organismes génétiquement différents. Le clonage chez les mammifères a d'abord été réalisé par une simple division d'un embryon à un stade précoce de son développement (Willadsen 1979, Ozil *et al* 1982). Cette technique ne permet d'obtenir que deux individus génétiquement identiques, mais à une fréquence élevée puisque un embryon manipulé sur quatre, voire sur deux, donne naissance à une paire de jumeaux (Chesné *et al* 1987). La bissection de l'embryon est maintenant surtout utilisée en expérimentation animale (Romeyer *et al* 1993, McKeever *et al* 1994).

Le terme de clone est de fait employé aujourd'hui pour désigner un animal produit par la technique dite de « transfert nucléaire ». Cette technique, utilisée de longue date chez les amphibiens pour des tentatives de reprogrammation de l'activité de noyaux somatiques (Gurdon *et al* 1975, DiBerardino *et al* 1986), consiste à fusionner une cellule donneuse de noyau avec un ovocyte receveur préalablement énucléé. Les premiers succès obtenus chez les mammifères il y a une dizaine d'années avec des noyaux de jeunes embryons ovins (Willadsen 1986) puis bovins (Prather *et al* 1987) ont maintenant été étendus à plusieurs espèces (voir pour revues récentes Loi *et al* 1994, Heyman et Renard 1996). La technique de transfert de noyaux d'embryons a connu, au début des années 90 chez les bovins, un engouement commercial. Plusieurs compagnies privées ont, à cette époque, fait naître plusieurs centaines de veaux dont un clone « record » de 11 animaux. L'analyse des résultats publiés (Bondioli *et al* 1990, Willadsen *et al* 1991) montre toutefois une très grande variabilité à la fois dans le taux de développement des embryons reconstitués (0 à 40 %) et dans les taux de gestation après transfert (0 à 30 %). Ceci explique largement le relatif désintérêt qu'a connu le clonage ultérieurement en dépit des progrès de la recherche. Les annonces récentes et largement médiatisées de la naissance d'un clone de deux agneaux issus de cellules cultivées (Campbell *et al* 1996), puis d'un mouton reconstitué à partir d'un noyau issu de cellules somatiques adultes maintenues en culture pendant plusieurs semaines (Wilmut *et al* 1997) attestent bien de l'évolution en cours.

Les possibilités offertes par le clonage peuvent être estimées à partir de deux paramètres : le nombre de jeunes nés par rapport au nombre d'embryons reconstitués et la probabilité d'obtention d'un clone de taille donnée à partir d'un génotype donné. Le premier paramètre (tableau 6) mesure directement l'efficacité de la technique. Aujourd'hui, en moyenne 10 % des embryons reconstitués à partir de noyaux d'embryons peuvent donner naissance à un veau. Ce taux a été multiplié par plus de deux en quelques années et se rapproche de celui de la fécondation *in vitro* (environ 15 %, Hasler *et al* 1995). Le taux de naissance obtenu avec des noyaux de cellules cultivées est certes encore très faible (0,3 % avec des cellules adultes) ; beaucoup d'embryons reconstitués ont leur développement qui s'arrête dès le stade 8-16 cellules, au moment où leur génome devient transcriptionnellement actif. Avec ceux qui poursuivent leur développement, on observe souvent après transplantation des mortalités fœtales tardives. Toutefois, dans certaines conditions expérimentales actuellement en cours de définition, il apparaît que des noyaux issus de cellules somatiques cultivées peuvent donner un taux de blastocystes élevé (plus de 30 % à partir de cellules fœtales par exemple) ce qui révèle un pouvoir important de reprogrammation de l'activité des gènes par le cytoplasme de l'œuf. Une meilleure connaissance des évé-

Tableau 6. Potentialités de développement des embryons issus de transfert nucléaire : rendement actuel de la technique (taux de jeunes nés par embryon reconstitué).

Espèce Source de noyaux Référence	Bovin embryons 32-64c Heyman et Renard 1996	Bovin embryons 16-32c Bondioli 1993	Bovin c. embry. ⁽¹⁾ Sims et First 1993	Ovin		
				c. embry. ⁽¹⁾	c. foetale ⁽¹⁾	c. adulte ⁽¹⁾
				Wilmot <i>et al</i> 1997		
Nb d'embryons reconstitués	152	840	239	385	172	277
Nb de blastocystes obtenus (%)	47 (30,9)	161 (19,1)	42 (17,5)	126 (32,7)	47 (27,3)	29 (10,4)
Nb transplantés	45	125	34	87	40	29
Nb de jeunes nés	15 (32,6)	27 (21,6)	8 (23,5)	4 (4,6)	3 (7,5)	1 (3,4)
Rendement ⁽²⁾	10,0 %	4,1 %	4,1 %	1,5 %	2,0 %	0,3 %

⁽¹⁾ Origine des cellules cultivées.

⁽²⁾ (% blastocystes obtenus) x (% de jeunes nés).

nements fondamentaux qui président à l'organisation du noyau et contrôlent l'accès des facteurs impliqués dans l'expression des gènes reste à acquérir, notamment pour prévenir les mortalités embryonnaires élevées que l'on constate après transplantation. Il apparaît néanmoins justifié, au vu de ces résultats, de prévoir que la technique sera maîtrisée avec un succès proche de celui de l'OPU-FIV.

Les taux de multiplication après clonage diffèrent selon la source de cellules utilisées et aussi entre séries expérimentales. Le tableau 7 donne une estimation de la distribution du nombre de veaux produits par embryon donneur au stade morula (40 à 60 cellules environ) et permet donc de préciser quelle est la probabilité, aujourd'hui, d'obtenir un clone d'animaux à partir d'un génotype donné. Dans cette expérience, une partie des embryons issus de transfert de noyaux a été réutilisée pour un deuxième cycle de transfert nucléaire (reclonage), les progrès réalisés dans la maîtrise de la technique autorisant un tel recyclage (un seul toutefois) sans diminution significative du rendement (Ectors *et al* 1995, Le

Bourhis *et al* 1996). Cette approche révèle que, en moyenne, 6 embryons sur 10 seulement seraient susceptibles de donner un clone de 2 à 5 individus. Ceci suggère que les noyaux donneurs pourraient, selon leur génotype, manifester des différences d'aptitude à être (correctement) reprogrammés. Ces différences se manifestent aussi avec des cultures primaires de cellules somatiques foetales (mouton, Campbell *et al* 1996 ; vache, Vignon *et al*, données non publiées). A ce jour, ce type de noyau n'a permis que la naissance occasionnelle d'un clone de deux agneaux (Campbell *et al* 1996). Il est donc encore trop tôt pour dire si les cellules somatiques en culture, cellules foetales ou adultes, pourront effectivement permettre de multiplier tous les génotypes voulus. Cette hypothèse n'est toutefois pas déraisonnable puisque les noyaux de cellules (foetales) ovines maintenues en culture pendant plusieurs semaines se révèlent capables de conduire avec une fréquence élevée le début du développement.

Compte tenu du nombre élevé de noyaux somatiques de même génotype (au moins plu-

La production de clones par transfert de noyaux a actuellement un rendement faible. Améliorer cette technique nécessite de mieux connaître le fonctionnement des facteurs impliqués dans les relations noyau-cytoplasme et l'expression des gènes au cours du développement.

Tableau 7. Potentialités de développement des embryons issus de transfert nucléaire. Distribution du nombre de veaux nés par embryon donneur de noyaux (Y. Heyman *et al*, données non publiées).

Embryon	Nb de blastocystes transplantés	Nb de receveuses			Nb de veaux nés
		total	gestantes	mettant bas	
A	36	18	7	4	4
B	7	4	2	1	1
C	13	12	7	6	6
D	5	5	1	0	0
E	6	5	3	1	1
F	8	6	3	1	1
G	14	7	5	4	5
H	7	7	4	3	3
I	9	5	3	2	2
J	3	2	2	2	3
K	10	6	3	2	3
L	10	5	2	0	0
M	18	9	3	2	2
Total	13	146	91	45	28

Nombre moyen (± s.e.) de blastocystes transplantés par embryon donneur 11,2 ± 8,5
 Taux de mise bas après transfert d'embryons clonés 28/91 = 30,8 %
 Probabilité pour un embryon de donner un clone de 2 à 5 veaux 8/13 = 61,5 %

sieurs milliers) qui peuvent être utilisés comme source de noyaux donneurs même après une courte période de culture, on peut considérer que le rendement de 10 % obtenu aujourd'hui avec les noyaux embryonnaires (nombre de veaux nés par rapport aux nombre d'embryons reconstitués) suffirait pour que chaque génotype puisse être utilisé avec le potentiel de multiplication désiré. Le clonage de noyaux permettrait alors de diffuser un génotype déjà bien caractérisé (clonage *a posteriori*) ou nouvellement créé par transgénèse, lors de la période de culture (cellules fœtales ou embryonnaires). Seule la première perspective a été prise en compte dans cet article pour examiner les voies d'application en sélection.

L'utilisation de noyaux de cellules somatiques cultivées devrait donc à terme contribuer à diminuer le coût du clonage et permettre de fixer *a priori*, pour chaque génotype, la taille du clone puisque la source de noyau deviendrait pour chaque génotype abondante et ne serait donc plus un facteur limitant.

4.2 / Coût technique du clonage

Bien que le clonage soit encore largement une biotechnologie au stade de la recherche, il importe de commencer à estimer son coût pour anticiper sur les premiers débuts d'application. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur ce sujet et seule une extrapolation à partir du coût dans un contexte d'activité de recherche peut être envisagé. Les chiffres présentés ci-dessous s'appuient donc sur les résultats acquis avec le clonage embryonnaire depuis trois ans, dans le cadre du programme conduit dans les installations de l'INRA.

Sur la base d'une activité à temps plein organisée à partir d'un atelier de production d'embryons *in vitro* impliqué également dans un programme OPU-FIV, on peut, après deux sessions de clonage à partir de 4 embryons donneurs (sexés), reconstituer en moyenne 60 embryons qui donneront 20 blastocystes transplantés et finalement obtenir 6 veaux. En prenant en compte tous les frais de fonctionnement et ceux de main d'œuvre (à l'exception toutefois de ceux liés à l'amortissement des installations) le coût du veau produit à partir d'un transfert de noyaux est 1,8 fois celui du veau issu d'une transplantation d'embryon classique (Y. Heyman *et al*, en préparation).

4.3 / Des voies d'utilisation variées

Les applications qui vont être présentées ne sont que potentielles dans le sens où elles exigent que les techniques de base aient été suffisamment maîtrisées. Il faut pour cela au minimum garantir l'efficacité des techniques pour éviter les aléas trop importants lors de leur mise en œuvre à grande échelle. L'obtention d'une naissance pour seulement 4 à 5 embryons reconstitués nous paraît à la fois un seuil à atteindre et un objectif qui ne paraît plus aujourd'hui irréaliste. Cette condition

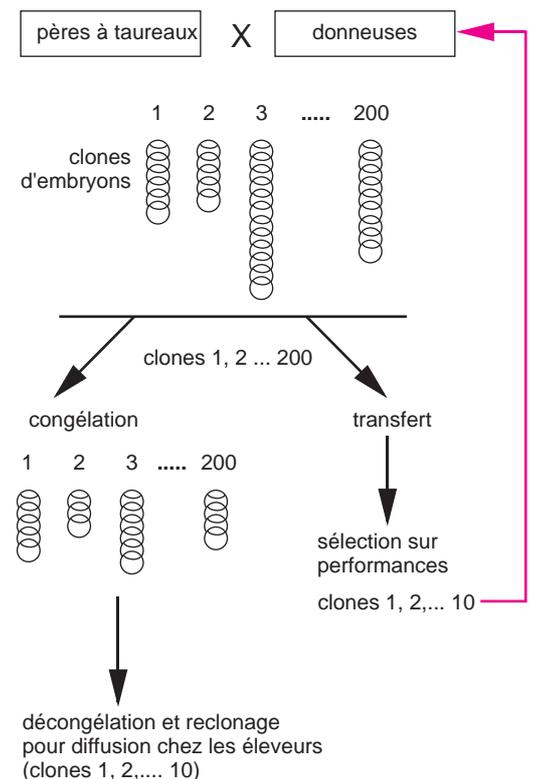
reste toutefois sévère dans le contexte scientifique et technique actuel et il importe de continuer à donner une priorité à l'acquisition de données scientifiques fondamentales visant à beaucoup mieux comprendre la biologie du développement des embryons et les mécanismes liés à la reprogrammation nucléaire. Ce préalable étant posé, nous avons tenté de dresser le bilan des bénéfices et risques liés aux applications possibles dont la liste apparaît très diversifiée.

a / Amélioration de la connaissance de la valeur génétique des reproducteurs

Exemple en production laitière (figure 3)

La transplantation embryonnaire est utilisée dans les schémas de sélection des bovins laitiers dans le cadre de l'accouplement de donneuses d'élite avec des mâles d'élite. Le clonage d'embryons femelles ainsi produits donnerait naissance à des groupes de femelles génétiquement identiques parmi lesquelles pourraient être choisies les futures donneuses destinées à assurer la poursuite du programme d'amélioration génétique. Si l'on considère la quantité de lait produite par année (coefficient d'héritabilité $h^2 = 0,25$), les calculs montrent que la précision avec laquelle pourrait être estimée la valeur génétique d'un clone de seulement 5 femelles serait la même que pour un taureau évalué d'après les lactations de 25 de ses filles. L'augmentation substantielle de la précision par rapport à celle obtenue à partir d'un animal seul est liée d'une part à la répétition des

Figure 3. Utilisation collective de clones femelles chez les bovins laitiers.



mesures de performances sur un même génotype, et d'autre part, au fait que les effets de milieu affectant les mesures sont indépendants d'un individu à l'autre quand ceux-ci sont placés dans des élevages différents.

La prise en compte de ces effets dans des calculs de simulation (Colleau 1992, De Boer *et al* 1994, J.-J. Colleau 1997, non publié) montre que le recours au clonage permet d'augmenter les progrès génétiques obtenus dans les programmes de sélection intensifs qui font déjà appel à la transplantation embryonnaire, même si le nombre total d'embryons transférés au sein de chaque programme reste inchangé (tableau 8). Dans cette simulation, seules les mères à taureaux sont clonées.

On constate que l'efficacité du clonage dépend des modalités dans lesquelles il est effectué : elle est maximale quand il est possible de faire un clonage somatique de cellules de veau de 9 mois. A ce moment en effet, la lactation de la mère est connue et l'on peut donc continuer à utiliser de jeunes mères. Quand le clonage somatique ne peut être fait que sur des cellules fœtales, la lactation en cours de la mère ne peut pas être bien connue (cela dépend en toute rigueur de l'âge du fœtus). Il devient alors nécessaire d'effectuer ce clonage un cycle de reproduction plus tard, une fois cette lactation connue, ce qui amène à allonger l'intervalle de génération et à perdre alors une grande partie de l'efficacité génétique du clonage.

Exemple en production de viande

La prise en compte dans les objectifs de sélection des bovins à viande des critères de rendement et de qualité de la carcasse, ainsi que des critères de qualité de la viande conduit normalement aujourd'hui à tester les reproducteurs mâles sur leur descendance.

Le recours au clonage permet alors d'envisager d'abattre et d'effectuer directement des mesures sur les carcasses des clones du reproducteur et non plus sur celles de ses descendants. Au total, on utilisera moins d'animaux, mais leur coût individuel de production sera plus élevé. Si on souhaite maintenir le même coût total pour l'ensemble du schéma, on devra utiliser moins de clones que de descendants du reproducteur. Mais la précision des index de sélection ne pourra être augmentée que si le coût du clonage n'est pas trop élevé, car il y aurait trop peu de clones. On peut montrer, que pour un caractère dont le coefficient d'héritabilité est égal à 0,4, la précision des index de sélection est améliorée tant que le surcoût individuel lié au clonage n'est pas supérieur à 500 %. Ceci a beaucoup de chance d'être vérifié si le coût de base (coût total d'un animal normal jusqu'à son abattage) est élevé, notamment à cause d'une durée d'engraissement importante.

b / Diffusion de génotypes d'élite bien connus

Deux situations peuvent être envisagées :

- le génotype est exprimé par un seul individu dont les performances sont connues.

Tableau 8. Impact du clonage sur le progrès génétique annuel chez les bovins laitiers par rapport à un schéma utilisant le transfert d'embryons (TE) produits par des femelles de 2 ans.

Origine des noyaux donneurs	Age des femelles donneuses	Nb de veaux par clone ⁽¹⁾	Progrès génétique annuel par rapport à un schéma avec TE
Embryons	4 ans	3	+ 5 %
		5	+ 10 %
Fibroblastes fœtaux	4 ans	3	- 3 %
		5	+ 1 %
Fibroblastes de veaux	2 ans	3	+ 21 %
		5	+ 27 %

⁽¹⁾ Chaque génotype utilisé est supposé donner un clone de taille constante.

L'objectif est de diffuser des gènes intéressants pour des caractères d'expression tardive comme ceux impliqués dans la résistance à des maladies ou dans la longévité. Le clonage envisagé est alors le clonage somatique à partir de noyaux de cellules prélevées sur l'animal adulte une fois connues ses performances ;

- le génotype est exprimé par plusieurs individus. L'objectif est d'utiliser les clones issus d'accouplements entre animaux d'élite non pour le programme de sélection, mais pour la diffusion chez les éleveurs. Dans le cadre du programme de sélection il n'est pas nécessaire de recourir au clonage somatique, et le clonage d'embryons peut suffire, mais la sélection des clones pour la diffusion doit être à la fois sévère et précise. Une fois les clones d'élite produits et leurs performances connues, une diffusion ultérieure pourra être réalisée par clonage somatique, mais on peut aussi envisager le recours au clonage embryonnaire à partir d'embryons clonés préalablement congelés (clonage de 2^e génération) dans l'attente des résultats de l'évaluation génétique.

Le niveau d'efficacité économique de la transplantation embryonnaire, en tant que technique est alors nettement amélioré (De Boer et Arendonk 1994). Le tableau 9 présente le résultat de simulations (Colleau 1993) concernant le transfert à la ferme de tels embryons. Le remplacement d'embryons ordinaires (issus du 1 % supérieur des vaches simples) par des embryons correspondant aux 10 % supérieurs des clones testés sur 5 vaches, entraîne un meilleur niveau génétique des génisses nées de transfert. La simulation génétique montre alors une augmentation très sensible (+ 64 %) des recettes liées à la transplantation embryonnaire. Dans l'hypothèse où le prix de revient de l'embryon cloné serait le même que celui de l'embryon produit *in vivo*, le bilan financier au bout de 10 ans d'une activité continue de transfert à la ferme (1 génisse née de transfert chaque année) serait négatif (- 14 %), mais toutefois bien moins que celui résultant de l'utilisation de la transplantation embryonnaire classique (- 50 %). Une réduction des prix de revient de la transplantation grâce au clonage aurait un impact important puisque une baisse de 50 %

L'utilisation du clonage permettrait d'augmenter les progrès génétiques obtenus avec les schémas de sélection utilisant déjà le transfert d'embryons.

Tableau 9. Impact économique de l'utilisation dans un troupeau de clones testés et sélectionnés. Hypothèse : chaque année une génisse est produite par transplantation embryonnaire (TE).

Année	Recettes cumulées (kF)		Coûts cumulés (kF)	
	TE classique	TE avec clones	TE classique	50 % TE classique
0	0	0	4	2
2	0	0	12	6
4	1,7	2,9	20	10
6	6,0	10,5	28	14
8	12,4	22,2	36	18
10	22,1	38,2	44	22

Exemple : bilan financier à l'année 10 → $100 \times ((\text{recettes} - \text{coût})/\text{coût})$
 TE classique → $(100 \times ((22,1 - 44)/44)) = -50 \%$
 Coût du clone = coût TE classique → $(100 \times ((38,2 - 44)/44)) = -14 \%$
 Coût du clone = 50 % coût TE classique → $(100 \times ((38,2 - 22)/22)) = +74 \%$

des coûts permettrait d'obtenir un bilan financier largement positif (+ 74 %).

c / Diffusion de clones « terminaux »

Il s'agit ici d'animaux qui ne sont pas utilisés ultérieurement pour la reproduction, mais engagés par exemple dans des systèmes de production de viande exigeant une qualité uniforme et une régularité d'approvisionnement de marchés très ciblés (système à la base des labels de production). Le testage puis la sélection de clones dans une lignée terminale à seule fin de diffusion (et non de sélection intra lignée) permettrait de satisfaire à ces exigences, en diminuant la variabilité de qualité du produit offert au consommateur (cette variabilité n'étant toutefois pas supprimée à cause de l'influence des facteurs de variation non génétiques toujours présents). Les coûts induits par ce mode de production devront alors être confrontés aux prix que les consommateurs seraient prêts à payer, une fois constatées la supériorité et la régularité de la qualité.

d / Gestion génétique

Une des objections ou inquiétudes fréquemment évoquées à propos du clonage est le risque de disparition plus rapide de la variabilité génétique. Comme mentionné précédemment, le clonage envisagé pour la création du progrès génétique à partir d'accouplements raisonnés entre animaux d'élite a peu d'effet sur la perte de gènes. Par simulation, on a montré (Colleau 1992) que cet effet défavorable, hypothétique, était largement inférieur à celui, bien réel aujourd'hui, qui résulte de l'utilisation massive d'un petit nombre de mâles d'insémination artificielle.

Pour les autres applications qui pourraient faire appel à un grand nombre de clones, des précautions devront être envisagées, et un encadrement de la technologie fixant les règles d'utilisation à large échelle des clones testés sera nécessaire, surtout si le coût de mise en œuvre technique diminue. Quelques pistes peuvent déjà être ébauchées. Un clonage limité à 50-100 exemplaires pour les ani-

maux utilisés en reproduction paraît raisonnable, alors qu'il y aurait peu d'inconvénient à dépasser cette limite pour les clones « terminaux ». Le bilan technico-économique présenté ci-dessus tient compte de cet aspect puisqu'il suppose que les clones diffusés appartiennent aux 10 % les meilleurs de la population des clones et non au tout meilleur clone, ce qui veut dire qu'il y en a plusieurs pour maintenir une diversité des génotypes d'élite. L'utilisation abusive de certains clones devrait être découragée par une législation internationale (en toute rigueur, le problème se pose déjà pour la semence). Ainsi, il ne paraît pas opportun d'ajouter au stock de semences de taureaux d'insémination celui de leurs clones plus jeunes qui seraient produits au fur et à mesure des résultats du testage. La mise en place de cet encadrement rejoindra les tentatives actuelles que mènent plusieurs organismes internationaux pour réguler une activité économique trop libérale qui ne respecte pas les ressources génétiques.

En ce qui concerne les petites populations qui suivent un programme de sauvegarde, on peut penser qu'au point de vue technique, le clonage somatique de chaque membre de la population en vue de son inévitable remplacement est la solution idéale sans perte aléatoire de gènes (à l'occasion des méioses) et tout en évitant la « mort sociale » de la population que représente sa seule conservation sous forme de gamètes ou d'embryons congelés. Cependant, cette solution risque fort d'être financièrement insupportable soit aux collectivités nationales soit aux petites collectivités d'éleveurs directement concernées.

4.4 / Clonage et expérimentation

Certains thèmes de recherches amènent à travailler sur un petit nombre d'animaux parce que le coût des mesures impliquées dans le protocole (qui s'ajoutent au coût d'entretien) est élevé. Que peut apporter le clonage dans ces conditions ?

a / Détection d'effets liés à un « traitement »

Un traitement correspond à une modalité expérimentale (niveau d'alimentation, âge, ...) dont on souhaite mesurer l'effet sur la moyenne et/ou la variabilité de caractéristiques ou performances données d'un groupe d'animaux. L'efficacité statistique de l'utilisation d'animaux clonés se mesure alors par le nombre équivalent d'animaux non clonés qui seraient nécessaires pour obtenir la même « puissance » de détection d'un effet lié au traitement. La « puissance » est une notion statistique qui correspond à la probabilité de déclarer significatif un effet quand celui-ci existe bien. Un exemple est présenté dans le tableau 10. Pour un caractère d'héritabilité élevé ($h^2 = 0,5$) pour lequel la variabilité (variance) intra traitements serait élevée et de même ordre de grandeur que la variabilité inter traitement, l'utilisation de 10 clones répliqués à 3 exemplaires (30 animaux) serait aussi efficace que

celle de $30 \times 1,78 = 53$ animaux normaux (génétiquement indépendants). Dans ce cas, le clonage peut contribuer à l'efficacité de dispositif expérimental si son coût spécifique ne représente pas plus de 78 % du coût expérimental d'un animal normal. Le même raisonnement peut être appliqué à des critères d'héritabilité faible ($h^2 = 0,1$). Il apparaît alors que l'utilisation de clones est surtout intéressante pour les caractères très hérissables (J.-J. Colleau 1995, non publié).

b / Mesure de la variabilité génétique additive

A effectifs totaux (N) constants, il est plus efficace d'estimer le coefficient d'héritabilité du caractère à partir de clones qu'à partir de groupes de demi-frères (paternels par exemple). En effet, la variance d'échantillonnage est avec les clones quatre fois plus faible qu'avec les groupes de demi-frères. Cependant, elle est encore très substantielle quand N est assez faible, ce qui est souvent le cas dans les expérimentations. Par exemple, si $h^2 = 0,5$ et $N = 100$, l'intervalle de confiance est 0,1-0,9 : ce qui est encore beaucoup trop imprécis. Il ne convient donc pas de considérer que le clonage permettrait d'obtenir des estimées fiables de paramètres génétiques de critères obtenus lors d'expérimentations très spécifiques.

5 / Synergie avec les biotechnologies de la connaissance du génome

Actuellement, la recherche mondiale en génétique est très active dans deux domaines. D'une part, la constitution de cartes génétiques balisant le génome grâce à des régions à polymorphisme élevé (marqueurs moléculaires de type microsatellite), d'autre part, la détection de gènes à effets individuels importants dits QTL (quantitative trait loci, voir l'article de D. Boichard *et al*, ce numéro). Cette détection est obtenue en étudiant les relations entre les performances et les génotypes pour des marqueurs voisins de ces QTL.

On peut donc espérer disposer à long terme de méthodes de sélection assistée par marqueurs (Colleau et Boichard 1997), pour lesquelles les biotechnologies du génome et de la reproduction bénéficieront mutuellement l'une de l'autre. La connaissance des génotypes marqueurs (et des performances des ascendants ou apparentés qui ont transmis ces marqueurs) permet d'affiner le choix des reproducteurs mâles et femelles d'élite impliqués dans les opérations de reproduction intensive (transfert embryonnaire et accouplements raisonnés). Les produits issus de ces reproducteurs peuvent être triés plus efficacement en intégrant la connaissance de leur

Tableau 10. Efficacité statistique d'un animal cloné par rapport à un animal classique pour la détection d'un effet traitement expérimental. On a fait l'hypothèse, dans cet exemple, que la variance intra-traitement était égale à la variance entre traitements.

Nb total d'animaux en expérimentation	Nb de clones	Nb de répliques par clone	$h^2 = 0,1$	$h^2 = 0,5$
30	10	3	1,04	1,78
	5	6	1,08	1,85
	1	30	1,10	1,89
60	20	3	1,08	1,90
	10	6	1,09	1,93
	2	30	1,10	1,94

$h^2 = \text{variance génétique} / \text{variance intra-traitement}$.

génomique marqueur. Inversement, les techniques de reproduction permettent de diffuser efficacement les génotypes favorables. A l'extrême, le clonage permettrait de multiplier un génotype (connu via le marquage moléculaire) correspondant à une association très rare de gènes favorables à plusieurs loci et/ou pour plusieurs caractères.

Conclusion

Les biotechnologies de l'embryon sont dans le droit prolongement de la démarche entamée lors de l'apparition de l'insémination artificielle : l'homme enrichit ses connaissances sur le fonctionnement des êtres vivants puis tente de le modifier à son profit. Ces technologies sont beaucoup plus complexes, plus exigeantes sur le plan technique et plus coûteuses que l'insémination artificielle. Cependant, elles permettent de corriger les faibles capacités reproductives des femelles de certaines espèces, notamment l'espèce bovine, ouvrant ainsi la voie à toute une série d'applications en sélection et en élevage.

Le plein épanouissement de ces potentialités nécessite encore un double effort. D'une part, les coûts afférents aux techniques devront être impérativement diminués ce qui ne pourra être réalisé qu'à partir d'une meilleure compréhension des phénomènes biologiques impliqués. Par ailleurs, il conviendra de raisonner de manière plus rigoureuse qu'actuellement le devenir à long terme des populations sélectionnées, notamment pour ne pas réduire inutilement leur variabilité génétique. Ce risque, déjà bien mis en évidence avec le développement de l'insémination artificielle, s'accroît avec l'augmentation du pouvoir de diffusion des reproducteurs qui permettent les biotechnologies. Dans ce domaine, qui met en jeu l'avenir de ressources génétiques, le laissez-faire ne pourra seul prévaloir et il importe de susciter dès maintenant une prise de conscience internationale des nouveaux enjeux mais aussi des nouveaux risques qu'il nous faudra apprendre à maîtriser.

Références bibliographiques

- Behboodi E., Anderson G.B., BonDurant R.H., Cargill S.L., Kreuzer B.R., Medrano J.F., Murray J.D., 1995. Birth of large calves that developed from *in vitro*-developed bovine embryos. *Theriogenology*, 44, 227-232.
- Boichard D., Manfredi E., 1995. Analyse génétique du taux de conception en population Holstein. *Elevage et Insémination*, 269, 1-12.
- Bondioli K.R., 1993. Nuclear transfer in cattle. *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 274-275.
- Bondioli K.R., Westhusin M.E., Looney C.R., 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33, 165-173.
- Brackett B.G., Bousquet D., Boice M.L., Donavick W.J., Evans J.F., Dressel M.A., 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27, 147-158.
- Campbell K.H.S., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I., 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380, 64-66.
- Chesné P., Colas G., Cognié Y., Guérin Y., Sevellec C., 1987. Lamb production using superovulation, embryo bisection and transfer. *Theriogenology*, 27, 751-757.
- Chupin D., 1985. Applications pratiques du transfert d'embryons chez les bovins. *Elev. Insemin.*, 206, 3-15.
- Colleau J.-J., 1985. Efficacité génétique du transfert d'embryons dans les noyaux de sélection chez les bovins laitiers. *Génet. Sél. Evol.*, 17, 499-538.
- Colleau J.-J., 1991. Using embryo sexing within closed mixed multiple ovulation and embryo transfer schemes for selection on dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 74, 3973-3984.
- Colleau J.-J., 1992. Combining use of embryo sexing and cloning within closed mixed MOETs for selection on dairy cattle. *Genet. Sél. Evol.*, 24, 345-361.
- 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., Boichard D., 1997. Combined use of reproduction and genome biotechnologies in dairy cattle breeding. Meeting of the European Association for Embryo Transfer, Lyon, 12-13 septembre 1997.
- Colleau J.-J., Elsen J.-M., 1988. Potentialities of embryo transfer for improvement of beef cattle and sheep productivity. In : R. Ortavant (ed) *Proceedings of the 3rd World Congress on sheep and beef cattle breeding*, 1, 141-157. INRA, Paris.
- Colleau J.-J., Phocas F., 1994. Introduction des caractères secondaires dans les programmes de sélection intensifs chez les bovins laitiers. *Renc. Rech. Ruminants*, 1, 253-256.
- De Boer I.J.M., Von Arenbonk J.A.M., 1994. Market share for semen and cloned embryos in dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 77, 3691-3703.
- De Boer I.J.M., Meuwissen T.M.E., Von Arendonk J.A.M., 1994. Combining the genetic and cloned response in a closed dairy nucleus scheme. *Anim. Prod.*, 59, 173-180.
- DiBerardino M.A., Orr N.H., McKinnel R.G., 1986. Feeding tadpoles cloned from *Rana erythrocyte* nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8231-8234.
- Donnay I., De Roover R., Van langendonck A., Auquier P., Bombaerts P., Kinnar T., Schuurbiens N., Dive M., Massip A., Dessy F., 1996. Production d'embryons bovins *in vitro* à partir d'ovocytes prélevés sur vaches vivantes par ponction échoguidée : premiers résultats. *Ann. Med. Vet.*, 140, 283-291.
- Ectors F., Delval A., Smith L., Touati K., Remy B., Beckers J.F., Ectors F., *et al.* 1995. Viability of cloned bovine embryos after one or two cycles of nuclear transfer and *in vitro* culture. *Theriogenology*, 44, 925-933.
- Greve T., Callesen H., Hyttel P., Hoier R., Assay R., 1995. The effect of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, 43, 11-50.
- Grisard B., Massip A., Collette L., Dessy F., 1995. The sex-ratio of bovine embryos produced *in vitro* in serum-free oviduct cell conditioned medium is not altered. *Theriogenology*, 43, 1097-1106.
- Gurdon J.B., Laskey R.A., Fischberg M., 1975. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized cells of adult frogs. *J. Embrol. Exp. Morphol.*, 34, 93-112.
- Hasler J.F., Henderson W.B., Hurtgen P.J., Jin Z.Q., McCauley A.D., Mower S.A., Neely B., Shuey L.S., Stokes J., Trimmer S.A., 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43, 141-152.
- Heyman Y., Menezo Y., 1987. Interaction of trophoblastic vesicles with bovine embryos during development *in vitro*. In : B.D. Bavister (ed), *The mammalian preimplantation embryo*, 175-191. Plenum Press Publishing.
- Heyman Y., Renard J.-P., 1996. Cloning of domestic species. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 427-436.
- Heyman Y., Chesné P., Le Bourhis D., 1996. Clonage et sexage embryonnaire. *Le Point Vétérinaire*, 28, 873-880.
- Keefe CL., Scott B., Koppang R., Paproki A.M., Betthausen J., Golueke P., Jurgella G., Matthews L., Stice S., Van Beek K., 1994. Male/female sex-ratio and survival following embryo biopsy of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 41, 225 (Abstr.).
- Lazzari G., Duchi R., Landriscina R., Colombo N., Galli C., 1996. Developmental capacity of IVM-IVF calf oocytes from ECG stimulated donors of 2-3 months of age. *J. Reprod. Fert.*, Abstract series n° 17, 41.
- Le Bourhis D., Deniau F., Renard J.-P., Heyman Y., 1996. Bovine nuclear transfer ; *in vitro* and *in vivo* development of second generation clones. *Proc. 12th AETE meeting*, Lyon, 160.
- Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., Northey D.L., First N.L., 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 36, 376-383.
- Leitch H.W., Smith C., Burnside E.B., Quinton M., 1995. Effects of female reproductive rate and mating design on genetic response and inbreeding in closed nucleus dairy herds. *Anim. Sci.*, 60, 389-400.

- Leonard M., Kirzenbaum M., Cotinot C., Chesné P., Heyman Y., Stinakre M.G., Bishop C., Delouis C., Vaiman M., Fellous M., 1987. Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA. *Theriogenology*, 27, 248.
- Lohuis M.M., 1995. Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology*, 43, 51-60.
- Loi P., Campbell K., Cappai P., Wilmut I., 1994. Proc. 1st. European Conf. on Progress in embryo technology and genetic engineering in cattle and sheep breeding, Krakow, Poland, 139-155.
- Malafosse A., 1995. L'insémination des différentes espèces animales dans le monde. Document UNCELA, Paris.
- Mauléon, P., Mariana, J.C., Benoit, M., Solari, A., Chupin D., 1970. Influence de différentes doses de PMSG et hCG, injectées en phase folliculaire du cycle œstrien sur le nombre et le rendement d'ovulations de vaches de race Française Frisonne Pie Noire. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 10, Suppl. 1, 31-46.
- McKeever D.J., Taracha E.L., Innes E.L., MacHugh N.D., Awino E., Goddeeris B.M., Morrison W.L., 1994. Adoptive transfer of immunity to *Theileria parva* in the CD8+ fraction of responding efferent lymph. *Proc. Natl. Acad. USA.*, 91, 1959-1963.
- Menezo Y., 1976. Milieu synthétique pour la survie et la maturation des gamètes et pour la culture de l'œuf fécondé. *C.R. Acad. Sci. Paris, série D*, 282, 1967-1970.
- Menezo Y., Renard, J.-P., 1991. La vie de l'œuf avant l'implantation. In : C. Thibault et M.-C. Levasseur (eds), *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, 339-357. Coéd. INRA-Ellipses, Paris.
- Meuwissen T.H.E., 1990. The use of increased female reproductive rates in doing cattle breeding schemes. *Anim. Prod.*, 52, 21-31.
- Negrao S., Nibart M., Humblot P., 1997. Negative effects of overfeeding on superovulation response and embryo production in dairy heifers. *Proceedings 13th AETE meeting, Lyon*, 186.
- Nibart M., Marquant-Leguienne B., 1995. Productions d'embryons et de veaux par OPU-FIV chez les bovins. *Elevage et insémination*, 266, 1-23.
- Nibart M., Thuard J.M., Humblot P., 1996. Le programme français du sexage des embryons bovins. *Elevage et Insémination*, 271, 10-19.
- Nicholas F.W., 1996. Genetic improvement through reproductive technology. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 205-214.
- Nicholas F.W., Smith C., 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.*, 36, 341-353.
- Ollivier L., Renard J.-P., 1995. The costs of cryopreservation of animal genetic resources. 46th Annual Meeting of EAAP. Prague 4-7 sept.
- Ozil J.-P., Heyman Y., Renard J.-P., 1982. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Rec.*, 110, 127-128.
- Pieterse M.C., Kappen K.A., Kruip Th.A.M., Taverne M.A.M., 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30, 751-762.
- Prather R.S., Sims M.M., Robl J.M., Eyestone W.H., First N.L., 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo ; assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37, 859-866.
- Renard J.-P., Heyman Y., Dumesnil du Buisson F., 1977. Unilateral and bilateral transfer of bovine embryos at the blastocyst stage. *Theriogenology*, 7, 189-194.
- Renard J.-P., Heyman Y., Ozil J.-P. 1982. Congélation de l'embryon bovin : une nouvelle méthode de décongélation pour le transfert cervical d'embryons conditionnés en paillette. *Ann. Med. Vet.*, 126, 23-32.
- Revel F., Mermillod P., Peynot N., Renard J.-P., Heyman Y., 1995. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J. Reprod. Fertil.*, 103, 115-120.
- Romeyer A., Porter R.H., Poindron P., Chesné P., Poulain N., 1993. Recognition of dizygotic and monozygotic twin lambs by ewes. *Behaviour*, 127, 119.
- Rowson L., Moor R.M., Lawton R.A.S., 1969. Fertility following egg transfer in the cow : effect of method, medium and synchronisation of estrus. *J. Reprod. Fert.*, 18, 517-523.
- Sims M., First N.L., 1993. Production of calves by nuclear transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6143-6147.
- Thibier M., Nibart M., 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology*, 43, 71-80.
- Thimonier J., Chupin D., Pelot J., 1975. Synchronization of oestrus in heifers and cyclic cows with progestagens and prostaglandins analogues alone or in combination. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 15, 437-449.
- Willadsen S.M., 1979. A method for culture of micro-manipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277, 298-300.
- Willadsen S.M., 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320, 63-65.
- Willadsen S.M., Janzen R.E., McAlister R.J., Shea B., Hamilton G., McDermid D., 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, 35, 161-170.
- Wilmut I., Schunleke E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.S., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810-813.
- Woolliams J.A., 1989. Modification to MOET nucleus breeding schemes to improve rates of genetic progress and decrease rates of inbreeding in dairy cattle. *Anim. Prod.*, 49, 1-14.
- Xu K.P., Yadav B.R., King W.A., Betteridge K.J., 1992. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 31, 249-252.

Abstract

Reproduction biotechnologies in cattle and real or potential implementation for selection.

This paper reminds the basis of several biotechnologies or reproduction in cattle : superovulation and embryo transfer, embryo sexing, ovum pick-up and *in vitro* fertilisation, embryo or somatic cloning. Their current technical limitation are described in addition to improvement prospects and respective costs. Consequences of using these technologies in animal breeding programmes are

detailed for the current situation and for the future. Embryo transfer turns out to be efficient and profitable. The most interesting prospects for the long term are given by cloning if technical handles can be circumvented.

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.