

« La naissance de Dolly a révolutionné la biologie. »

Lorsque nous en avons pris connaissance par l'intermédiaire de la presse, l'information nous avait d'abord fait l'effet d'une bombe. D'épouvantables fantasmes jusqu'alors tapis derrière « le mur de l'impossible », commencèrent à prendre forme au cœur de la réalité. Des fantasmes qui jusqu'ici ne s'étaient exprimés que par l'intermédiaire de quelques auteurs de science-fiction. Nous avons l'impression, tout à coup, de devenir les acteurs d'un inquiétant scénario qui allait peut-être prendre forme dans notre vie quotidienne.

Jean-Paul Renard, ingénieur agronome spécialisé
en reproduction animale, directeur de recherche de l'INRA
à Jouy-en-Josas, Futura-Sciences, 3 mars 2003

L'annonce de la naissance de Dolly le 23 février 1997 a eu l'effet d'un coup de tonnerre médiatique pour diverses raisons, d'abord scientifiques puis éthiques. Dolly n'était pas née par fécondation comme les autres mammifères, le noyau du zygote* ne contenant ni ADN maternel ni ADN paternel. Dolly n'était pas née non plus par dissociation d'un embryon issu d'une fécondation, c'est-à-dire par clonage embryonnaire. Il s'agissait du premier mammifère né suite au transfert du noyau d'une cellule adulte dans un ovocyte énucléé. Cette annonce mettait à mal un des fondements de la biologie cellulaire, l'irréversibilité fonctionnelle du noyau d'une cellule différenciée, c'est-à-dire le dogme selon lequel la différenciation cellulaire est irréversible.

Ian Wilmut et Keith Campbell du Roslin Institute, près d'Édimbourg, réussissent bien, l'année précédente, à faire naître les deux brebis Megan et Morag par clonage à partir de noyaux de cellules embryonnaires qui s'étaient incidemment différenciées en culture. Ils décident alors de procéder à la même technique avec des noyaux de cellules adultes.

Pour cela, ils cultivent des cellules mammaires d'une seule brebis donneuse et les mettent en phase de quiescence (repos) par réduction de la concentration de sérum dans le milieu de culture. Ils électrofusionnent ces cellules avec des ovocytes énucléés d'autres brebis, par un choc électrique de quelques microsecondes. Après fusion, la culture est poursuivie durant près de 7 jours. 277 ovocytes sont ainsi reconstitués, 29 embryons seulement se développent jusqu'au blastocyste* (stade juste avant l'implantation) et sont transférés dans 13 brebis porteuses, dont une seule a mis bas un agneau viable en février 1996 : Dolly.

Dolly fut l'objet de controverses et d'un certain nombre d'idées reçues.

Dans l'année qui a suivi la publication scientifique de ce travail en 1997 dans la revue *Nature*, certains ont contesté le caractère différencié du noyau adulte à l'origine de Dolly, au prétexte que la brebis donneuse était gestante, et que le seul noyau à l'origine d'un agneau pouvait être celui d'une cellule fœtale du sang maternel et non d'une cellule adulte. Ceci fut infirmé par l'étude des empreintes génétiques* de Dolly et de la donneuse du noyau, ainsi que par les réussites qui ont suivi pour d'autres mammifères, notamment les premiers veaux clonés par l'équipe française de Jean-Paul Renard, à l'INRA. Marguerite est la première vache française obtenue par transfert

de noyau d'une cellule musculaire de fœtus. Elle est née en février 1998, un mois après Charlie et Georges, les deux premiers veaux clonés américains.

« Dolly n'est pas le clone parfait de sa mère génétique. »

Il est intéressant de rappeler ici que si le génome nucléaire de Dolly correspond à celui de sa mère « génétique » qui a donné le noyau, elle possède un génome mitochondrial mixte : de l'ovocyte énucléé prélevé sur une autre brebis mais aussi, par la technique d'électrofusion des deux cellules, du génome mitochondrial de la donneuse du noyau. Dolly n'est pas le clone parfait de sa mère dite génétique, elle n'en est que son clone nucléaire. Dolly n'est donc pas la vraie jumelle de sa mère. Toutes ses cellules sont en fait des chimères nucléo-cytoplasmiques puisque noyau et mitochondries proviennent de deux animaux différents. Ceci fait que la ressemblance est moins grande entre deux clones par transfert nucléaire qu'entre deux clones « vrais jumeaux » par scission d'un même embryon provenant d'un seul ovocyte. Vous remarquerez d'ailleurs que des veaux clonés à partir de la même vache donneuse de noyaux adultes (cellules de l'oreille) n'ont pas tout à fait la même disposition des taches noires sur leur robe blanche. Au contraire, deux chèvres jumelles, clonées par scission embryonnaire, présentent des taches de même taille mais disposées de façon inversée, symétriques en miroir (flanc droit pour l'une, flanc gauche pour l'autre). Des jumeaux vrais se ressemblent donc plus que des clones issus d'un même donneur de noyau.

« Dolly avait l'âge de sa mère à la naissance. »

L'âge de Dolly a fait couler beaucoup d'encre : Dolly avait-elle l'âge de sa mère à la naissance ? Une façon d'évaluer l'âge est de mesurer la longueur de l'extrémité des chromosomes appelée « télomère ». En effet, le vieillissement s'accompagne du raccourcissement des télomères*, plus précisément de la diminution du nombre d'unités répétées de six paires de bases, constituant chaque extrémité télomérique du chromosome. Or la longueur des télomères de Dolly à sa naissance était la même que celle des chromosomes de sa mère, âgée de six ans. Ce qui a pu faire croire, dans un premier temps, que Dolly avait l'âge de sa mère. Les études suivantes chez les vaches et les souris clonées n'ont pas retrouvé ce vieillissement télomérique. L'hypothèse qu'une enzyme capable de rallonger les télomères soit contenue dans l'ovocyte énucléé a été soulevée, du moins pour la souris. La durée de vie de Dolly fut pourtant plus courte que celle d'un mouton en bonne santé, capable de vivre une bonne douzaine d'années. En effet, Dolly a été euthanasiée à l'âge de six ans et demi. Elle développait un cancer pulmonaire et une arthrite : aucune anomalie imputable *a priori* au clonage. Dolly est aujourd'hui conservée et visitée au musée royal d'Édimbourg.

Il fut craint également que Dolly ne soit stérile. Elle a eu deux portées, la première d'un agneau et la seconde de trois agneaux tout à fait normaux.

Une naissance unique (Dolly) sur 29 blastocystes transférés illustre bien la très faible efficacité du transfert nucléaire en matière de clonage reproductif, avec un taux de réussite compris entre 0,5 % et 5 % selon les séries et les espèces* clonées. Les échecs surviennent à tous les stades : développement embryonnaire *in vitro*, fœtal pendant la gestation, au

moment de la mise bas et même après la naissance, voire au cours du vieillissement de l'animal cloné. Une fois que l'embryon est implanté dans la cavité utérine, le taux d'avortements est important, soit par un retard du développement fœtal, soit par un défaut de vascularisation du placenta.

Parmi les anomalies fréquemment rencontrées des animaux clonés : le poids à la naissance en excès de plus de 20 %, des atteintes sévères respiratoires, cardio-vasculaires, rénales, du système immunitaire, sources d'une mortalité périnatale importante. Elles semblent traduire un défaut dans la reprogrammation génétique, notamment au niveau de gènes* soumis à l'empreinte parentale.

Empreintes parentales* – épigénétisme*

Les mammifères sont les seuls vertébrés dotés d'empreintes parentales. Chez l'homme, près de 80 gènes (sur 30 000) sont soumis à empreinte parentale. C'est pour cette raison que la parthénogenèse, activation ovocytaire mimant le processus de fécondation sans le recours à des gènes paternels du spermatozoïde, ne peut aboutir à une naissance. La mémoire cellulaire, qui permet à une cellule mère de transmettre une fonction ou une propriété à ses cellules filles, ne relève pas d'un mécanisme modifiant la séquence des gènes mais d'une protéine de régulation épigénétique (« épi » : autour). Par exemple, les histones qui enroulent l'ADN contrôlent la structure de la chromatine et son compactage ; l'ADN peut être modifié par l'ajout de petits groupements chimiques (méthyles) capables de réprimer la transcription et donc l'expression de gènes ; à l'inverse, la déméthylation conduit à une « épimutation » associée à une hyperexpression des gènes en cause. Toute modification est transmise lors des divisions cellulaires. Les profils de méthylation de l'ADN vont donc faire que des gènes seront ou non activés. Une méthylation excessive

peut par exemple paralyser le travail des gènes réparateurs de l'ADN ou des gènes suppresseurs de tumeurs. Des épimutations ont aussi été repérées dans de nombreux cancers. L'utilisation en culture cellulaire d'agents cancérogènes induit des altérations de gènes responsables du contrôle du cycle cellulaire, laissant libre cours à des divisions cellulaires illimitées. De même, l'épigénétisme apporte au matériel génétique des moyens de s'adapter aux variations des conditions environnementales : les plantes « sans cerveau, ni système nerveux » mémorisent bien les changements saisonniers.

Au cours de la gamétogenèse* mâle et femelle se produit une méthylation spécifique de quelques gènes qui sera transmise au génome embryonnaire. Cette marque de fabrication n'est autre que l'empreinte parentale qui explique qu'un embryon parthénogénétique n'ayant donc pas reçu les deux empreintes parentales n'est pas viable. La programmation de l'empreinte génomique par méthylation s'effectue tôt, dans la période fœtale pour les gènes soumis à empreinte paternelle ; elle est plus étendue dans le temps, jusqu'après la naissance pour les gènes de l'empreinte maternelle.

De nombreuses pathologies sont identifiées chez l'homme comme provenant de défauts d'empreinte génomique : diabète néonatal, obésité, certains cancers, certaines maladies dont l'expression peut varier pour un même chromosome atteint. Citons les délétions au niveau du chromosome 15, à l'origine du syndrome d'Angelman par défaut d'empreinte maternelle (retard mental sévère et autres troubles neurologiques), du syndrome de Prader-Willie d'origine paternelle (obésité, hypotonie...).

En effet le noyau somatique pourrait ne pas reproduire de façon exacte et complète sa propre empreinte parentale au cours de la déprogrammation – reprogrammation induite dans l'ovocyte où il a été

transféré. Des recherches s'imposent pour élucider le phénomène. Ainsi, en 2005, l'INRA étudie près de 150 paramètres physiologiques, sur une quarantaine de clones bovins de façon comparative avec un même nombre d'animaux témoins, démontrant très peu de différences. Des retards pubertaires et/ou de développement, de masses musculaires ou de certains organes sont cependant retrouvés plus fréquemment dans la population clonée. Tout ceci souligne l'importance de poursuivre de telles recherches tant notre méconnaissance est importante du côté embryonnaire comme de celui de la mère porteuse (gestatrice).