

Taux de gestation et de vêlages après clonage somatique chez les bovins, incidence des anomalies fœtales et placentaires

P. CHAVATTE-PALMER (1,2), Y. HEYMAN (1), C. RICHARD (3), J.P. RENARD (1)

(1) INRA, Biologie du Développement et Biotechnologies, 78352 Jouy en Josas cedex

(2) INA P-G, Dépt. des Sciences Animales, 75231 Paris

(3) INRA, Unité Expérimentale de Bressonvilliers 91630 Leudeville

RÉSUMÉ. - Il est maintenant établi qu'une descendance normale et fertile peut être produite par transfert nucléaire (TN) de cellules somatiques dans des ovocytes énucléés. Cependant, une caractéristique du TN est la forte fréquence de mortalité embryonnaire en début de gestation et pendant les périodes fœtale tardive et périnatale. La majorité des pertes sont observées pendant le premier tiers de gestation. Cependant, un syndrome plus distinct, appelé communément le syndrome du gros veau ou « Large Offspring Syndrome » (LOS), a été décrit pendant la gestation tardive et provoque une importante mortalité fœtale et néonatale. Ce syndrome a aussi été décrit chez les animaux issus du transfert d'embryons produits par fécondation et développement précoce in vitro. Enfin, les gestations prolongées sont courantes et les nouveaux nés vivants présentent souvent un syndrome de détresse respiratoire et plusieurs types d'anomalies qui peuvent empêcher leur survie. Cet article détaille les pertes dues à ce syndrome dans notre laboratoire et les lésions les plus fréquemment rencontrées.

Pregnancy rate and calving after somatic cloning in cattle, incidence of fetal and placental anomalies

P. CHAVATTE-PALMER (1,2), Y. HEYMAN (1), C. RICHARD (3), J.P. RENARD (1)

(1) INRA, Biologie du Développement et Biotechnologies, 78352 Jouy en Josas cedex

(2) INA P-G, Dépt. des Sciences Animales 75231 Paris

(3) INRA, Unité Expérimentale de Bressonvilliers 91630 Leudeville

SUMMARY. - It has now been established that normal fertile offspring could be produced with nuclear transfer (NT) of somatic cells into enucleated oocytes. A striking feature of NT, however, is the high incidence of gestational losses in early pregnancy and in the late fetal and perinatal periods. The majority of losses are observed in the first third of pregnancy but a distinct syndrome, commonly called the « Large Offspring Syndrome » (LOS), has been described in late gestation and causes important perinatal deaths. This syndrome has also been described in animals produced by in vitro fertilisation and early embryonic development. Finally, prolonged gestations are common and live offspring occasionally exhibit a respiratory distress syndrome and several types of abnormalities that may hinder their survival. This paper reviews the laboratory's incidence of LOS in somatic and embryonic cloning.

INTRODUCTION

Il est maintenant établi qu'une descendance normale et fertile peut être produite par transfert nucléaire (TN) de cellules somatiques chez les bovins [1-4]. Cependant, une caractéristique frappante du TN est la forte fréquence de mortalité embryonnaire en début de gestation et pendant les périodes fœtale tardive et périnatale [5]. Chez la vache, la majorité des pertes sont observées pendant le premier tiers de gestation. Plus tardivement, les pertes durant la gestation et en période néonatale sont associées à des anomalies fœtales et placentaires répondant au terme de « syndrome du gros veau ». Ce syndrome a aussi été décrit, avec une incidence et une gravité moindres, chez les animaux produits par fécondation *in vitro* (FIV) [6-7].

Cette étude compare d'une part les taux de gestation, de pertes fœtales et de naissances chez des veaux issus d'insémination artificielle (IA), de fécondation *in vitro* (FIV), et de clonage à partir de cellules embryonnaires (clones embryonnaires) ou somatiques fœtales ou adultes (clones fœtaux, clones adultes) issus du même laboratoire et transférés dans le même groupe de receveuses sur la même ferme. De plus, les anomalies les plus fréquemment rencontrées sont décrites.

ANIMAUX, MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'expérimentation se déroule sur 3 années, de mai 1998 à mai 2000. Quatre groupes d'embryons bovins de race Holstein (blastocystes à Jour 7 de qualité et de morphologie égale : qualité 1) sont transférés par transfert simple dans des génisses charolaises et salers receveuses (N=333, charolaises et salers réparties sur tous les groupes) exemptes de toute pathologie reproductive connue (tests sérologiques répétés) après synchronisation des chaleurs. Tous les embryons ont été transférés en frais sans étape de congélation.

Les 4 groupes sont les suivants :

- Groupe 1 Embryons produits *in vivo* par superovulation N = 82
- Groupe 2 Embryons issus de Fécondation *in vitro* (FIV) N = 39

Groupe 3

Embryons issus de clonage embryonnaire
N = 67

Groupe 4

Embryons issus de clonage somatique
N = 145

Les receveuses sont entretenues dans des conditions identiques sur la ferme expérimentale de l'INRA à Bressonvilliers. Le premier diagnostic de gestation est effectué par dosage de la progestérone 21 jours après l'ovulation puis confirmé par échographie à 35 jours. Le dernier diagnostic de gestation par voie rectale est effectué à 90 jours de gestation. Après 120 jours de gestation, les animaux porteurs de clones somatiques sont examinés par échographie transabdominale tous les 15 jours jusqu'à terme pour détecter d'éventuelles anomalies fœtales et/ou placentaires. Un nombre égal d'animaux contemporains du groupe 2 est utilisé comme groupe témoin. En cas d'anomalie grave ne permettant pas à l'animal de poursuivre sa gestation à terme, la génisse est abattue et le fœtus et son placenta autopsiés. Les animaux arrivés à terme peuvent vêler normalement. Si les animaux du groupe 4 n'ont toujours pas vêlé à terme (terme calculé à partir de la moyenne du troupeau de receveuses), une césarienne est effectuée 24 heures après induction pharmacologique du vêlage avec de la dexaméthasone.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus pour le développement embryonnaire et fœtal *in vivo* sont décrits dans le Tableau 1. Après 120 jours, aucune anomalie n'a été détectée dans les groupes 1, 2 et 3, mais 12 gestations anormales ont été détectées par échographie transabdominale chez les clones somatiques (groupe 4). Deux vaches ont avorté, 8 ont été réformées avant avortement pour récupérer le fœtus (152 à 245 jours de gestation) et deux ont continué jusqu'à terme mais leur veau est mort dans les minutes qui ont suivi la naissance. Les autres veaux ont survécu au moins pendant 24 heures et 10 sont actuellement encore vivants.

L'examen post-mortem des vaches abattues durant la gestation a permis de constater la présence d'un hydrallantois, déjà

Tableau 1
Développement *in vivo* après le transfert d'embryons produits *in vivo* (Groupe 1) ou *in vitro* (Groupes 2 à 4).

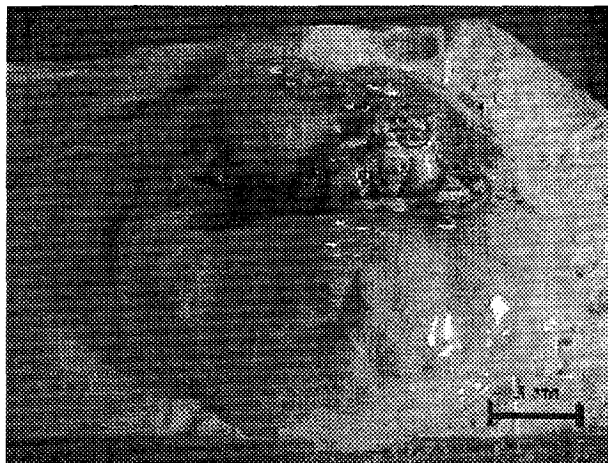
	GROUPE			
	1	2	3	4
Nb. de receveuses	82	39	67	145
Diagnostic de gestation à 21 jours*	67,0% (55)	61,5% (24)	62,7% (42)	54,5% (79)
Diagnostic de gestation à 35 jours**	60,9% (50)	51,3% (20)	49,2% (33)	31,7% (46)
Diagnostic de gestation à 90 jours**	59,7% (49)	43,6% (17)	34,3% (23)	15,9% (23)
Mise-bas	53,6% (44)	43,6% (17)	32,8% (22)	8,9% (13)
Durée de gestation moyenne (écart-type)	279,8 (5,1)	285,6 (4,7) ¹	281,9 (4,8)	279,0*** (5,7)
Poids moyen des veaux à terme (écart-type)	41,0 (4,9)	47,0 (6,2)	42,5 (7,7)	51,8 (6,58)

Le diagnostic des gestations est exprimé en % d'animaux gestants. Le nombre entre parenthèse correspond au nombre d'animaux.

* diagnostic hormonal (progestérone); ** : diagnostic par échographie, *** animaux ayant subi une césarienne systématique à terme

détecté par échographie, dans tous les cas. Les cotylédons étaient œdémateux (Figure 1) et leur poids moyen total élevé par rapport à la normale : $29,8 \% \pm 11,6 \%$ du poids du veau entre 185 et 245 jours de gestation, $N=7$ (min : 23 %, max : 47 %) alors que le poids moyen du placenta chez un animal normal à 232 jours de gestation est de 23,2 % du poids du veau [8].

Figure 1
Cotylédon œdémateux typique des anomalies dues au clonage.



A l'autopsie, un liquide d'ascite fibrineux et jaune était présent dans la cavité abdominale dans la majorité des cas et le rapport entre le poids des organes et le poids corporel était en général plus élevé que la normale pour les reins et le cœur et plus petit pour les poumons et la rate (Tableau 2). De plus, la présence d'un omphalocoele était constante.

Une telle croissance asynchrone des organes a été rapportée pour le syndrome du gros veau chez la vache et le mouton : le foie et le cœur étaient gros mais les autres organes apparaissaient normaux comparés aux fœtus contrôles [6-9].

Chez l'homme, la surexpression d'IGF2 par la perte de l'empreinte entraîne un syndrome d'excès de développement (Syn-

drome de Beckwith-Wiedemann) caractérisé par une grande taille à la naissance, une surcroissance des organes, notamment une macroglossie causant un polyhydramnios, et une augmentation de la fréquence de tumeurs pendant l'enfance. La mutation de gènes soumis à l'empreinte parentale comme IGF2, H19, IGF2R et Glypican3 a aussi été associée à des syndromes de surcroissance chez la souris et l'homme [10-11]. Les études se poursuivent dans notre laboratoire pour établir si les symptômes constatés correspondent effectivement à une perturbation du mécanisme de l'empreinte.

En conclusion, il faut souligner que la plupart des syndromes décrits précédemment (comme l'hydrallantoïde, l'hydramnios) peuvent se produire dans une population normale, mais que la fréquence de ces maladies est augmentée par les techniques de production d'embryons *in vitro* et en particulier la culture en présence de sérum. Un effet clair du milieu de développement *in vitro* est donc présent. De ce point de vue, et bien qu'il ait été prouvé que le clonage somatique peut être utilisé pour produire une descendance normale, il peut aussi être utilisé comme un outil bien adapté pour générer des dysfonctionnements physiologiques liés au syndrome du gros veau.

- (1) Cibelli, J.B. *et al.*, 1998. Science. 280 : p. 1256-1258.
- (2) Vignon, X., *et al.*, 1998. C. R. Acad. Sci. Paris. 321 : p. 735-745.
- (3) Wells, D.N. *et al.*, 1998. Reprod. Fertil. Dev. 10 : p. 369-378.
- (4) Kato, Y. *et al.*, 1998. Science. 282 : p. 2095-2098.
- (5) Hill, J.R. *et al.*, 1999. Theriogenology. 51 (8) : p. 1451-1466.
- (6) Kruij, T.A.M. and J.H.G. den Daas, 1997. Theriogenology. 278 : p. 2130-2133.
- (7) Walker, S.K., K.M. Hartwich and R.F. Seamark, 1996. Theriogenology. 45 : p. 111-120.
- (8) Ferrel, C.L., 1990. J. Anim. Sci. 69 : p. 1945-1953.
- (9) Farin, P.W. and C.E. Farin, 1995. Biol. Reprod. 52 : p. 676-682.
- (10) Young, L.E., K.D. Sinclair and I. Wilmut, 1998. Rev. Reprod. 3 : p. 155-163.
- (11) Efstratiadis, A., 1998. Int. J. Dev. Biol. 42: p. 955-976.

Tableau 2
Poids relatif des organes par rapport au poids du fœtus (%) entre 180 et 245 jours de gestation chez les clones et valeurs de référence chez des animaux normaux à 232 j de gestation [8].

Organe	Poids relatif des organes chez les clones			Références chez des veaux normaux [8]
	Moyenne	E cart-type	N	
Reins	1,30	0,78	8	0,68
Foie	3,63	0,71	8	3,5
Rate	0,23	0,06	6	0,35
Poumons	1,60	0,80	8	2,1
Cœur	0,93	0,28	8	0,63