

## **Le clonage somatique chez les bovins : Situation actuelle et premier bilan**

*P. CHAVATTE-PALMER (1), X. VIGNON (1), Y. HEYMAN (1), C. RICHARD (2), D. REMY (3), J-P. MIALOT (3), J-P. RENARD (1)*  
*(1) UMR INRA / ENVA 1198, Biologie du Développement et Reproduction, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas cedex*

*(2) INRA, UCEA de Bressonvilliers, 91630 Leudeville*

*(3) UMR INRA / ENVA 1198, Biologie du Développement et Reproduction, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Av. du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort cedex*

**RESUME** - Le clonage somatique chez les bovins est une biotechnologie qui s'est rapidement développée après la naissance de la brebis Dolly en 1997. Malgré une certaine amélioration de l'efficacité de la culture des embryons clonés, l'efficacité globale de la technique reste faible en raison des pertes importantes durant la gestation et en période postnatale. Si certaines différences physiologiques entre clones et témoins apparaissent sur de jeunes animaux de moins de 2 mois, les premières études publiées sur les animaux clonés adultes montrent que ceux-ci ont une croissance et une production laitière normales et qu'ils se reproduisent normalement. Cependant, deux études font état d'une mortalité un peu plus importante chez les clones sur un nombre limité d'animaux d'âge adulte. Des travaux sont en cours pour étudier les possibles causes de ces observations. Le clonage bovin reste une technique prometteuse pour sauvegarder et / ou multiplier des animaux de génotype rare, en particulier en association avec la transgénèse. Son développement futur dépendra certainement de l'amélioration de l'efficacité de la technique, de la diminution de son coût et de son acceptation éthique et sociale.

## **Somatic cloning in cattle: Current status and first assessment**

*P. CHAVATTE-PALMER (1), X. VIGNON (1), Y. HEYMAN (1), C. RICHARD (2), D. REMY (3), J-P. MIALOT (3), J-P. RENARD (1)*  
*(1) UMR INRA / ENVA 1198, Biologie du Développement et Reproduction, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas cedex*

**SUMMARY** - Somatic cloning in the bovine species developed rapidly after the birth of Dolly the cloned ewe. Although the efficacy of somatic clone embryo culture has definitely improved, general efficacy is still hampered by high embryonic, fetal and perinatal losses. Although some physiological differences have been observed between clones and controls in the first 2 months after birth, thereafter the first published studies report normal growth, dairy production and reproductive function. Two groups, however, have observed an increased mortality rate in a limited number of adult clones compared to controls. More work is being performed to explore the possible causes of these observations. Nevertheless, bovine somatic cloning remains a promising technique to save and / or multiply animals of rare genotype, especially in association with transgenesis. In the long run, the future development of nuclear transfer will depend on the improvement of the effectiveness of the technique, the reduction of costs and ethical and social acceptance.

## INTRODUCTION

Le clonage somatique est une technique qui permet, à partir d'une cellule différenciée d'un individu, de reconstituer un embryon ayant le même patrimoine génétique nucléaire pour faire naître un clone de l'individu initial. Cette technique est apparue possible chez les ovins en 1997 avec la naissance de la brebis Dolly (Wilmut *et al.*, 1997) puis elle a rapidement été développée dans le monde entier chez les bovins (Cibelli *et al.*, 1998 ; Kato *et al.*, 1998 ; Vignon *et al.*, 1998 ; Wells *et al.*, 1998). Depuis, de nombreuses espèces domestiques ont fait l'objet de clonage somatique, mais l'espèce bovine est de loin la plus utilisée. La méthode "classique" utilisée chez cette espèce est la fusion d'une cellule somatique (fibroblaste de la peau, cellule du cumulus...) avec un ovocyte mûré *in vitro* et préalablement énucléé par micromanipulation, mais de nombreuses techniques ont été mises au point, qui varient selon les laboratoires (Edwards *et al.*, 2003). Les zygotes ainsi formés sont cultivés *in vitro* selon les techniques classiques de production d'embryons bovins jusqu'au stade blastocyste puis transférés dans des génisses receveuses. Malgré l'efficacité limitée du procédé, la possibilité de cultiver *in vitro* des cellules somatiques donneuses, de les congeler et de les multiplier indéfiniment ouvre de nombreuses perspectives quant à la conservation et à l'utilisation de génotypes intéressants.

### 1. EFFICACITE GLOBALE

L'efficacité globale du clonage reste très variable et en général faible dans toutes les espèces. L'efficacité globale moyenne (animaux nés / zygotes reconstitués) est de l'ordre de 2 % mais peut atteindre 10 % avec certains génotypes. Elle varie selon les laboratoires et surtout l'origine génétique des lignées cellulaires.

#### 1.1. PRODUCTION D'EMBRYONS CLONES *IN VITRO*

Le pourcentage de blastocystes de grade 1 ou 2 obtenus après fusion est très variable (entre < 5 % et 30-40 %) selon le génotype de la cellule donneuse et le nombre de cycles cellulaires effectués par les cellules donneuses en culture (Heyman *et al.*, 2002b). La technique utilisée pour réaliser le clonage et le stade du cycle cellulaire de la cellule donneuse de noyau semblent avoir moins d'influence sur le taux de développement.

#### 1.2. DEVELOPPEMENT *IN UTERO*

Le développement *in vivo* après transfert *in utero* au stade blastocyste est caractérisé par des pertes embryonnaires importantes durant le premier trimestre puis des pertes tardives associées à une pathologie spécifique, le syndrome du gros veau (Young *et al.*, 1998). Le pourcentage moyen d'embryons clonés issus de cellules somatiques transférés qui parviennent à terme est en général inférieur à 20 %, avec de grandes variations selon les génotypes (Heyman *et al.*, 2002a ; Heyman *et al.*, 2002b ; Faber *et al.*, 2004). Le pourcentage de développement durant la gestation chez des clones et des témoins produits *in vitro* est décrit dans le tableau 1.

**Tableau 1** : développement *in vivo* des gestations de clones et de témoins FIV produits dans les mêmes conditions (Heyman *et al.*, 2002a) (Différence significative entre les deux groupes à partir de J35, P < 0,05 ou 0,01)

Embryons transférés	% receveuses gestantes	
	Clones somatiques adultes	Témoins FIV
Nb. receveuses	133	51
Test à la progestérone à J 21	55,6 %	62,7 %
Echographie J 35	33,8 %	52,9 %
Echographie J 50	27,1 %	50,9 %
Echographie J 70	14,3 %	49,0 %
Echographie J 70	12,0 %	47,0 %
Vélages	6,8 %	47,0 %

#### 1.2.1. Développement durant le premier trimestre

Durant le premier trimestre, les pertes embryonnaires précoces après un premier diagnostic de gestation par dosage de la progestérone à 21 jours avoisinent 30 % des gestations établies. Un retard dans le développement placentaire et fœtal a été constaté à ce stade par certains auteurs chez les fœtus bovins et ovins clonés avec un faible développement des placentomes (Hill *et al.*, 2000 ; De Sousa *et al.*, 2001), alors que d'autres notent déjà avant 90 jours un excès de poids des membranes fœtales (Hiendleder *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2004). Dans notre laboratoire, la taille des placentomes et du fœtus mesurée par échographie à 35, 50 et 63 jours est plus réduite chez les clones somatiques que chez les témoins (Laignre *et al.*, 2004) alors qu'une équipe américaine ne rapporte pas de différence entre clones et témoins (Pace *et al.*, 2002). Des différences de phénotype ou de traitement *in vitro* lors du clonage ou de la culture embryonnaire peuvent peut-être expliquer ces différences malgré une grande variabilité des observations dans une même lignée cellulaire (Lee *et al.*, 2004). De plus, des anomalies de présentation du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC1) au niveau du placenta ont été démontrées et elles pourraient aussi être à l'origine de ces pertes précoces (Hill *et al.*, 2002b).

#### 1.2.2. Syndrome du gros veau

Durant le deuxième et surtout le troisième trimestre de la gestation, une pathologie particulière appelée Syndrome du gros veau ou "*Large Offspring Syndrome*" atteint près de la moitié des gestations de clones somatiques chez les bovins. Cette pathologie est caractérisée par un développement placentaire anormal avec un excès de taille et de poids des placentomes et des caroncules et un hydroallantois et / ou un hydroamnios. Le fœtus, de grande taille et de poids élevé pour son temps de gestation, présente aussi des anomalies de développement de certains organes qui sont hypertrophiés et anormaux : stéatose du foie, hydronéphrose, cardiomégalie, macroglossie et vaisseaux ombilicaux dilatés ont été observés par de nombreuses équipes (Hill *et al.*, 1999 ; Chavatte-Palmer *et al.*, 2002a ; Hill *et al.*, 2002a ; Tsunoda *et al.*, 2002 ; Rhind *et al.*, 2003). Si le syndrome du gros veau est particulièrement sévère et concerne de nombreuses gestations en cas de clonage somatique, il affecte aussi, dans

une moindre mesure, les animaux issus de clonage à partir de cellules embryonnaires et ceux issus de fécondation *in vitro* (Behboodi *et al.*, 1995 ; van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 2000 ; Bertolini *et al.*, 2002). Les clones issus de cellules somatiques prélevées sur un animal déjà né sont aussi plus atteints que ceux issus de cellules fœtales (Heyman *et al.*, 2002a). L'utilisation de milieux à teneur réduite en sérum de veau fœtal et la limitation de la coculture des embryons ont permis de réduire considérablement l'occurrence de cette pathologie pour la production de veaux issus de fécondation *in vitro* (van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 2000). En revanche, l'origine de ces anomalies chez les clones reste encore mystérieuse, bien que de sérieuses pistes orientent vers une origine épigénétique.

Des anomalies ont été décrites dans le remodelage de la chromatine lors du clonage, induisant un patron de méthylation aberrant chez l'embryon (pas ou peu de déméthylation aux premiers stades du développement chez les clones à l'inverse des témoins, anomalies de reméthylation par la suite) (Kang *et al.*, 2002 ; Cezar *et al.*, 2003). Des perturbations des gènes soumis à l'empreinte parentale qui sont pour la plupart impliqués dans la croissance fœtale et placentaire chez la souris ont également été rapportées (Bourc'his *et al.*, 2001 ; Dean *et al.*, 2001 ; Kang *et al.*, 2002 ; Hiendleder *et al.*, 2004). Chez le fœtus bovin cloné, une concentration élevée du facteur de croissance IGF1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) a été observée, en association avec une masse placentaire plus importante (Ravelich *et al.*, 2004), confirmant des perturbations des facteurs de croissance chez ces animaux.

### 1.3. DEVELOPPEMENT POST-NATAL

Le syndrome du gros veau est responsable de la mortalité importante (environ 30 %) des veaux clonés dans la période périnatale. Par la suite, la mortalité des clones, bien que limitée, reste plus importante que celle de témoins contemporains, comme le montre le tableau 2. En Nouvelle-Zélande dans l'équipe de AgResearch, 988 embryons issus de clonage somatique bovin ont été transférés, 133 sont nés (soit 13 % de succès) et seulement 67 % d'entre eux étaient encore vivants à 3 mois (Wells *et al.*, 2004).

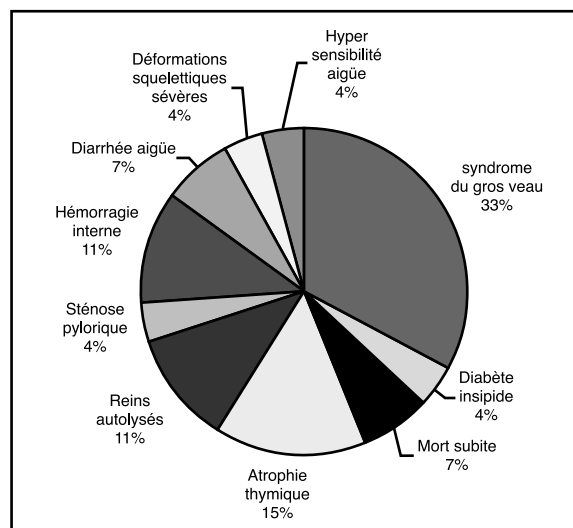
**Tableau 2** : taux de survie des clones bovins issus de cellules somatiques adultes nés à l'INRA entre 1998 et fin août 2004.

Age	/ total nés	% survie	
		clones	témoins
Naissance	64 / 65	98,4 %	100 %
24 heures	64 / 65	98,4 %	100 %
48 heures	52 / 65	80,0 %	100 %
1 semaine	50 / 65	76,9 %	100 %
1 mois	45 / 64*	70,3 %	100 %
2 mois	41 / 61*	67,2 %	100 %
6 mois	39 / 60*	65,0 %	95 %
Adultes > 18 mois	34 / 58*	58,6 %	95 %

Le nombre total pris en compte est réduit car certains animaux n'ont pas encore atteint l'âge précisé dans la ligne

Les pathologies rencontrées chez les clones sont très variées dans un même laboratoire, comme l'indique la figure 1, mais aussi entre laboratoires. On retrouve cependant fréquemment des infections, des anomalies cardiaques et rénales et des morts subites sans diagnostic établi (Hill *et al.*, 1999 ; Chavatte-Palmer *et al.*, 2004a ; Wells *et al.*, 2004). Dans notre laboratoire, les atrophies thymiques sont responsables de 16 % de la mortalité et au Japon, 10 % d'atrophie thymique a été rapporté, ce qui indiquerait une déficience immunitaire liée au clonage (Chavatte-Palmer *et al.*, 2002b ; Kubo 2002).

**Figure 1** : causes de mortalités des clones bovins nés à l'INRA entre 1998 et juillet 2004.



Les veaux apparemment normaux montrent cependant quelques différences d'avec leurs témoins contemporains avec des épisodes d'hyperthermie paradoxale, des concentrations plasmatiques élevées en leptine et réduites en tétra-iodothyronine (T4) et une relative anémie (bien que les valeurs restent dans une fourchette normale) (Chavatte-Palmer *et al.*, 2002b ; Chavatte-Palmer *et al.*, 2004b). Après environ 3 mois, ces différences se sont estompées.

## 2. CARACTERISTIQUES DES ANIMAUX ADULTES

Si on a vu que la mortalité était importante chez les jeunes animaux clonés, il reste cependant des animaux d'apparence physiologique normale. Il est important, pour l'utilisation ultérieure de la technique à des fins commerciales, de savoir si ces animaux sont normaux et d'évaluer la qualité de leurs produits : lait, viande mais aussi descendance. La FDA (*Food and Drug Administration*) ainsi que tous les autres organismes garantissant la santé alimentaire doivent donc s'intéresser aux risques potentiellement associés à la consommation de produits issus de clones ou surtout de descendants de clones car ce sont surtout eux qui sont susceptibles d'être consommés. L'étendue de l'investigation nécessaire reste sujette à débat (Rudenko *et al.*, 2004). En France, l'INRA a imposé depuis 1999 un moratoire sur les animaux clonés et leurs produits, mais il existe un vide juridique à propos de ces animaux et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) devra un jour statuer dans notre pays.

### 2.1. CROISSANCE ET SANTE DES CLONES

Les données sur la santé des bovins adultes clonés sont encore limitées étant donné le faible nombre d'animaux présents et le coût de ces investigations. A l'INRA, un projet d'envergure est en cours de réalisation sur la qualité des produits de clones, englobant des considérations zootechniques (croissance, fertilité, indice de consommation), de santé (clinique, réponse immunitaire des clones), de qualité organoleptique et sanitaire des produits (lait et viande) ainsi que l'étude de l'intégration possible de séquences rétrovirales dans le matériel génétique.

#### 2.1.1. Paramètres zootechniques

Les premières études zootechniques sur des bovins clonés présentent souvent le défaut de ne pas comporter de témoins contemporains de même race, même potentiel génétique et élevés dans les mêmes conditions.

Si certains rapportent une puberté retardée chez les clones (Enright *et al.*, 2002), le comportement de puberté est normal (Savage *et al.*, 2003), les animaux sont fertiles en insémination artificielle et en fécondation *in vitro* et les anomalies de gestation présentes lors de la gestation des fœtus clonés ne sont pas reproduites (Lanza *et al.*, 2001 ; Heyman *et al.*, 2004 ; Wells *et al.*, 2004). Ces observations sont confirmées par des observations chez la souris (Tamashiro *et al.*, 2000).

En dépit de la variabilité des poids à la naissance, la croissance apparaît normale (Pace *et al.*, 2002 ; Heyman *et al.*, 2004 ; Wells *et al.*, 2004) (tableau 3), en accord avec les

prévisions génétiques et, contrairement à la souris, aucun cas d'obésité n'a encore été rapporté chez les clones. De plus, les concentrations plasmatiques en hormone de croissance (GH) et la réponse à la stimulation par l'hormone hypothalamique GHRH sont normales (Govoni *et al.*, 2002).

**Tableau 3** : gain moyen quotidien (GMQ) en grammes chez 3 groupes de clones génétiquement identiques et 2 groupes témoins de même race élevés dans les mêmes conditions à l'INRA (Heyman *et al.*, 2004).

Groupe	Clone A	Témoin 1	Clone B	Clone C	Témoin 2
Nombre	N=8	N=10	N=6	N=9	N=10
Age	12 mois	12 mois	15 mois	15 mois	15 mois
GMQ	0,701 ±0,064	0,804 ±0,113	0,782 ±0,041	0,711 ±0,061	0,766 ±0,089

#### 2.1.2. Santé des clones

Les causes de mortalité chez les clones adultes sont encore peu documentées. Une étude clinique portant sur 24 clones et incluant l'étude des paramètres biochimiques classiques et un typage lymphocytaire succinct a conclu que ces animaux étaient en bonne santé et normaux (Lanza *et al.*, 2001). Sur 9 clones et 9 témoins en Nouvelle-Zélande, aucune différence n'a été constatée à 2 ans entre clones et témoins sur la base de bilans sanguins et d'apparitions de phénomènes pathologiques (Wells *et al.*, 2004). Dans l'étude en cours à l'INRA, les résultats préliminaires ne montrent pas de différences significatives à l'âge adulte sur les animaux vivants. Cependant, ces résultats n'expliquent pas la mortalité un peu plus importante chez les clones et ils n'excluent pas la possibilité d'une sensibilité augmentée vis à vis de stress extérieurs. Des études approfondies sur l'état immunitaire et les hormones du stress chez les clones sont en cours à l'INRA pour explorer cette hypothèse.

#### 2.1.3. Autres aspects

La presse a beaucoup parlé du possible vieillissement prématuré de la brebis Dolly et de ses télomères trop courts. Jusqu'à maintenant, il n'y a aucune raison de penser que les clones bovins vieillissent prématurément, mais aucun n'a encore atteint un âge canonique. La brebis Dolly est morte suite à une infection qui a atteint tout le troupeau et non pas en raison d'un hypothétique vieillissement prématuré (Rhind *et al.*, 2004). De plus, une étude montre que les télomères ne sont pas plus courts sur les bovins clonés (Tian *et al.*, 2000) et que leur longueur dépend du type de cellule donneuse (Miyashita *et al.*, 2002). Chez les ovins, ils seraient effectivement plus courts mais cette anomalie ne serait pas transmise à la descendance (Alexander *et al.*, 2004).

## 2.2. QUALITE DES PRODUITS ISSUS DE CLONES

### 2.2.1. Viande et lait

La composition et la valeur nutritionnelle de la viande et du lait des clones font l'objet d'études sur tous les continents. Les premiers résultats publiés sur le lait semblent indiquer que la quantité produite correspond aux attentes génétiques chez les clones somatiques (Heyman *et al.*, 2004) et embryonnaires (Norman *et al.*, 2004) et la composition paraît identique à la composition attendue sur un nombre limité d'animaux (Wells *et al.*, 2004).

Pour la viande, les premiers résultats obtenus à l'INRA sont présentés dans ce volume par V. Berthelot. Les caractéristiques de la viande de clones en terme de composition d'acides gras sont dans les normes pour la race Holstein, comme cela a aussi été décrit par d'autres sur un nombre très limité d'animaux (Takahashi *et al.*, 2004)

La valeur nutritionnelle du lait et de la viande a été évaluée sur des lots de rats Wistar nourris avec un régime à base de lait ou de viande de clone sur une période de 3 semaines. Aucun effet de l'ingestion de produits issus de clones n'a été constaté, tant sur la prise de poids des rats, leur composition corporelle, leur santé (la production d'immunoglobulines E témoignant des allergies a aussi été testée) (Tomé *et al.*, 2004).

### 2.2.2. Descendance

L'information sur les descendants de clones bovins est actuellement très limitée mais tous les laboratoires ayant fait reproduire les clones s'accordent pour dire que les pathologies constatées chez les clones en début de vie ne sont pas reproduites dans la deuxième génération. Ces résultats ne sont pas surprenants. En effet, si la plupart des anomalies constatées chez les clones sont d'origine épigénétique, ces anomalies devraient être logiquement éliminées lors de rétablissement normal de l'empreinte génétique dans les gonades des clones.

## CONCLUSION

Avant tout, le clonage représente une possibilité jusque là inconnue d'augmenter nos connaissances et d'explorer le rôle des composantes nucléaires et cytoplasmiques lors du développement embryonnaire et à la mise en route du génome zygotique.

Pour ce qui est du développement de la technique à des fins commerciales, le premier obstacle est sa faible efficacité et le deuxième est l'acceptation sociale et éthique.

Dans le cas où le génotype à reproduire justifie l'investissement financier, comme c'est le cas pour certains animaux de haute valeur génétique ou si l'on veut produire des animaux transgéniques à partir d'une culture cellulaire ayant subi des modifications (à des fins biomédicales, par exemple), le clonage représente un intérêt certain. Le coût de la production d'un veau cloné varie selon l'efficacité de la technique : il est actuellement estimé entre 20000 et 26000 dollars américains par veau (Bousquet *et al.*, 2004 ; Faber *et al.*, 2004). Cependant, ce coût estimé ne prend pas en compte la valeur ajoutée par la valeur génétique et la rareté de l'individu.

Certaines compagnies misent déjà sur la reproduction d'animaux de grande valeur génétique par clonage somatique. Une autre stratégie possible est d'utiliser le clonage embryonnaire pour multiplier des embryons préalablement sélectionnés par marqueur pour l'expression de gènes d'intérêt. Cette dernière solution reste encore limitée du fait que la sélection ne se fait que sur quelques gènes et qu'on n'obtient que quelques embryons par génération. Elle permettrait de s'affranchir en grande partie des pertes fœtales résultant de l'utilisation de cellules somatiques pour le clonage et le coût des veaux sélectionnés serait diminué (Bousquet *et al.*, 2004).

La mise en banque de cellules somatiques d'un individu en vue d'un clonage ultérieur peut être utilisée comme une assurance en cas d'accident ou de catastrophe sanitaire comme celle qu'a connue la Grande Bretagne en 2001. La possibilité de reconstituer les éléments fondateurs d'un cheptel de grande valeur peut être inestimable.

Enfin, la question éthique reste essentielle, en particulier au vu des pertes fœtales et néonatales chez les clones. L'amélioration de l'efficacité devra être obtenue et l'acceptation sociale se fera probablement si une transparence totale est gardée. Il restera à déterminer si les animaux clonés qui ne sont pas des OGM doivent être classés dans la catégorie des "Novel Food" comme ces derniers, ou des "New food" comme des produits innovants mais non modifiés...

- Alexander B., Perrault S., Peura T., Betts D.H. and King W.A. 2004. *Reprod Fertil Dev* 134
- Behboodi E., Anderson G.B., BonDurant R.H., Cargill S.L., Kreuscher B.R., Medrano J.F. and Murray J.D. 1995. *Theriogenology* 44, 227-232
- Bertolini M., Mason J.B., Beam S.W., Carneiro G.F., Sween M.L., Kominek D.J., Moyer A.L., Famula T.R., Sainz R.D. and Anderson G.B. 2002. *Theriogenology* 58, 973-94
- Bourc'his D., Le B.D., Patin D., Niveleau A., Comizzoli P., Renard J.P. and Viegas-Péquignot E. 2001. *Current Biology* 11, 1542-46
- Bousquet D. and Blondin P. 2004. *Cloning Stem Cells* 6, 190-197
- Cezar G.G., Bartolomei M.S., Forsberg E.M., First N.L., Bishop M.D. and Eilertsen J. 2003. *Biol. Reprod.* 68, 1009-1014
- Chavatte-Palmer P., Constant F., Guillomot M., Heyman Y., Richard C. and Renard J.P. 2002a. *Placenta* 23, A15
- Chavatte-Palmer P., Heyman Y., Richard C., Monget P., LeBourhis D., Kann G., Chilliard Y., Vignon X. and Renard J.P. 2002b. *Biology of Reproduction* 66, 1596-603
- Chavatte-Palmer P., Rémy D., Cordonnier N., Richard C., Isenmann H., Laigre P., Heyman Y. and Mialot J.P. 2004a. *Cloning and Stem Cells* 6, 92-98
- Chavatte-Palmer P., Rémy D., Richard C., Isenman H. and Mialot J.P. 2004b. *World Buiairy Congress, Quebec, Canada, in press.*
- Cibelli J.B., Stice S., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A. and Robl J.L. 1998. *Science* 280, 1256-1258
- De Sousa P.A., Walker S., King T.J., Young L.E., Harkness L., Ritchie W.A., Travers A., Ferrier P. and Wilmut I. 2001. *Biol. Reprod.* 65, 23-30
- Dean W., Santos F., Stojkovic M., Zakhartchenko V., Walter J., Wolf E. and Reik W. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13734-8
- Edward J.L., Schrick F.N., McCracken M.D., van Amstel S.R., Hopkins F.M., Welborn M.G. and Davies C.J. 2003. *Am J Reprod Immunol* 50, 113-23
- Enright B.P., Taneja M., Schreiber D., Riesen J., Tian X.C., Fortune J.E. and Yang X. 2002. *Biol. Reprod.* 66, 291-296
- Faber D.C., Ferre L.B., Metzger J., Robl J.M. and Kasinathan P. 2004. *Cloning Stem Cells* 6, 198-207
- Govoni K.E., Tian X.C., Kazmer G.W., Taneja M., Enright B.P., Rivard A.L., Yang X. and Zinn S.A. 2002. *Biol. Reprod.* 66, 1293-1298
- Heyman Y., Chavatte-Palmer P., LeBourhis D., Camous S., Vignon X. and Renard J.P. 2002a. *Biol. Reprod.* 66, 6-13
- Heyman Y., Richard C., Rodriguez-Martinez H., Lazzari G., Chavatte-Palmer P., Vignon X. and Galli C. 2004. *Cloning and Stem Cells* in press
- Heyman Y., Zhou Q., Lebourhis D., Chavatte-Palmer P., Renard J.P. and Vignon X. 2002b. *Cloning and Stem Cells* 4, 47-55
- Hiendleder S., Mund C., Reichenbach H.-D., Wenigerkind H., Brem G., Zakhartchenko V., Lyko F. and Wolf E. 2004. *Biol Reprod* 71, 217-223
- Hill J.R., Burghardt R.C., Jones K., Long C.R., Looney C.R., Shin T., Spencer T.E., Thompson J.A., Winger Q.A. and Westhusin M.E. 2000. *Biol. Reprod* 63, 1787-94
- Hill J.R. and Chavatte-Palmer P. 2002a. In J. Cibelli (J. Cibelli). *Principles of Cloning*. Academic Press. San Diego. 247-266.
- Hill J.R., Roussel A.J., Cibelli J.B., Edwards J.F., Hooper N.L., Miller M.W., Thompson J.A., Looney C.R., Westhusin M.E., Robl J.M. and Stice S.L. 1999. *Theriogenology* 51, 1451-1466
- Hill J.R., Schlafer D.H., Fisher P.J. and Davies C.J. 2002b. *Biol. Reprod.* 67, 55-63
- Kang Y.K., Park J.S., Koo D.B., Choi Y.H., Kim S.U., Lee K.K. and Han Y.M. 2002. *Embo Journal* 21, 1092-100
- Kato Y., Tani N., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue, H. and Tsunoda Y. 1998. *Science* 282, 1975-1976
- Kubo M. 2002. *Cloning Stem cells* 4, 281
- Laigre P., Chavatte-Palmer P., Vignon X. and Heyman Y. 2004. *Rencontres Recherche Ruminants, Paris, France, sous presse.*
- Lanza R.P., Cibelli J.B., Faber D., Sweeney R.W., Henderson B., Nevala W., West M.D. and Wettstein P.J. 2001. *Science* 294, 1893-1894
- Lee R.S.F., Peterson A.J., Donnison M.J., Ravelich S., Ledgard A.M., Li N., Oliver J.E., Miller A.L., Tucker F.C., Breier B. and Wells D.N. 2004. *Biol Reprod* 70, 1-11
- Miyashita N., Shiga K., Yonai M., Kaneyama K., Kobayashi S., Kojima T., Goto Y., Kishi M., Aso H., Suzuki T., Sakaguchi M. and Nagai T. 2002. *Biology of Reproduction* 66, 1649-1655
- Norman H.D. and Walsh M.K. 2004. *Cloning Stem Cells* 6, 157-164
- Pace M.M., Augenstein M.L., Betthausen J.M., Childs L.A., Eilertsen K.J., Enos J.M., Forsberg E.J., Golueke P.J., Graber D.F., Kemper J.C., Koppang R.W., Lange G., Lesmeister T.L., Mallon K.S., Mell G.D., Misica P.M., Pfister-Genskow M., Strelchenko N.S., Voelker G.R., Watt S.R. and Bishop M.D. 2002. *Biol. Reprod.* 67, 334-339
- Ravelich S.R., Breier B.H., Reddy S., Keelan J.A., Wells D.N., Peterson A.J. and Lee R.S.F. 2004. *Biol Reprod* 70, 430-438
- Rhind S., Cui W., King D., Ritchie W.A., Wylie D. and Wilmut I. 2004. *Reprod Fertil Dev* 156 (abstract 69)
- Rhind S.M., King T.J., Harkness L.M., Bellamy C., Wallace W., DeSousa P. and Wilmut I. 2003. *Nature Biotech.* 21, 744-745
- Rudenko L., Matheson J.C., Adams A.L., Dubbin E.S. and Greenlees K.J. 2004. *Cloning Stem Cells* 6, 79-93
- Savage A.F., Maull J., Tian X.C., Taneja M., Katz L., Darre M. and Yang X. 2003. *Theriogenology* 60, 1097-110
- Takahashi S. and Ito Y. 2004. *Cloning Stem Cells* 6, 165-171
- Tamashiro K.L., Wakayama T., Blanchard R.J., Blanchard D.C. and Yanagimachi R. 2000. *Biology of Reproduction* 63, 328-34
- Tian X.C., Xu J. and Yang X. 2000. *Nat Genet* 26, 272-3
- Tomé D., Dubarry M. and Fromentin G. 2004. *Cloning Stem Cells* 6, 172-177
- Tsunoda Y. and Kato Y. 2002. *Differentiation* 69, 158-61
- van Wagendonk-de Leeuw A.M., Mullaart E., de Roos A.P.W., Merton J.S., den Haas J.H.G., Kemp B. and de Ruigh L. 2000. *Theriogenology* 53, 575-597
- van Wagendonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos APW, Merton JS, den Haas JHG, Kemp B & de Ruigh L 2000 Effects of different reproduction techniques : AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53 575-597.
- Vignon X., Chesné P., Lebourhis D., Heyman Y. and Renard J.P. 1998. *Theriogenology* 49, 392
- Wells D.N., Forsyth J.T., McMillan V. and Oback B. 2004. *Cloning Stem Cells* 6, 101-110
- Wells D.N., Misica P.M., Tervit H.R. and Vivanco W.H. 1998. *Reprod. Fertil. Dev.* 10, 369-378
- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J. and Campbell K.H.S. 1997. *Nature* 385, 810-813
- Young L.E., Sinclair K.D. and Wilmut I. 1998. *Rev. Reprod.* 3, 155-163