

Chroniques génomiques

Les « serial cloneurs » de Yamanashi

Bertrand Jordan



Biologiste moléculaire,
généticien,
Président d'Aprogène
(association pour la promotion
de la génomique), Marseille,
France.
brjordan@orange.fr

Dès le succès, à l'époque (1997) très surprenant, du clonage de la brebis Dolly par transfert nucléaire à partir de cellules somatiques [1], de nombreux laboratoires se sont attachés à reproduire cet exploit pour d'autres mammifères. La première à y parvenir pour la souris fut, dès l'année suivante, une équipe japonaise¹ qui allait poursuivre ces travaux pendant de nombreuses années [2]. Le taux de succès (nombre de naissances à terme par rapport au nombre d'embryons implantés) était faible, inférieur à 1 % ; le choix des cellules somatiques donneuses du noyau était critique et les cellules du cumulus péri-ovocytaire² s'avérèrent les plus performantes et furent utilisées pour toute la suite des travaux.

Du clonage au re-clonage

L'utilisation de cellules provenant d'animaux clonés pour effectuer de nouveaux clonages – le clonage en série – suscita l'intérêt de plusieurs laboratoires. Ces expériences pouvaient permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le clonage, et notamment le nécessaire effacement des marques épigénétiques (principalement les méthylations de l'ADN et les désacétylations des histones) présentes sur l'ADN du noyau de la cellule donneuse différenciée pour lui permettre de fonctionner comme un zygote, après transfert dans un ovule préalablement énucléé [m/s 3]. Elles présentaient également un intérêt pratique dans l'optique de la production de nombreux clones d'animaux d'élevage. Les premières tentatives furent peu concluantes, tant pour la souris que pour le bœuf [4, 5] : le re-clonage échouait, pour la souris, au bout de cinq à six générations, bien que les clones successifs soient apparemment normaux. Les choses

allaient changer avec la découverte de modalités facilitant la reprogrammation épigénétique, notamment le traitement par de faibles doses de trichostatine A (TSA), un inhibiteur des enzymes impliquées dans la désacétylation des histones [6]. L'équipe japonaise appliqua ce traitement, en testant différentes doses de TSA, et put montrer qu'une incubation du zygote durant 10 heures avec de la TSA à 50 nM immédiatement après le transfert nucléaire, augmentait le taux de succès d'un facteur 5 à 10, aboutissant à des valeurs respectables de succès (5 à 10 %) qui allaient permettre de retenter le clonage en série [7].

Serial cloning : des succès, une limite

En 2013, l'équipe Wakayama publiait les résultats d'un clonage en série allant jusqu'à 25 générations [8]. Grâce au traitement par la TSA, le taux de succès initial était proche de 8 % et, chose étonnante, il semblait augmenter au fil des re-clonages successifs (Figure 1). Alors que sans traitement TSA le taux de réussite, faible au départ, s'effondre au bout de quelques générations, en présence de TSA, il fluctue mais augmente de façon significative pour s'établir à environ 13 % au bout de 25 re-clonages. De plus, les animaux obtenus à chaque étape n'ont pas d'anomalie visible (à part des placentas de plus grande taille), ont une longévité normale, sont fertiles et, au niveau moléculaire, ne présentent pas de raccourcissement des télomères ni de modification majeure dans leur patron d'expression [m/s 9]. On a donc l'impression que cela pourrait continuer indéfiniment, et c'est la possibilité qu'évoquaient les auteurs

Vignette (© Bertrand Jordan).

¹ Avec pour acteurs principaux, à partir de 2003, le couple formé par Sayaka Wakayama et son époux Teruhiko Wakayama, que nous retrouverons tout au long de cette chronique et dont l'équipe est actuellement implantée à l'université de Yamanashi, au Sud-Ouest de Tokyo.

² Cellules qui entourent l'ovocyte et ont un rôle de protection et de nutrition de ce dernier.

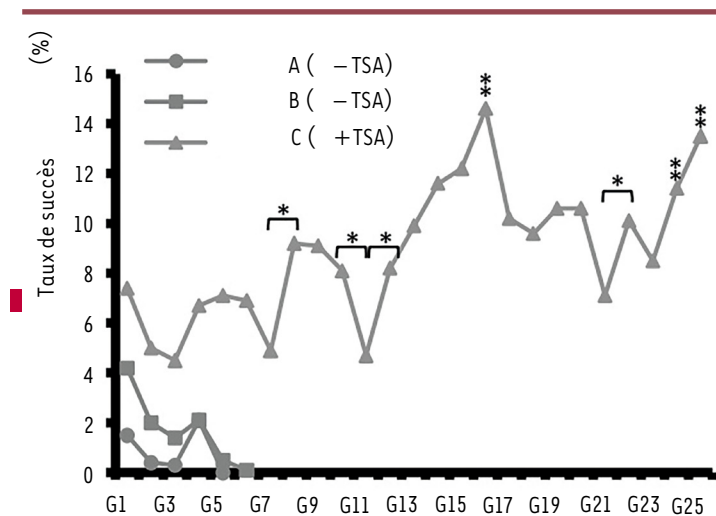


Figure 1. Taux de succès des clonages successifs avec ou sans traitement par la TSA. Les étoiles indiquent les points présentant des différences statistiquement significatives. Extrait partiel et modifié de la figure 1 de [8] (licence CC-BY 4.0).

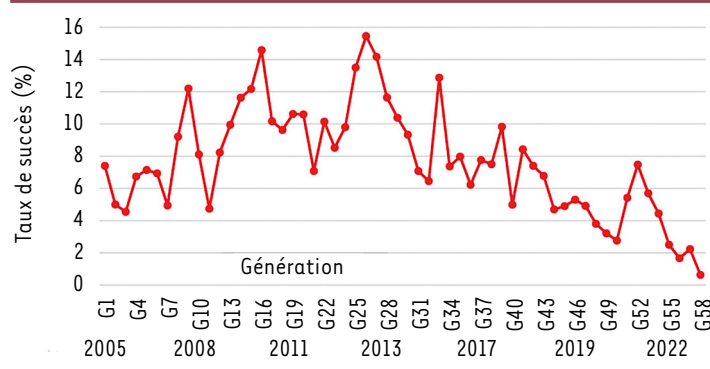


Figure 2. Taux de succès des clonages successifs jusqu'à la 58e génération, de 2005 à fin 2022. Extrait partiel et remanié de la figure 1 de [10] (licence CC-BY 4.0).

dans leur conclusion – à ce stade, ils poursuivaient des clonages depuis près de dix ans et avaient déjà effectué plus de 10 000 transferts nucléaires...

Comme on pouvait s'y attendre, les chercheurs ne se sont pas arrêtés en si bon chemin et ont poursuivi avec patience leurs re-clonages. Mais ils n'ont pas pu aller au-delà de la 58^e génération : après une baisse progressive, le taux de succès est tombé à zéro (Figure 2) [10]. Cette figure résume presque vingt ans de travaux et environ 30 000 transferts nucléaires ayant produit à ce stade plus de 1 200 souris clonées à partir de la seule souris (femelle) initiale. Le début de la courbe, jusqu'à G25, reprend les données de la Figure 1 : on voit qu'en fait la génération 25 représentait un point culminant et que par la suite le taux de succès, quoique fluctuant, n'a pas cessé de décliner. Le rêve d'une immortalité offerte par le clonage semble donc s'éloigner ; reste à procéder à des analyses approfondies pour comprendre ce qui cause ce déclin.

À la recherche des anomalies

De fait, l'essentiel de l'article qui fait l'objet de cette chronique, est consacré à la recherche des causes de l'arrêt [10]. Pour cela, on examine les clones de souris de la 51^e génération (G51) et on les compare à ceux de la 1^{re} génération, produits par clonage à partir de la lignée d'origine (et appelés NG1), et à des souris obtenues par fécondation *in vitro* (FC pour *fertilized control*). Les souris G51 sont apparemment normales (mais leur placenta pesait le double de celui des souris FC, comme pour toutes les générations de souris clonées), et leur longévité est constante. Le développement embryonnaire des souris NG1 et G51 est un peu ralenti (de manière équivalente) par rapport aux contrôles FC. Pour tenter d'apprécier l'état épigénétique de ces clones, des anticorps dirigés contre les marques de méthylation et d'acétylation présentes sur les histones, ont été appliqués sur des embryons NG1, G51 et FC au stade blastocyste : NG1 et G51 montrent des profils épigénétiques très semblables mais assez différents de celui des embryons FC. Les patrons d'expression ont également été étudiés par RNA-seq sur les blastocystes et ne présentent pas de différence notable. À ce stade, on voit donc quelques différences entre les souris clonées et les contrôles FC, mais pas d'évolution au cours des clonages successifs qui pourraient expliquer leur échec au-delà de la génération 58. D'ailleurs les souris clonées G20, G50 et G55 sont fertiles lorsqu'elles sont croisées avec des mâles normaux, bien que le nombre d'embryons par portée soit plus faible pour G50 et G55.

Les différences apparaissent plus nettement si l'on a recours à la parthénogenèse sur les souris issues du clonage ou celles normales. On peut en effet, chez la souris, déclencher ce mode de reproduction par un traitement chimique (par le chlorure de strontium) des ovocytes, qui provoque la diploïdisation du noyau suivie du développement d'un embryon qui est alors homozygote pour chacun de ses chromosomes [11]. On constate que 91 % des embryons ainsi produits à partir de des souris normales se développent jusqu'au stade blastocyste, contre seulement 12,7 % pour les souris G25 et aucun pour G53. L'interprétation est claire : l'homozygotie due à la parthénogenèse révèle les mutations (ponctuelles ou étendues) accumulées dans l'ADN au fil des clonages successifs et aboutit à des zygotes qui ne sont pas viables. Il est donc temps de passer au séquençage... C'est ce qu'ont fait les auteurs, en choisissant une dizaine de clones entre G6 et G57 dont l'ADN a été séquencé au standard habituel (lectures courtes *Illumina*, redondance 30X) complété par des lectures



BERGENLINE CLASSICS

CHARLOTTE PERKINS GILMAN

Herland

Figure 3. Couverture d'une réédition récente du livre de Charlotte Perkins Gilman, initialement paru en 1915 et décrivant une société de femmes se reproduisant par parthénogenèse. Les femmes figurées ici sont génétiquement identiques, comme les branches d'un arbre.

longues (*Oxford Nanopore*) sur trois clones pour mieux caractériser les altérations de grande taille. L'analyse de ces résultats montre que la génération 57 a accumulé pas moins de 5 700 mutations ponctuelles, 80 *indels* (insertions ou délétions de petites tailles) et également 80 variants structuraux (grandes délétions, inversions, perte d'un des deux chromosomes X et translocations entre les chromosomes 7 et 9, 12 et 16, 4 et 11). Ces altérations apparaissent de manière cumulative au fil des re-clonages successifs et particulièrement à partir de la génération 25 ; les translocations ne sont présentes que dans les dernières générations. On voit donc que les clonages successifs s'accompagnent de l'empilement de mutations qui, à la longue, finissent par rendre impossible la poursuite des clonages ; la vitesse à laquelle s'accumulent ces altérations est environ trois fois plus élevée que celle que l'on observe dans une lignée de souris entretenue durant 20 ans et 60 générations [10]. Bien entendu les clones non viables sont éliminés à

chaque clonage, ce qui explique en partie le faible taux de succès et sa décroissance à partir de la génération 25, quand un bon nombre de mutations ont déjà été accumulées, mais cette sélection n'est pas suffisante pour assurer la pérennité de la lignée de clones. L'amélioration du rendement du clonage par le traitement TSA (toujours efficace pour les générations tardives) ne peut empêcher cette détérioration progressive du génome murin qui constitue une barrière infranchissable à la poursuite de ces clonages successifs.

Quelques enseignements

On ne peut qu'être admiratif devant la persévérance des époux Wakayama et la constance avec laquelle ils ont poursuivi ces travaux très exigeants au long de deux décennies. Parmi les leçons que l'on peut en tirer, notons la persistance du patron épigénétique au fil des clonages successifs : on aurait pu s'attendre à une sélection pour les génomes les plus « reprogrammables », ce n'est pas le cas. Par contre l'accumulation de mutations était attendue, et elle a effectivement lieu, à un rythme d'ailleurs plus rapide que lors de la reproduction naturelle. Il est d'ailleurs frappant de voir que les génomes, déjà très détériorés, des souris G40 et suivantes, autorisent néanmoins le développement d'animaux qui semblent normaux à tout point de vue, y compris pour la fertilité sauf aux toutes dernières générations, et pour la longévité. Au fil de millions d'années d'évolution, les génomes ont visiblement acquis une remarquable résistance aux *bugs* qui les affectent et une étonnante capacité à permettre le développement et la reproduction d'organismes même lorsqu'ils ont subi de multiples altérations. Enfin, ce travail invalide le vieux rêve d'une possible perpétuation de notre espèce par parthénogenèse, thème de science-fiction depuis plus de cent ans [12] (Figure 3), et montre l'absolue nécessité de la reproduction sexuée pour éliminer de notre génome les mutations délétères [13]. ♦

SUMMARY

Serial cloners of Yamanashi

Serial cloning of mice by nuclear transfer has been pursued for 20 years and almost 60 successive generations by a highly dedicated Japanese team. Cloning has been successful up to the 57th generation, although with increasing difficulty from generation 25 onward. Thorough phenotypic and molecular analysis of the successive clones reveals the progressive accumulation of a large number of point mutations and structural variants. This finding has several implications and underlines the necessity of sexual reproduction to ensure continued fitness in successive generations. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare ne pas avoir de lien d'intérêt.

RÉFÉRENCES

1. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997 ; 385 : 810–13.
2. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998 ; 394 : 369–74.



3. Roidor C, Chebli K et Borensztein M. Reprogrammation, lignée germinale et empreinte génomique parentale. *Med Sci (Paris)*. 2024 ; 40 :892-903.
4. Wakayama T, Shinkai Y, Tamashiro KL, et al. Cloning of mice to six generations. *Nature* 2000 ; 407 : 318-9.
5. Kubota C, Tian XC, Yang X. Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 2004 ; 22 : 693-4.
6. Enright BP, Kubota C, Yang X, et al. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-20-deoxycytidine. *Biol Reprod* 2003 ; 69 : 896-901.
7. Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, et al. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ; 340 : 183-9.
8. Wakayama S, Kohda T, Obokata H, et al. Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. *Cell Stem Cell* 2013 ; 12 : 293-7.
9. Salvetti A. Télomère. *Med Sci (Paris)* ; 42 : 387.
10. Wakayama, S., Ito, D., Inoue, R. et al. Limitations of serial cloning in mammals. *Nat Commun* 2026 ; 17 : 2495.
11. Wei Y, Yang CR, Zhao ZA. Viable offspring derived from single unfertilized mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 ; 119 : e2115248119.
12. Perkins Gilman C. *Herland*. New York : Pantheon books, 1979 ; 176 p.
(publication originale en feuilleton dans la revue *The Forerunner*, en 1915).
13. Muller HJ. The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res* 1964 ; 106 : 2-9.

TIRÉS À PART

B. Jordan