



HAL
open science

Etude clinique, hématologique et biochimique de bovins issus de clonage somatique entre 4 mois et 24 mois

Julie Malheu

► **To cite this version:**

Julie Malheu. Etude clinique, hématologique et biochimique de bovins issus de clonage somatique entre 4 mois et 24 mois. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 2007. Français. NNT: . tel-02816600

HAL Id: tel-02816600

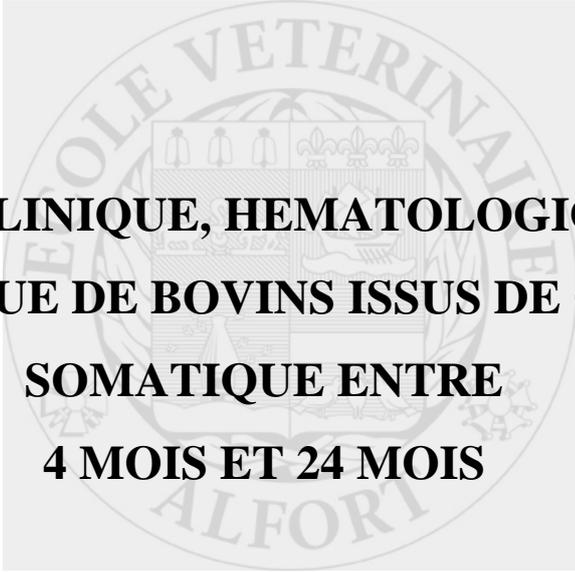
<https://hal.inrae.fr/tel-02816600>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2007



**ETUDE CLINIQUE, HÉMATOLOGIQUE ET
BIOCHIMIQUE DE BOVINS ISSUS DE CLONAGE
SOMATIQUE ENTRE
4 MOIS ET 24 MOIS**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

le.....

par

Julie, Caroline MALHEU

Née le 11 décembre 1980 à Paris IV^{ème} (Seine)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Dr Dominique REMY

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Assesseur : Dr Andrew PONTER

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Invitée : Dr Pascale CHAVATTE-PALMER

Chargée de Recherches à l'INRA

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur de la Faculté de Médecine de Créteil,
qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A Monsieur le Docteur REMY,
qui a accepté de diriger cette thèse avec gentillesse, disponibilité et patience.

Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur PONTER,
qui a bien voulu prendre part à ce travail en tant qu'assesseur.

Merci pour vos conseils et pour le temps passé à nous expliquer les analyses statistiques et la programmation SAS.

A Madame le Docteur CHAVATTE-PALMER,
qui a encadré notre travail.
Merci pour votre enthousiasme communicatif et pour avoir toujours été disponible.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur MIALOT, qui est à l'origine de notre entrée dans le protocole des clones.

Merci pour m'avoir soutenue tout au long de ma scolarité, y compris durant les moments difficiles.

Merci pour la qualité de votre enseignement et votre rigueur.

A Madame FICHEUX qui nous a encadré lors des dosages biochimiques.

Merci pour votre patience et votre éternelle bonne humeur.

A Monsieur RICHARD, à Valérie, à Patrice et à toute l'équipe de Bressonvilliers, qui soignent les clones tous les jours.

Merci de m'avoir accueillie toutes ces fois et de m'avoir encadrée durant tout le protocole avec autant de sympathie.

A Madame le Docteur CHASTANT-MAILLARD, merci pour vos conseils avisés.

A Madame Grison, Marie-Christine et Virginie, merci pour votre aide dans les recherches bibliographiques.

A Madame Maton, merci pour votre gentillesse.

REMERCIEMENTS

A mes parents, qui ont su me guider jusque-là avec amour. Pour la confiance que vous m'accordez et votre soutien de chaque instant. Je vous dédie cette thèse.

A Matthieu, l'Amour de ma vie. Puisse cette dernière être la plus longue possible à tes côtés.

A Margaux, notre petit Bonheur qui nous émerveille tous les jours (mais pas encore la nuit).

A ma famille et à ma future belle-famille, pour votre soutien et votre générosité.

A Arthur, repose en paix.

A Alexandre, Emilie, Sonia et Caro, amis toujours fidèles malgré la distance, pour notre complicité de chaque instant.

A mes amis, pour tous ces moments de détente passés ensemble.

Aux amis du GTV Junior et des T1 pro Repro et Patho Bét, pour ces bons moments passés en bottes et casaques.

A tous les enseignants que j'ai pu rencontrer pendant ma scolarité et grâce à qui je suis vétérinaire aujourd'hui, particulièrement Sœur Marie-Thérèse, Jacques Mendels.

Aux vétérinaires et aux éleveurs qui m'ont transmis leur savoir et leur passion, plus particulièrement merci à Régis, Adam, Nicolas, Thibault, Bernard, Jean-Luc, Olivier, François, Monsieur et Madame Favier.

ETUDE CLINIQUE, HEMATOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DE BOVINS ISSUS DE CLONAGE SOMATIQUE ENTRE 4 MOIS ET 24 MOIS

MALHEU Julie

Résumé

Bien que des animaux apparemment sains aient été produits par clonage somatique, le taux de réussite d'un tel procédé est généralement faible (2%-10%) avec de fortes pertes périnatales.

Notre étude s'inscrit au sein d'une étude plus large conduite par l'INRA, qui a pour but de déterminer la qualité des clones bovins adultes apparemment sains. Durant les 2 ans de notre étude prospective, nous avons évalué trois critères cliniques, douze critères hématologiques et huit critères biochimiques que nous avons comparés entre des clones somatiques bovins femelles (n=15) et des animaux contemporains non clonés (n=18) de même âge et de même sexe, élevés dans les mêmes conditions dans une ferme expérimentale de l'INRA.

Chez les clones et les témoins, la plupart des paramètres mesurés étaient dans les normes. Cependant, pour certains paramètres, la variabilité était étonnamment plus importante chez les clones que chez les témoins. De plus, entre 4 et 10 mois, le CCMH, le TGMH et les plaquettes étaient significativement plus élevés chez les clones que chez les témoins et au dessus des normes. Les lymphocytes des clones étaient significativement plus bas que ceux des témoins, le β -hydroxybutyrate et le fibrinogène étaient significativement plus élevés chez les clones que chez les témoins ; ces paramètres étaient tous dans les normes.

Mots clés : CLONAGE, EXAMEN CLINIQUE, HEMATOLOGIE, BIOCHIMIE, BOVIN

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr Dominique REMY

Assesseur : Dr Andrew PONTER

Invitée : Dr Pascale CHAVATTE-PALMER

Adresse de l'auteur :

Melle Julie MALHEU

112 Rue Rambuteau

75001 PARIS

CLINICAL, HAEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDY OF SOMATIC CELL CLONED CATTLE BETWEEN 4 TO 24 MONTHS OF AGE

MALHEU Julie

Summary

Although apparently healthy animals can be produced by nuclear transfer of somatic cells nuclei, the success of this procedure is generally poor (2%-10%) with high perinatal losses. Our study is part of a larger scientific investigation directed by INRA, aimed at assessing the quality of adult, apparently healthy, somatic cell cloned cattle.

During a 2-year prospective study, we evaluated three clinical, twelve haematological and eight biochemical parameters of bovine female somatic clones (n=15) and compared them to non-cloned breed, age and sex-matched contemporary animals (n= 18), maintained under the same conditions at the same experimental farm of INRA.

In clone and control groups, most parameters measured were within the normal range and not different between clones and controls. However, for some parameters, the variability was surprisigly higher in the clone groups. Moreover, MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), MCH (mean corpuscular hemoglobin), platelets were significantly higher in clones than in controls and were above the normal ranges between 4 and 10 months old. Lymphocytes were significantly lower in clones than in controls, β -hydroxybutyrate and fibrinogen was significantly higher in clones than in controls and albumin was significantly lower than in clones ; these parameters were all within the normal range.

Keywords : CLONING, CLINICAL EXAM, HAEMATOLOGY, BIOCHEMISTRY, CATTLE

Jury :

President : Pr.

Director : Dr Dominique REMY

Assessor : Dr Andrew PONTER

Guest : Dr Pascale CHAVATTE-PALMER

Author's address

Miss Julie MALHEU

112 Rue Rambuteau

75001 PARIS (France)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	9
PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. Le clonage.....	15
A. Techniques et résultats.....	15
1. Techniques	15
a) Maturation <i>in vitro</i> des ovocytes receveurs.....	17
b) Enucléation des ovocytes receveurs par micromanipulation	17
c) Préparation des cellules donneuses.....	18
d) Reconstitution de l'embryon	18
e) Fusion – activation	18
f) Développement embryonnaire et fœtal	19
2. Résultats actuels du clonage somatique	19
a) Nombre d'animaux obtenus	19
b) Rendement encore très variable.....	20
c) Une efficacité qui progresse.....	21
B. Applications possibles : perspectives	22
1. Etudes fondamentales sur la différenciation cellulaire.....	22
2. Diminution du nombre d'animaux nécessaires en expérimentation	25
3. Accélération du progrès génétique en sélection.....	26
4. Standardisation de la qualité.....	27
5. Sauvegarde d'espèces	27
6. Création d'un fonds génétique dans l'espèce bovine	28
7. Obtention d'animaux génétiquement modifiés.....	29
C. Problèmes soulevés.....	30
1. Préservation de la variabilité génétique	30
2. Conditions nécessaires pour l'application commerciale du clonage	30
3. Coût de la recherche scientifique.....	31
4. Position du public	32
5. Ethique et politique	32
D. Anomalies rencontrées chez les clones	33

1.	Pendant la gestation	33
a)	Pertes rencontrées au premier trimestre.	34
b)	Pertes des deuxième et troisième trimestres	35
2.	Chez les jeunes de 0 à 4 mois	36
3.	Le cas particulier du syndrome du gros veau ou LOS (Large Offspring Syndrom)	37
E.	Causes possibles de ces anomalies	38
1.	Bases physiologiques et moléculaires du syndrome de gros veau	39
2.	Les facteurs cytoplasmiques	39
3.	L'environnement utérin	41
4.	Les mutations génétiques : les mitochondries et les cellules somatiques adultes	41
5.	L'empreinte parentale	42
6.	Le statut immunitaire	44
7.	Syndrome du gros veau ou plutôt syndrome du gros placenta ?	46
II.	Le développement après la naissance	49
A.	La croissance	49
B.	Les maladies	52
1.	Maladies rencontrées chez les clones	52
2.	Cas particulier du « vieillissement » des clones	55
3.	La reproduction	57
a)	Capacité des clones à se reproduire	57
b)	Statut hormonal et puberté des clones	58
4.	La production	60
a)	Production laitière	60
b)	Production carnée	62
III.	Les paramètres cliniques, hématologiques et biochimiques	65
A.	Paramètres cliniques	65
1.	Fréquence respiratoire	65
2.	Fréquence cardiaque	65
3.	Température	65
B.	Paramètres hématologiques	66
1.	La lignée rouge	68

a)	Numération globulaire (NG)	69
b)	Hématocrite (Ht)	70
c)	Taux d'hémoglobine (Hb).....	71
d)	Indices de Wintrobe (VGM, CCMH, TGMH)	72
•	Volume Globulaire Moyen (VGM).....	72
•	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH)	72
•	Teneur Globulaire Moyenne en Hémoglobine (TGMH)	74
e)	Thrombocytes ou plaquettes	74
2.	La lignée blanche (leucocytes).....	74
a)	Granulocytes neutrophiles (ou polynucléaires neutrophiles).....	75
b)	Granulocytes éosinophiles	76
c)	Granulocytes basophiles	77
d)	Monocytes	78
e)	Lymphocytes	78
C.	Les paramètres biochimiques.....	80
1.	Urée.....	80
2.	Créatinine.....	82
3.	β -Hydroxy-butyrates (BOH).....	82
4.	Protéines totales.....	83
5.	Albumine	85
6.	Gamma glutamyl transpeptidase (GGT)	86
7.	Aspartate Aminotransférase (ASAT).....	86
8.	Fibrinogène	87
9.	Facteurs de variation des analyses biochimiques	88
a)	Variations liées au conditionnement et au stockage du prélèvement	88
b)	Variations selon la saison et le moment de la journée	88
10.	Biochimie lors des syndromes inflammatoires	88
	DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE PERSONNELLE	89
I.	Animaux, Matériels et Méthodes.....	93
A.	Période.....	93
B.	Animaux	93
C.	Méthodes d'obtention des individus clonés.....	93

1.	Obtention des ovocytes.....	94
2.	Obtention des embryons	94
a)	Le transfert nucléaire.....	94
b)	Devenir <i>in vitro</i> des embryons	95
3.	Préparation des receveuses.....	95
4.	Suivi des gestations.....	96
a)	Suivi biochimique	96
b)	Suivi échographique.....	96
5.	Naissance.....	97
6.	Obtention des témoins.....	97
D.	Examen des animaux	97
1.	Animaux étudiés	97
2.	Examen clinique	98
E.	Prises de sang et mesures effectuées	99
F.	Traitement statistique des données.....	100
II.	Résultats.....	101
A.	Etude clinique	101
1.	Température	101
2.	Fréquence cardiaque.....	103
3.	Fréquence respiratoire.....	105
B.	Hématologie	107
1.	Lignée rouge.....	107
a)	Nombre d'hématies	107
b)	Hématocrite.....	109
c)	Hémoglobine	111
d)	Volume Globulaire Moyen	113
e)	CCMH	115
f)	TGMH	117
g)	Plaquettes	119
2.	Lignée blanche.....	121
a)	Granulocytes neutrophiles.....	121
b)	Granulocytes éosinophiles	123
c)	Basophiles.....	125

d) Monocytes	127
e) Lymphocytes	129
C. Biochimie	131
1. Urée	131
2. Créatinine	133
3. β -hydroxybutyrate	135
4. Protéines totales	137
5. Albumine	139
6. GGT	141
7. ASAT	143
8. Fibrinogène	145
III. DISCUSSION	147
A. Choix des animaux	147
1. Témoins	147
2. Clones	147
B. A propos des méthodes de mesure	148
1. Mesures cliniques	148
2. Mesures effectuées sur les prélèvements de sang	148
C. A propos des résultats	149
1. Clinique	149
2. Hématologie	149
3. Biochimie	152
CONCLUSION	155
BIBLIOGRAPHIE	157
ANNEXES	171

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

AGNE : Acides Gras Non Estérifiés

ARN : Acide RiboNucléique

CMH-1 : Complexe majeur d'Histocompatibilité de classe 1

CSO : Compétition de Saut d'Obstacles

ENVA : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine

FIV : Fécondation *in vitro*

GMQ : Gain Moyen Quotidien

Ht : Hémanocrite

Hb : Hémoglobine

GH : Growth Hormone

IA : Insémination Artificielle

IETS : International Embryo Transfer Society

IGF : Insuline-Like Growth Factor

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

LOS : Large Offspring Syndrom

MN : Monte Naturelle

NG : Numération Globulaire

NTH : Nuclear Transfert recipient-cows with hydroallantois

PHASE : Physiologie Animale et Système d'Elevage

SAS : Statistic Analysis System

SOF : Synthetic Oviductal Fluid

SPA : Syndrome d'Adénocarcinome Pulmonaire Ovin

TE : Transfert Embryonnaire

TP : Taux Protéique

UNCEIA : Union Nationale des Coopératives agricoles d'Elevage et d'Insémination Animale

SFV : Sérum Foetal de Veau

INTRODUCTION

Etymologiquement, le mot « clone » vient du grec « klôn » qui désigne une petite branche ou jeune pousse. Aujourd'hui, on définit par « clone » un ensemble d'organismes vivants génétiquement identiques, tous issus d'un organisme unique, et par « clonage », l'opération consistant à produire ces organismes. Le clonage s'oppose donc à la reproduction sexuée qui implique la rencontre de deux individus distincts et qui conduit à la naissance d'organismes génétiquement différents. (GAULON, 2003).

Le clonage par transfert de noyau est une technique de multiplication asexuée permettant de produire, à partir d'un organisme unique, un ensemble d'individus identiques possédant le même patrimoine génétique (ECTORS *et al.*, 1997). Cette technique consiste à faire fusionner le noyau d'une cellule donneuse avec un ovocyte receveur énucléé. Cette cellule donneuse peut être une cellule embryonnaire, on parle alors de clonage embryonnaire, ou une cellule somatique, fœtale ou adulte, on parle de clonage somatique. (ISSENMANN, 2003).

La technique de clonage par transfert nucléaire n'est pas toute récente. Elle fut utilisée par Briggs et King dans les années 50 chez les amphibiens à des fins de recherche fondamentale. Ils prolongeaient ainsi les travaux de Speeman qui décrivait déjà cette méthode en 1938. Mais il faudra attendre le début des années 80 pour que ce concept soit appliqué aux mammifères, en l'occurrence à la souris par Mc Grath et Solter en 1983 (FRERET, 2000 ; GAULON, 2003). Dès lors, les premières naissances de mammifères issus du clonage embryonnaire surviennent rapidement, chez le mouton en 1986 (WILLADSEN 1986), la vache en 1987 (PRATHER *et al.*, 1987), le lapin en 1988, (ROBL ET STICE, 1989), le porc en 1989 (PRATHER *et al.*, 1989).

La naissance de mammifères issus du clonage somatique, donc à partir d'une cellule différenciée, apparaît plus tardivement mais fut très médiatisée notamment avec la naissance de la brebis Dolly en 1997 (WILMUT *et al.*, 1997). Le clonage somatique est désormais pratiqué avec succès chez plusieurs espèces dans de nombreux pays : chez les ovins (CAMPBELL *et al.*, 1996 ; WILMUT *et al.*, 1997), les bovins (CIBELLI *et al.*, 1998 ; VIGNON *et al.*, 1998^{a et b} ; KATO *et al.*, 1998 ; WELLS *et al.*, 1999^a), la souris (WAKAYAMA *et al.* 1998).

Cependant, de nombreuses anomalies de développement liées au clonage telles que mortalité embryonnaire, gestation prolongée, poids élevé à la naissance, taux de mortalité post partum élevés, ont été rapportées et limitent l'utilisation de cette technologie. (WILSON *et al.*, 1995 ; GARRY *et al.*, 1996 ; GARRY *et al.*, 1998 ; YOUNG *et al.*, 1998 ; RENARD *et al.*, 1999^a ; YOUNG *et al.*, 1998 ; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2000 ; NUMABE *et al.*, 2000 ; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002 ; HEYMAN *et al.*, 2002 ; ISSENMANN, 2003 ; RHIND *et al.*, 2003 ; CHAVATTE – PALMER *et al.*, 2004^{a et b} ; WELLS *et al.*, 2004).

L'UMR INRA/ENVA BDR fait partie des équipes qui travaillent depuis de nombreuses années sur ces techniques et elle étudie en particulier les aspects cliniques des clones ; ainsi, de diverses publications ont été faites ainsi que des thèses.

Notre travail s'inscrit dans une étude plus large menée par l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) sur la qualité des clones et de leurs produits. Il fait suite à celui d'Hedwige ISSENMANN en 2003. Il s'agissait d'une étude hématologique (neufs paramètres), biochimique (quatre paramètres) et clinique entre 23 veaux produits par clonage somatique et 12 témoins d'insémination artificielle, entre 1 et 63 jours après la naissance. Elle montrait que les valeurs obtenues pour les différents paramètres mesurés étaient dans les normes du veau. Cependant, les clones avaient un taux d'hémoglobine et un hémocrite significativement plus faible que les témoins. Le taux de fibrinogène était significativement plus élevé que celui des témoins. Les veaux clonés présentaient de nombreuses anomalies cliniques et congénitales mais passé les premiers jours après la naissance, il semblait qu'ils pouvaient se développer normalement, de la même façon que les témoins. En dehors de ce travail qui présente l'intérêt d'être une étude comparative prospective, d'autres études ont été faites sur les veaux (WILSON *et al.*, 1995 ; GARRY *et al.*, 1996 ; WELLS *et al.*, 2004) mais

très peu sur des animaux adultes (ENRIGHT *et al.*, 2002 ; CHAVATTE – PALMER *et al.*, 2004 ; WELLS *et al.*, 2004).

Dans une première partie de cette étude, nous ferons un bilan de ce qui a été écrit dans la littérature sur le clonage et les clones, et dans une seconde partie, nous rappellerons quelles sont les valeurs publiées dans la littérature pour la clinique, l'hématologie et la biochimie des bovins.

Puis, nous décrirons nos expériences menées afin de comparer les paramètres cliniques, hématologiques et biochimiques de bovins issus de clonage somatique à des bovins témoins. Ce travail a été réalisé sur 33 bovins élevés à la ferme expérimentale de l'INRA, à Bressonvilliers, dans l'Essonne, dans le cadre du programme plus large sur la qualité des clones et de leurs produits. Ensuite nous présenterons nos résultats principalement à l'aide de tableaux et de graphes, puis nous les discuterons en les comparant à la littérature.

PREMIÈRE PARTIE :
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le clonage

Un clone animal est un ensemble d'individus génétiquement identiques. L'exemple le plus simple du clone est illustré par la naissance de jumeaux monozygotes, résultant de la scission accidentelle d'un tout jeune embryon avant son implantation dans l'utérus maternel. Le clonage regroupe plusieurs méthodes de manipulation des embryons ou des cellules aboutissant à la formation d'un clone.

A. Techniques et résultats

1. Techniques

Il existe différentes techniques de clonage chez les mammifères : la dissociation, la bissection et le transfert de noyaux. La dissociation fait appel à la totipotence cellulaire qui est l'aptitude d'une cellule à assurer par elle-même la totalité du développement embryonnaire et fœtal (ex : le zygote). La bissection consiste à couper en deux un embryon au stade blastocyste et fait appel à la totipotence embryonnaire. Enfin, le transfert de noyaux fait appel à la totipotence nucléaire.

L'objectif du clonage est de produire des groupes d'animaux possédant les mêmes gènes nucléaires. La technique par transfert de noyau est la plus utilisée, c'est celle que nous détaillerons.

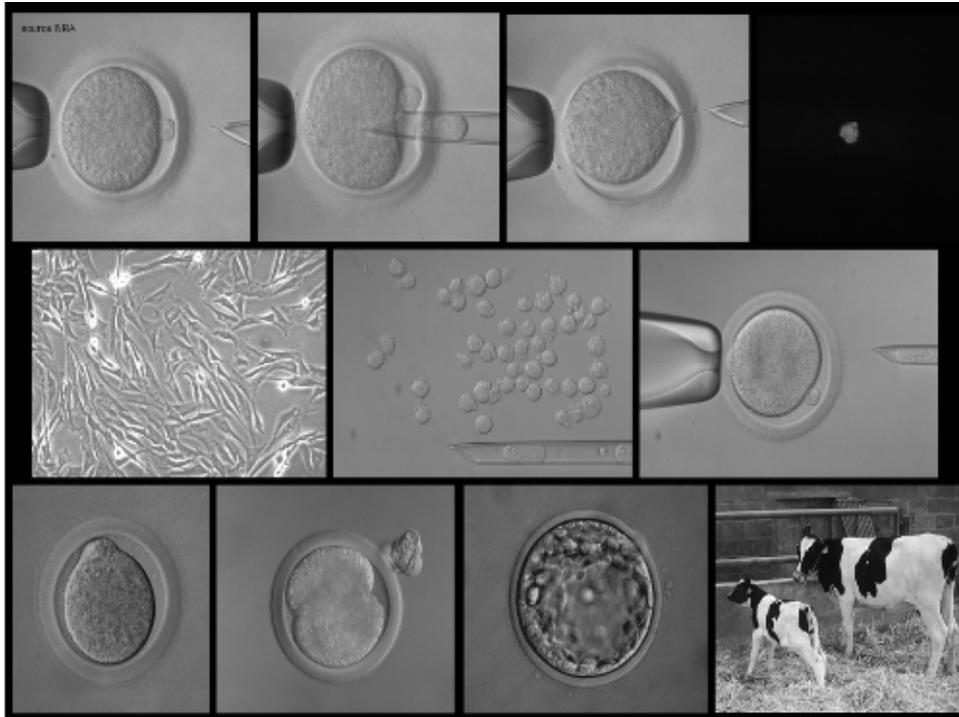
Le principe de cette technique est d'extraire le noyau d'un ovocyte receveur au stade métaphase II (énucléation par micromanipulation) puis de le remplacer par celui provenant d'une cellule donneuse, embryonnaire ou somatique (CHASTANT *et al.*, 1998 ; FRERET 2000 ; ISSENMANN 2003).

L'intérêt de transfert nucléaire est de disposer d'une source de cellules donneuses génétiquement identiques la plus large possible afin de produire des clones de grande taille.

Depuis la naissance de la brebis Dolly en 1997 (WILMUT *et al.* 1997), le clonage à partir de cellules somatiques adultes est le plus médiatisé et soulève de nombreuses questions et inquiétudes. La naissance d'animaux, ovins, bovins, caprins, porcins, lapins, félins, murins et très récemment équins, issus de lignées cellulaires variées, montre que la différenciation cellulaire n'est pas irréversible : le noyau d'une cellule différenciée placé dans un ovocyte peut retrouver sa totipotence, capacité à induire le développement d'un individu adulte normal, fertile, pouvant assurer sa descendance.

Sur le principe du transfert nucléaire qui est commun à toutes les équipes de recherche, se sont développés plusieurs protocoles qui diffèrent plus ou moins les uns des autres au sujet du milieu de culture utilisé (avec ou sans sérum de veau fœtal, avec ou sans système de coculture) et du développement embryonnaire qui peut de faire *in vitro* ou *in vivo*. Sans entrer dans les détails de ces différentes méthodes, les différentes étapes du protocole utilisé par l'INRA pour les bovins sont présentées ci-dessous (CHASTANT et RENARD 1998, HEYMAN *et al.* 1996). La **figure 1** illustre les principaux temps du protocole, avec l'exemple du transfert nucléaire de cellules embryonnaires.

Figure 1 : principales étapes de la technique de clonage par transfert de noyaux utilisée chez le bovin (source INRA)



a) Maturation *in vitro* des ovocytes receveurs

Récupération des ovaires de vaches de réforme à l'abattoir et transport jusqu'au laboratoire. La maturation *in vitro* reprend les protocoles utilisés lors de la FIV (Fécondation *in vitro*) dans l'espèce bovine (GAULON 2003).

b) Enucléation des ovocytes receveurs par micromanipulation

Même si les ovocytes obtenus par la maturation *in vitro* se trouvent au stade métaphase II, ils ne sont pas pour autant compétents pour le transfert nucléaire et doivent donc pour cela être énucléés (clichés 1-2-3-4, **figure 1**)

L'ovocyte au stade métaphase II est immobilisé par une pipette de maintien en verre. Après marquage du matériel chromosomique par un colorant vital fluorescent (Hoechst 33342) et un éclairage de faible intensité, on visualise sur un écran vidéo la position de la plaque métaphasique (cliché 4).

Une seconde pipette en verre, biseautée, de 30 microns de diamètre, traverse la zone pellucide et permet l'extraction de la métaphase ainsi que du premier globule polaire (CHASTANT *et al.*, 1998).

c) Préparation des cellules donneuses

Si la source de cellules est une culture de cellules (cellules fœtales ou adultes de cumulus, d'oviducte, d'utérus, de testicules, de peau, de foie...) (ISSENMAN 2003 ; KATO 2000), celle-ci est soumise à un traitement à la trypsine pour individualiser les cellules. Lorsque la source de cellules est un embryon, la zone pellucide est digérée par un traitement enzymatique (pronase) et les blastomères sont dissociés après passage dans un milieu sans calcium. La cellule donneuse peut être préalablement sexée si l'on souhaite obtenir un clone de sexe déterminé (cliché 5, **figure 1**).

d) Reconstitution de l'embryon

Une cellule donneuse est aspirée dans la pipette d'énucléation puis injectée dans l'espace péri vitellin. On parle donc à tort de transfert nucléaire (réalisé uniquement chez la souris), puisqu'il s'agit plutôt de transfert d'une cellule entière (clichés 6-7, **figure 1**).

e) Fusion – activation

La fusion entre les deux membranes cellulaires (celle du cytoplasme de l'ovocyte et celle de la cellule donneuse) est obtenue en soumettant l'embryon reconstitué à un champ électrique entre deux électrodes. La fusion est effective dans l'heure qui suit la stimulation électrique, qui provoque également l'activation et la reprise du développement embryonnaire en imitant l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte.

f) Développement embryonnaire et fœtal

Les embryons reconstitués sont ensuite placés en culture *in vitro*, dans un milieu contenant 2,5 % de sérum de veau fœtal et en coculture avec des cellules Vero, et ceux qui atteignent un stade suffisant (blastocyste chez les bovins) peuvent être transplantés dans l'utérus d'une femelle receveuse synchronisée, pour donner naissance à un jeune (CHASTANT *et al.*, 1998), (cliché 10 **figure 1**).

2. Résultats actuels du clonage somatique

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 mesure directement l'efficacité de la technique (COLLEAU *et al.* 1998).

Les différentes études réalisées sur le clonage sont parfois difficiles à comparer car les méthodes utilisées diffèrent notamment pour les milieux de culture, le diagnostic de gestation, et le petit nombre de clones produits rend souvent les résultats statistiques peu fiables (HEYMAN *et al.*, 2005).

a) Nombre d'animaux obtenus

Chez les bovins, les premiers veaux issus de clonage somatique dans le monde sont nés en 1998 à quelques jours d'intervalle aux Etats-Unis (CIBELLI *et al.*, 1998) et en France à l'INRA (VIGNON *et al.*, 1998). Ce premier veau français (Marguerite) issu de cellules musculaires prélevées sur un fœtus n'a pas survécu au delà de 2 mois après sa naissance en raison d'une déficience immunitaire majeure associée à une aplasie thymique (RENARD *et al.*, 1999^a). Quelques années plus tard, en 2005, on peut estimer à 1500 le nombre de veaux nés à travers le monde d'après les informations rapportées à l'IETS (International Embryo Transfer Society).

Le **tableau I** illustre le taux de survie chez des bovins issus de clonage somatique réalisé à l'INRA.

Tableau I : Taux de survie des clones somatiques bovins à l'INRA (d'après HEYMAN et al., 2005)

	Nombre vivants/nés	Taux de survie (%)
Veaux vivants à la naissance	64/72	89
Vivants après 48 h	59/72	82
Vivants après une semaine	58/72	81
Vivants à 1 mois	54/72	75
Vivant à 2 mois	52/72	72
Vivants à 6 mois	48/72	67
Adultes	47/72	65
Après réforme ou accident	42/72	58
Après mort de pathologie d'origine immunitaire	41/72	57

b) Rendement encore très variable

Plusieurs types de cellules somatiques prélevées dans différents tissus ou organes (muscle, peau, ovaire, sang...) ont été utilisés avec succès en transfert de noyaux et ont démontré leur aptitude au développement à terme des embryons reconstitués. Cependant, le rendement peut être très variable selon la source de noyaux utilisés (**tableau II**).

Tableau II: Résultats du clonage somatique chez les bovins avec différents types de cellules donneuses. (Données non exhaustives d'après résultats publiés. HEYMAN et al., 2005)

Espèce	Type de cellules donneuses (origine)	<i>in vitro</i> Blastocystes/embryons reconstitués (%)	<i>in vivo</i> Jeunes nés/embryons transplantés (%)	Rendement global Jeunes nés/embryons reconstitués (%)
Bovins	Fibroblastes (peau adulte)	12-60	5-20	0,6-3
	Fibroblastes (peau fœtale)	12-47	6-87	0,7-7
	Muscle	14	15	<1
	Leucocytes (sang)	18	2	0,3
	Glande mammaire	17-32	4-25	<1
	Cumulus (ovaire)	28-42	7-83	2-5
	Granulosa (ovaire)	16-70	3-14	0,5-2,2
	Epithelium oviducte	21-39	12-75	0,8-4

Ainsi, le transfert nucléaire bovin utilisant des cellules de donneuses différenciées, entraîne plus de pertes fœtales que le clonage embryonnaire. De même, les pertes sont plus importantes avec le clonage somatique à partir de cellules adultes que lorsque l'on utilise des cellules fœtales.

c) Une efficacité qui progresse

Au cours des cinq dernières années, les résultats du clonage somatique chez les bovins ont nettement progressé si l'on en juge par le nombre d'équipes impliquées à travers le monde et le nombre de jeunes nés, même si le rendement reste encore faible. Les progrès les plus sensibles ont été obtenus pour le développement *in vitro* des embryons reconstitués : les taux

de blastocystes après transfert de noyaux ont maintenant de l'ordre de 30 à 50 % alors qu'ils étaient inférieurs à 10 % il y a cinq ans. Ceci est dû à une meilleure maîtrise des conditions de reconstitution (cycle cellulaire, activation, culture *in vitro*...). En revanche, les taux de gestation à terme sont encore limités par des mortalités importantes et n'ont que peu progressé pendant la même période. Globalement, on peut considérer qu'en moyenne, le rendement (nombre de jeunes nés/ nombre d'embryons reconstitués) du clonage somatique chez les bovins a triplé depuis 1998 (HEYMAN *et al.*, 2005).

B. Applications possibles : perspectives

1. Etudes fondamentales sur la différenciation cellulaire

Les taux de développement obtenus soulignent les difficultés à résoudre pour reprogrammer efficacement tous les noyaux transférés. Les progrès passeront surtout par un effort accru des recherches à caractère fondamental sur les événements qui contrôlent le début du développement embryonnaire.

En recherche fondamentale, la technique du clonage somatique présente plusieurs intérêts qui concernent principalement les mécanismes de reprogrammation de l'activité des gènes et leurs conséquences au cours du développement ainsi que les mécanismes de vieillissement cellulaire (LE BOURHIS *et al.* 1998)

En travaillant sur le modèle bovin, qui est l'un des mieux maîtrisés, on devrait parvenir à mieux comprendre les échecs de développement observés après clonage, en précisant notamment s'ils sont dus à une reprogrammation défectueuse du noyau après son introduction dans le cytoplasme receveur, aux conditions de culture des ovocytes et éventuellement des cellules donneuses avant leur transfert chez les receveuses, ou bien aussi à l'hétéroplasmie mitochondriale résultant du clonage (RENARD *et al.*, 1999^a et ^b). Du point de vue fondamental, ces recherches permettent de mieux comprendre les interactions entre le noyau et le cytoplasme ainsi que les mécanismes de reprogrammation du génome.

Il est bien établi maintenant que le fonctionnement des gènes est plus complexe que la somme d'une activité de gènes en interaction avec l'environnement. En effet, une troisième composante de nature épigénétique doit être prise en compte. Les régulations épigénétiques sont celles qui affectent l'expression des gènes de manière héritable au cours des divisions cellulaires (en mitose voire en méiose) mais sans impliquer de modifications des séquences nucléotidiques de l'ADN. La méthylation de l'ADN est la modification épigénétique (empreinte génétique) la plus étudiée à ce jour. Et elle joue un rôle majeur dans la différenciation cellulaire (HEYMAN *et al.*, 2005).

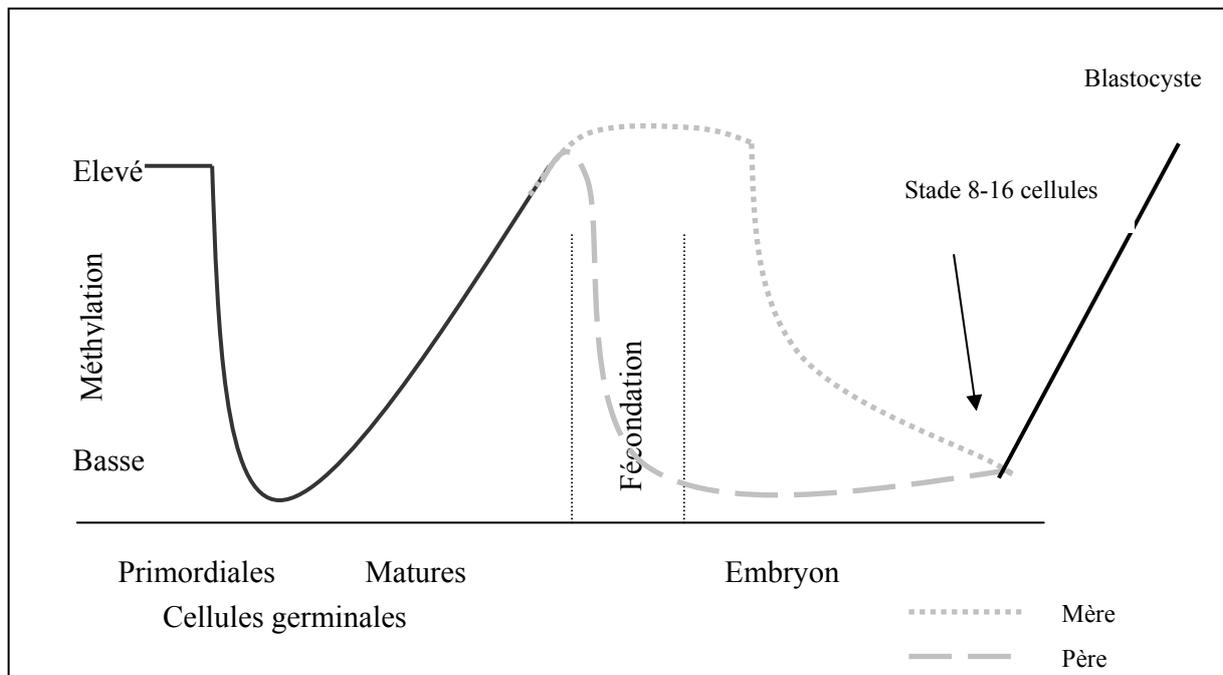
Pendant le développement des cellules germinales la reprogrammation épigénétique de la méthylation de l'ADN annule l'empreinte génomique des parents d'origine et restaure la totipotence aux gamètes. Lors de la fécondation, un second cycle apparaît, résultant de la différence asymétrique des génomes parentaux (voir **figure 2**). Ainsi, le développement des mammifères est caractérisé par la programmation par méthylation de l'ADN selon deux modes, l'un au cours du développement des cellules germinales, l'autre en période préimplantatoire de l'embryon.

Les cellules germinales primordiales entrent en développement et commencent leur différenciation et leur multiplication. A ce moment, ces cellules hautement méthylées subissent une rapide déméthylation. Cette phase de déprogrammation coïncide avec l'annulation de l'empreinte génomique (paragraphe suivant) du parent d'origine. Elle est suivie d'une phase de reméthylation qui aboutit à la formation des gamètes matures. La seconde phase a lieu entre la fécondation et la formation du blastocyste. Lors de la fécondation, on observe une déméthylation active spécifique paternelle, alors que la déméthylation du génome maternel se fait de manière passive jusqu'au stade 8 cellules, puis les méthylations sont de nouveau apposées. Au stade blastocyste, on aboutit à une distribution asymétrique de la méthylation de l'ADN entre la masse cellulaire interne (qui donnera essentiellement l'embryon) et les annexes extra-embryonnaires.

Chez les animaux issus du clonage somatique, il se produit une déméthylation passive mais pas active. Néanmoins, une reméthylation précoce intervient au stade 4 cellules, aboutissant parfois à une hyperméthylation aberrante du trophoctoderme chez les embryons clonés qui

pourrait être un marqueur précoce des fréquentes anomalies placentaires liées au clonage (SANTOS *et al.*, 2004) (**figure 2**)

Figure 2 : Reprogrammation par méthylation des gènes non soumis à l'empreinte parentale lors développement de la souris. (d'après Santos et al. (2004))



2. Diminution du nombre d'animaux nécessaires en expérimentation

La diminution de la variabilité génétique provoquée par le clonage entraînerait une augmentation du pouvoir statistique et donc un nombre diminué d'animaux pour tester un produit (COLLEAU *et al.*, 1998). Ceci intéresse notamment les immunologistes (les clones de singe sont par exemple très attendus pour la recherche contre le SIDA, utilisation de clones bovins en immunopathologie parasitaire dans l'étude de l'effet antigénique de molécules isolées de *Fasciola*) (CHASTANT *et al.*, 1998).

Les clones permettent aussi de mieux étudier les influences respectives de la génétique et de l'environnement sur une performance ou un phénomène biologique. D'après Biggers cité par PRATHER (1987), si les animaux clonés ne sont pas strictement identiques phénotypiquement, ils présentent toutefois des caractéristiques de croissance et des comportements plus similaires que des animaux non clonés choisis au hasard. De ce fait des bovins clonés de même génotype, placés dans des élevages différents, constitueraient d'excellents modèles pour étudier l'influence des facteurs d'environnement sur les performances. Ainsi les clones somatiques bovins obtenus à l'INRA sont maintenant utilisés comme modèles d'étude du déterminisme génétique de caractères complexes tels que le comportement alimentaire, la résistance aux agents pathogènes et la qualité des ovocytes pour le développement embryonnaire *in vitro* (CHASTANT *et al.*, 1998).

Une étude récente d'Archer *et al.* en 2003 (JULLIEN 2003) nuance cet intérêt : elle montre que la variabilité au sein d'un clone, pour un caractère donné, n'est pas obligatoirement diminuée, contrairement à ce qui était attendu. Par exemple, le poids à âge donné chez des truies présente une variabilité identique. L'intérêt des clones en expérimentation n'est donc réel que pour certaines études, sur des caractères peu influencés par les phénomènes épigénétiques.

3. Accélération du progrès génétique en sélection

Le clonage par transfert nucléaire est avant tout destiné aux animaux de très haute valeur génétique. Il faut toutefois pouvoir garantir l'efficacité des techniques pour éviter des aléas trop importants lors de leur application à grande échelle. Dans ce but, l'obtention d'une naissance pour seulement quatre à cinq embryons reconstitués est apparue à la fois comme un seuil à atteindre et un objectif qui ne paraît plus aujourd'hui irréaliste.

Le clonage peut permettre de diminuer le coût de la sélection : un clone de cinq filles obtenu à partir d'un embryon d'un taureau testé permet d'obtenir la même précision que 25 filles naturelles (COLLEAU, 1993). Ceci permettrait d'appliquer la sélection à des races à faibles effectifs.

Le clonage embryonnaire associé au sexage permet d'augmenter de manière importante et rapide la descendance d'un animal au patrimoine génétique intéressant. Le clonage de cellules adultes permet de reproduire directement cet individu.

C'est dans ce but qu'au Canada des tissus du taureau Hanoverhill Starbuck ont été prélevés et congelés, peu de temps avant sa mort. Le succès commercial mondial de ce taureau Holstein a incité ses propriétaires à demander son clonage. C'est une collaboration entre l'équipe de l'Université Vétérinaire de Montréal, celle du Centre d'Insémination du Québec et l'Alliance Boviteq, qui est à l'origine de Starbuck II, né en septembre 2000, après la reconstitution de 68 ovocytes. Starbuck II est aujourd'hui collecté par Semex Alliance, mais aucune de ses paillettes n'a pu être vendue faute d'autorisation du gouvernement fédéral (JUILLIEN, 2003).

En effet sur le plan juridique, peu de juridictions se sont clairement prononcées sur la commercialisation des produits issus d'animaux clonés. En France, c'est un moratoire provenant de l'Institut National de Recherche Agronomique, daté du 6 juillet 1999, qui précise qu'« il est formellement interdit de procéder à la mise sur le marché de tout produit issu de clones somatiques (et embryonnaires) ainsi que des ces animaux eux-mêmes et de leur

descendance ». Aujourd'hui, seul le Japon autorise la consommation de la viande d'animaux issus de transfert nucléaire de cellule embryonnaire.

Comme autre avantage, clonage pourrait offrir une garantie en cas d'accident d'un jeune reproducteur mâle mis au testage.

Le clonage permettrait de multiplier des taureaux à index élevé et de les introduire pour la monte naturelle dans des systèmes extensifs de production de viande, ce qui permettrait de compenser la difficulté de pénétration de l'IA (Insémination Artificielle) en élevage viande (HEYMANN *et al.*, 2005).

Dans le domaine hippique, le clonage des chevaux de CSO (Compétition de Saut d'Obstacles) qui sont pour 50 à 70% des hongres et la grande héritabilité des fibres musculaires permettrait la sélection de champions.

4. Standardisation de la qualité

La viande de bœuf de Kobé est mondialement connue par ses qualités culinaires dues à l'aspect persillé de la viande. Les bovins de Kobé (Japanese Black beef) sont habituellement produits par IA, en utilisant de la semence d'un nombre très restreint de taureaux d'élite, cette semence est donc très chère. Il y a donc un intérêt considérable à utiliser la technologie du clonage somatique afin de produire des copies de ces élites.

5. Sauvegarde d'espèces

Le clonage peut aussi être utilisé dans la sauvegarde de races en voie de disparition afin de restaurer un certain nombre de génotypes qu'il faut ensuite reproduire par voie sexuée. Par exemple en Nouvelle Zélande, la race bovine « Enderby island » vivant en autarcie sur une île déserte sub-antarctique avait pratiquement disparue à la suite d'une épizootie. En 1999, il ne restait plus qu'une seule femelle âgée et des cellules de cumulus récupérées sur cet animal lors d'une tentative de ponction d'ovocytes pour la fécondation *in vitro*, ont été utilisées pour

le clonage. Une vingtaine de clones de cette femelle ont pu être produites (WELLS *et al.*, 1998 et 1999^b) et mises à la reproduction par IA avec le sperme de 9 taureaux de cette même race qui avait pu être mis en réserve avant l'épizootie. De la même façon en France à l'INRA, une des dernières vaches « Bleu de Bazougers » a été clonée à titre expérimental. Cette vache clonée maintenant adulte s'est développée normalement, a été inséminée et a donné naissance à 2 descendants après IA avec le sperme de l'un des taureaux conservé. (HEYMAN *et al.*, 2005).

Le transfert de noyaux somatiques issus de génotypes sauvages rares peut également être envisagé, mais la difficulté dans ce cas sera d'obtenir des ovocytes receveurs en quantité suffisante alors que le nombre de représentants de l'espèce est faible. Des essais sont actuellement en cours pour réaliser des transferts de noyaux interspécifiques, par exemple, transfert de cellule de bouquetin du désert (*Ovis canadensis mexicana*) dans des ovocytes de brebis domestique. Ainsi, un daim a été cloné pour la première fois au Texas (HEYMAN *et al.*, 2005). Cependant, même si un clone de bovidé Gaur a pu se développer jusqu'à la naissance dans une vache porteuse (HAMMER, cité par HEYMAN *et al.*, 2005), le jeune n'était pas viable et il importe de mieux comprendre les mécanismes de reprogrammation du noyau dans un cytoplasme hétérologue afin de mieux maîtriser cet aspect. La difficulté peut aussi venir des mères porteuses qui doivent être le plus proche possible de l'espèce dont on veut obtenir le clone.

6. Création d'un fonds génétique dans l'espèce bovine

Des banques d'embryons de races menacées se constituent actuellement, en France comme ailleurs (LAMBOY, 1997). Dans ce contexte, la collaboration de plusieurs laboratoires de l'INRA a par exemple conduit à la création d'une embryothèque de différentes races de lapins afin de rassembler un « fonds génétique » pour cette espèce. L'objectif étant d'étendre cette organisation à d'autres espèces que le lapin, plus spécialement aux bovins et pour y parvenir, le clonage serait fort utile (GAULON, 2003).

7. Obtention d'animaux génétiquement modifiés

Cet objectif peut être réalisé à partir de lignées cellulaires génétiquement modifiées, dans lesquelles on aura pu vérifier le niveau d'expression du transgène. Le clonage devient alors une technique puissante, qui pourrait venir en compétition de la transgénèse classique par micro-injection des embryons au stade une cellule. Cette voie intéresse au plus haut point les laboratoires pharmaceutiques, qui voient là une possibilité d'obtenir plus efficacement de grands lots d'animaux produisant dans le lait ou le sang des protéines d'intérêt pharmaceutique (sérum albumine recombinante humaine).

BROPHY *et al.*, en 2003, ont introduit dans les fibroblastes bovins des copies de gènes codant pour les caséines bêta et kappa. Les vaches obtenues par transfert nucléaire de ces fibroblastes ont produit un lait enrichi de 8 à 20% en caséine bêta et deux fois plus riche en caséine kappa (ISSENMANN, 2003).

L'obtention d'animaux génétiquement modifiés ont un rôle important en médecine humaine notamment : les xénogreffes chez l'homme à partir du porc ou la production d'animaux modèles de certaines pathologies humaines comme la mucoviscidose, et en médecine vétérinaire avec la production de vaches résistantes aux mammites.

Enfin, même l'agro-industrie pourrait se servir d'animaux génétiquement modifiés avec la production de biomatériaux par exemple les monomères de soie d'araignée (CHAVATTE Communication personnelle).

C. Problèmes soulevés

1. Préservation de la variabilité génétique

Il est important de garder à l'esprit que la sélection a une double mission : en premier lieu elle doit générer un progrès génétique répondant à une demande conjoncturelle mais dans un même temps, elle doit permettre de conserver une diversité génétique entre races et inter-race suffisante pour être en mesure de répondre à la demande du lendemain.

Si les animaux clonés sont des individus génétiquement identiques, l'utilisation intempestive de cette technique au sein d'une espèce donnée, pourrait entraîner une perte importante de la variabilité génétique de celle-ci.

2. Conditions nécessaires pour l'application commerciale du clonage

A l'origine, l'intérêt commercial du clonage résidait dans la production d'un grand nombre d'animaux jugés génétiquement supérieurs d'un point de vue zootechnique. De nombreuses compagnies mirent alors en place des programmes de recherche intensifs. Cependant, elles furent confrontées à de nombreuses difficultés notamment au faible taux de réussite et aux difficultés du reclonage. De plus, le poids élevé à la naissance, les anomalies néonatales et le faible taux de survie des veaux clonés étaient et continueront à être un problème majeur. Pour l'instant, le clonage à grande échelle n'est donc pas financièrement rentable (STICE *et al.* 1998).

Par contre, l'utilisation commerciale du clonage afin de produire des animaux transgéniques n'est pas limitée par le faible taux de réussite de la technique. En effet, seuls quelques individus sont nécessaires en transgénèse. Un point clé de cette stratégie est d'utiliser des lignées de cellules dont le noyau est génétiquement modifié avant de les utiliser dans le

processus de transfert nucléaire. Cela permet d'éliminer une génération d'animaux et tous les animaux produits sont transgéniques.

3. Coût de la recherche scientifique

Le coût journalier de la production d'embryons clonés est d'environ 100\$ par jour. Le coût pour la production d'un veau cloné varie avec le taux de survie des animaux et est donc extrêmement variable (**tableau III**) de 26 131 \$ à 5 339 \$! Le taux de mise bas est donc un facteur majeur de réduction du coût du clonage.

Tableau III : Simulation du coût de production d'un veau cloné (d'après FABER et al. 2004)

Nombre d'embryons implantés/ receveuse	2							
Taux gestation 40j (%)		30	35	40	45	50	55	60
Gestations à 40j arrivant à terme		25	30	35	40	45	50	55
% de vêlage		7,5	10,5	14	18	22,5	27,5	33
Taux de survie (%)		50	55	60	65	70	75	80
% veaux vivants		3,75	5,78	8,4	11,7	15,75	20,63	24,6
Coût total par veau produit (\$)		26 131	17 868	12 996	9 909	7 841	6 392	5 339

4. Position du public

Les crises de l'ESB et de la fièvre aphteuse ont suscité un important intérêt du public en matière de sécurité alimentaire et une méfiance envers les différents intervenants de la filière. La perception par le public du clonage est différente selon l'usage que l'on prévoit d'en faire. Le développement de nouveaux vaccins grâce au clonage associé à la transgénèse est largement accepté au contraire de la production d'animaux d'élevage aux capacités de croissance accrues.

5. Ethique et politique

Si les intérêts du clonage sont nombreux, la technique soulève des questions d'éthique importantes. Un comité d'éthique interne à l'INRA s'est penché sur la question et a approuvé les travaux effectués pour la recherche fondamentale, pour des aspects médicaux (lapins clones transgéniques comme modèles de la mucoviscidose, chèvres dans la recherche contre l'infertilité...), mais pas pour des applications zootechniques à visée commerciales.

L'Unité de Biologie du Développement et Reproduction de Jouy-en-Josas est en France la seule formation de recherche qui étudie, en collaboration étroite avec des professionnels de l'élevage (UNCEIA), le clonage des ruminants. Cette unité de recherche fait partie du département PHASE (Physiologie Animale et Système d'Élevage) de l'INRA qui a proposé de regrouper les recherches sur le clonage et la transgénèse animale. Les règles proposées pour valider les projets de recherche sont différenciées selon une grille d'évaluation qui prend notamment en compte des critères d'acceptation par la société. Cette démarche constitue une première étape vers la mise en place de procédures originales associant, dès l'élaboration d'un programme de recherche « sensible », des scientifiques de différentes disciplines, sciences biologiques et sciences humaines. La question essentielle du vivant naturel et artificiel posée par les clones fait l'objet d'un travail en commun avec des philosophes, dans le cadre d'un programme de Ministère de la Recherche. (HEYMAN *et al.*, 2005). Ces travaux devront s'ouvrir à d'autres composantes de la société et contribuer ainsi à renforcer, à partir de questionnements très concrets, l'information et l'éducation du citoyen sur les biotechnologies (OUEDRAOGO *et al.*, 2004).

D. Anomalies rencontrées chez les clones

1. Pendant la gestation

De nombreuses anomalies placentaires au cours des gestations des clones ont été décrites par de nombreux auteurs. Elles sont récapitulées dans le **tableau IV**.

Tableau IV: Anomalies placentaires rencontrées au cours de gestations de clones par divers auteurs (d'après ISSENMANN, 2003).

Anomalies des annexes embryonnaires	Références
Hydramnios	ECTORS <i>et al.</i> (1997), YOUNG <i>et al.</i> (1998), HILL <i>et al.</i> (1999), CHAVATTE - PALMER <i>et al.</i> (2000), FORSBERG <i>et al.</i> (2002), PACE <i>et al.</i> (2002).
Hydroallantoïde	KRUIP et DEN DAAS (1997), CIBELLI <i>et al.</i> (1998), HILL <i>et al.</i> (1999), WELLS <i>et al.</i> (1999) ^a , CHAVATTE-PALMER <i>et al.</i> (2000 et 2002), FORSBERG <i>et al.</i> (2002), HEYMAN <i>et al.</i> (2002), PACE <i>et al.</i> (2002).
Placenta oedémateux	ECTORS <i>et al.</i> (1997), CIBELLI <i>et al.</i> (1998), HILL <i>et al.</i> (1999), CHAVATTE-PALMER <i>et al.</i> (2000 et 2002), LEE <i>et al.</i> (2003).
Placentomes moins nombreux et plus gros que la normale	HILL <i>et al.</i> (1999), CHAVATTE- PALMER <i>et al.</i> (2000 et 2002), HEYMAN <i>et al.</i> (2002), LEE <i>et al.</i> (2003).
Hypoplasie des annexes embryonnaires	DE SOUSA <i>et al.</i> (2000), HILL <i>et al.</i> (2000).
Rétention placentaire	HILL <i>et al.</i> (1999).
Vascularisation réduite du placenta	HILL <i>et al.</i> (2000).

a) Pertes rencontrées au premier trimestre.

Les pertes précoces des gestations issues de transfert nucléaire ont été récemment associées à une vascularisation placentaire anormale. (WELLS *et al.*, 2003, HILL *et al.*, 2000) ont ainsi comparé, après abattage entre 45 et 55 jours de gestation, le placenta de deux vaches porteuses de clones vivants à celui de deux gestations naturelles. Chez les clones, ils notent la quasi absence de développement cotylédonaire, avec seulement quelques ébauches de 5 mm

de diamètre, associée à une vascularisation placentaire diminuée et des caroncules plus petites que pour les témoins. De même, DE SOUSA *et al.*, en 2000, trouvent de nombreuses anomalies placentaires, notamment une hypoplasie chorionique sur des clones ovins observés à 35 jours de gestation. Dans ces études, les fœtus présentant des anomalies placentaires étaient de petite taille mais sans anomalie anatomique : tout ceci suggère que les pertes fœtales précoces de clones bovins et ovins pourraient être dues à une vascularisation placentaire anormale, entraînant l'affaiblissement du fœtus et sa mort.

De plus, d'après WELLS en 2003, la placentation anormale est la cause principale des pertes lors de la gestation des receveuses et contribue à la future santé des clones. Ce qui mérite une attention particulière est la forte incidence d'hydroallantoïdie. La fréquence de ce syndrome s'accroît avec le degré de « reproduction assistée » (**Tableau V**).

Tableau V : Incidence de l'hydroallantodie en fonction de la technique de reproduction utilisée (d'après WELLS, 2003)

Monte naturelle	IA	FIV	Clonage somatique
0,01 %	0,1%	2%	28 %

b) Pertes des deuxième et troisième trimestres

Les pertes tardives sont très rares au cours des gestations naturelles, contrairement aux gestations de clones, surtout pour les clones issus de transfert nucléaire de cellules somatiques adultes. Il est reconnu que ces pertes tardives sont associées à un excès de poids fœtal et un développement placentaire anomal : hydroallantoïde, hydramnios et placentomes oedémateux (YOUNG *et al.* 1998).

La tailles et le nombre de ces placentomes ont été observés chez 10 porteuses de clone présentant un hydroallantoïde, en comparaison avec quatre témoins (ALLEN *et al.*, 2003) : les placentomes des porteuses de clones étaient en nombre significativement réduit (68 +/- 22

contre 96 +/- 34) et de poids supérieur (138,2 +/- 52,1 g contre 64,6 +/- 36,5 g). De plus le poids total des placentomes, malgré leur nombre réduit était significativement plus élevé que chez les témoins (9,3 +/- 3,8 kg contre 5,5 +/- 2,1 kg).

Ce phénomène rappelle celui de la croissance compensatrice des placentomes restant après l'ablation de certaines caroncules chez la brebis (ROBINSON *et al.*, 1979). L'absence de reconnaissance des caroncules par l'allantochorion pourrait donc être à l'origine de cette anomalie. L'aspect et la taille des placentomes peuvent être observés par l'échographie transabdominale. L'autopsie de ces fœtus a révélé systématiquement un rapport entre le poids des organes et le poids corporel plus élevé que la normale pour les reins et le cœur et plus petit pour les poumons et la rate (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2000).

2. Chez les jeunes de 0 à 4 mois

En ce qui concerne le poids de naissance, la plupart des auteurs rapportent des poids de naissance plus élevés chez les clones que chez les témoins. (WILSON *et al.*, 1995 ; GARRY *et al.*, 1996 et 1998 ; KRUIP et DEN DAAS., 1997 ; YOUNG *et al.*, 1998 ; WELLS *et al.* 1999^a ; KATO *et al.*, 2000 ; KUBOTA *et al.*, 2000 ; CHAVATTE – PALMER *et al.* 2000 et 2002 ; HEYMAN *et al.*, 2002 ; PACE *et al.*, 2002). Ce surpoids est très variable : deux fois la normale de l'espèce n'est pas rare et on a trouvé un agneau dont le poids était cinq fois supérieur à la moyenne (WALKER *et al.*, 1996). Cet excès de croissance à l'origine de fréquentes dystocies et les gestations associées souvent prolongées avec une mauvaise préparation de la mère porteuse à la mise bas impliquent, la plupart du temps, la pratique d'une césarienne.

Contrairement à ce que l'on trouve dans la littérature, dans l'étude clinique menée par l'INRA (ISSENMANN, 2003) sur 35 veaux clones somatiques et 15 témoins d'IA, le poids de naissance n'était pas significativement différent entre les clones et les témoins. Le nombre important de veaux inclus dans l'échantillon clone (n=35) explique peut-être cette différence ; en effet, pour les clones, l'écart type était élevé, d'environ 10, alors que pour les témoins il n'était que de 5 et l'on sait que les écart types sont influencés par le nombre d'animaux de

l'échantillon donc les écart types plus importants chez les clones pourraient être dus au nombre plus important de clones (n=35) que de témoins (n=15).

A la naissance le tableau clinique des clones est très variable. Si certains ne semblent présenter aucun trouble, des difficultés respiratoires, l'absence de réflexe de succion, des insuffisances cardiaques gauches, des morts subites ont souvent été décrites (HILL *et al.*, 1999^a, CHAVATTE – PALMER *et al.*, 2000), et des cas plus rares d'aplasie thymique (RENARD *et al.*, 1999^a), des malformations ont été également rencontrées. Chez certains veaux l'augmentation de la taille des vaisseaux ombilicaux impose une intervention chirurgicale pour les ligaturer et les internaliser afin d'éviter les infections (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2000). Des nouveaux nés hypothermiques, hypoglycémiques ou en sévère acidose métabolique et en hypoxie suggèrent une altération du métabolisme énergétique pouvant expliquer la faiblesse et la forte mortalité périnatale.

Les causes de mort précoce incluent essentiellement des défaillances du système cardiovasculaire et rénal, mais aussi des hémorragies internes, de sévères malformations squelettiques nécessitant l'euthanasie, des problèmes gastro-intestinaux ainsi que des défaillances organiques multiples (en accord avec d'autres publications) incluant hydrocéphalie et de nombreuses infections virales et bactériennes (WELLS, 2003).

3. Le cas particulier du syndrome du gros veau ou LOS (Large Offspring Syndrom)

En fin de gestation, un terme général donné pour caractériser les problèmes à la naissance des clones, appelé syndrome du gros veau ou large offspring syndrom (LOS), provoque une importante mortalité fœtale et néonatale (YOUNG *et al.* 1998 ; WALKER *et al.* 1996). Ce syndrome est associé à des lésions et une insuffisance placentaire, ainsi que des anomalies fœtales. Il a aussi été décrit chez des animaux produits par FIV.

Ces veaux sont plus gros à la naissance, la fréquence des dystocies et la durée de gestation sont augmentées. Des difficultés respiratoires sont fréquentes, ainsi que l'absence de réflexe

de tétée. Des morts subites néonatales peuvent survenir. Des anomalies placentaires sont souvent associées (hydramnios ...).

CHAVATTE-PALMER *et al.* (2000) ont observé le LOS dans de nombreux cas. A l'autopsie, le rapport entre le poids des organes et le poids corporel était systématiquement plus élevé que la normale pour le cœur et les reins et plus petit pour les poumons et la rate. On avait donc une croissance asynchrone des organes.

HEYMANN *et al.* (2002) ont observé une incidence du LOS plus importante pour les clones somatiques (13,3 %) que pour les clones embryonnaires (8,6%) ou les veaux FIV (9,5%). Ces pourcentages sont toujours moins importants que ceux qui avaient été observés par KRUIP et DEN DAAS (1997) : 14,4% des veaux produits par FIV pesait plus de 60 kg. Cependant l'incidence du LOS dépend de la cellule donneuse et du milieu de culture. KATO *et al.* (2000) ont montré qu'avec des cellules du cumulus ou de l'oviducte, les poids de naissance étaient dans la normale, alors que 47% de LOS (9 cas sur 19 veaux) ont été observés avec des cellules de peau, d'oreille ou de foie.

E. Causes possibles de ces anomalies

Nous ne pouvons parler que de causes potentielles car, si les manipulations subies *in vitro* sont mises en cause avec certitude, ni l'influence exacte des différents paramètres, ni les mécanismes mis en jeu ne sont connus actuellement. En effet, l'incidence du LOS après manipulation d'embryons varie de 0 à presque 100% ; il apparaît de manière inconstante même entre deux études utilisant le même protocole ou pour une même équipe, entre deux périodes différentes. Il est ainsi imprévisible, ponctuel et ses manifestations sont pléiotropiques, c'est à dire que les signes cliniques peuvent varier considérablement, en particulier en période post-natale.

1. Bases physiologiques et moléculaires du syndrome de gros veau

Une hypothèse plausible consiste à penser que les manipulations subies par l'embryon bovin au cours des premières étapes de la procédure de clonage par transplantation nucléaire, et plus précisément avant la mise en route du génome embryonnaire, influencerait la transcription d'un ou de plusieurs gènes associés au développement embryonnaire précoce. Toutefois, les facteurs épigénétiques en cause n'ont pas encore été bien identifiés (RENARD *et al.*, 1999, WALKER *et al.*, 1996).

2. Les facteurs cytoplasmiques

Chez la souris, WALKER *et al.*, (1996) signalent que la manière dont certains facteurs cytoplasmiques interagissent avec le noyau était fondamentale pour le bon déroulement des premières étapes du développement embryonnaire. Selon plusieurs auteurs cités par WALKER *et al.*, (1996), des déficiences de cette régulation extragénique pourraient se traduire par des anomalies du développement ainsi que par des inhibitions de la transcription de la méthylation de certains gènes. Par exemple, lors d'une procédure de transfert nucléaire menée dans l'espèce bovine, la perte d'une portion substantielle de cytoplasme, par fragmentation suite aux segmentations successives de l'embryon reconstitué cultivé *in vitro*, ou lors de l'énucléation des ovocytes receveurs, suffirait à compromettre la reprogrammation du noyau transféré.

De même, les conditions de culture *in vitro* des embryons bovins reconstitués par transfert de noyau influencent la viabilité des développements à terme à travers des mécanismes épigénétiques (HEYMAN *et al.* 1996, NUMABE *et al.*, 2000, RENARD *et al.* 1999^b, HIENDLDER *et al.*, 2004^b). Notamment, il semblerait que l'intégrité des organites et des membranes cytoplasmiques des cellules embryonnaires puisse être fragilisée par des variations qualitatives de la composition du milieu de culture, et qu'en conséquence, les interactions noyau – cytoplasme essentielles au développement précoce de l'embryon bovin se trouveraient perturbées.

On sait que l'exposition aux conditions de culture *in vitro* peut à elle seule perturber l'embryon car des embryons ovins produits *in vivo* après superovulation, récupérés et cultivés six jours *in vitro*, présentent un poids moyen à 125 jours de gestation supérieur de 18 à 36% à la moyenne, selon le système de culture utilisé (SINCLAIR *et al.* 1998).

Le point commun entre les événements pouvant conduire au syndrome des l'exposition de l'ovocyte ou de l'embryon à un environnement inhabituel. La perturbation pourrait être engendrée soit par l'exposition de l'embryon à un facteur non présent normalement au stade de développement considéré, soit à un facteur présent mais à une autre concentration.

Les milieux de culture actuels utilisent des sérums, dont l'origine et la concentration varient, et/ou des systèmes de co-culture. Les nombreux composants des ces systèmes sont autant de facteurs susceptibles de perturber le développement embryonnaire. On pense ainsi aux facteurs de croissance présents dans les sérums et produits par les cellules de co-culture et pour lesquels les embryons possèdent des récepteurs. De nombreuses études ont montré leur rôle dans la prolifération cellulaire et le métabolisme des blastocystes en développement (JUILLIEN, 2003).

Une autre hypothèse est celle d'altérations du pH intracellulaire qui est un régulateur naturel de la croissance embryonnaire : des modifications subtiles du milieu de culture pourraient être suffisantes pour altérer la croissance embryonnaire puis fœtale par le biais du pH.

L'utilisation de SOF (synthetic oviductal fluid) en remplacement des sérums, en réduisant la fréquence du LOS de manière significative (SINCLAIR *et al.* 1997), a donné beaucoup d'espoir aux chercheurs. Mais des anomalies ont malgré tout été rencontrées avec le SOF, accompagnées de rendements en blastocystes, de taux de gestation et de survie embryonnaire après congélation beaucoup plus faibles.

3. L'environnement utérin

Dans la procédure de clonage, l'embryon est transféré dans l'utérus d'une receveuse synchronisée avec l'âge de l'embryon. Cependant, on sait que les embryons produits *in vitro* peuvent se développer à une vitesse différente de celle des embryons produits *in vivo* (VAN WAGTENDONK DE LEEUW *et al.*, 2000). Ceci pourrait donc entraîner un transfert asynchrone de l'embryon cloné. Or, il a été montré que le transfert asynchrone d'embryons ovins dans des receveuses à un stade plus avancé entraîne une croissance embryonnaire anormale (WILMUT cité par JUILLIEN, 2003). De même, l'administration de progestérone pendant les premiers jours de gestation (J1 à J3) chez la brebis, en provoquant un développement plus rapide de l'utérus que de l'embryon, est suffisant pour diminuer nettement la survie embryonnaire et augmenter la masse fœtale à mi-gestation chez les fœtus survivants (d'après KLEEMAN cité par JUILLIEN, 2003). Le même phénomène se produit quand les brebis sont nourries avec un régime riche en urée : la perturbation de l'environnement utérin affecte probablement des voies de signalisation, les facteurs de croissance échangés entre l'embryon et l'endomètre maternel et pourrait résulter en un environnement enrichi en nutriments, favorisant ainsi la croissance embryonnaire (BARNES cité par JUILLIEN 2003). Un seuil subtil doit exister entre une stimulation produisant de gros embryons et des concentrations toxiques menant aux pertes embryonnaires et fœtales.

4. Les mutations génétiques : les mitochondries et les cellules somatiques adultes

Le génome mitochondrial est dix fois plus susceptible de subir des mutations que l'ADN nucléaire et ces mutations pourraient mener à des désordres métaboliques puisque l'ADN mitochondrial code entre autres pour des enzymes impliquées dans la voie de synthèse des stéroïdes. Dans un processus normal de fécondations, le spermatozoïde apporte une centaine de mitochondries mais elles sont rapidement détruites et il ne reste plus que les 100 000 mitochondries ovocytaires d'origine maternelle. Pendant le clonage, les mitochondries de la cellule donneuse sont en petite quantité par rapport à celle de l'ovocyte mais elles persistent. Des mutations dans leur génome suivies d'une distribution hétérogène de ces mitochondries

au cours des divisions cellulaires peuvent aboutir à des anomalies de la croissance embryonnaire (SMITH *et al.* 2000, CHAVATTE – PALMER *et al.* 2000, HIENDLEDER *et al.* 2004^c).

Les avortements tardifs à plus de 200 jours de gestation, sont surtout rencontrés chez les clones dérivés de cellules adultes (KATO *et al.*, 2000, HEYMAN *et al.*, 2002). Ces avortements suggèrent un défaut d'expression des gènes nécessaires au développement fœtal tardif. La cause de ce taux d'avortement élevé pour les clones somatiques adultes n'est pas déterminée mais une piste proposée par KATO *et al.*, (2000) est la présence de mutations génétiques induites par les rayonnements UV, les cellules de peau et d'oreille étant particulièrement exposées : des modifications dans les gènes contrôlant la morphogenèse pourraient induire un risque élevé d'avortement ou d'anomalies.

5. L'empreinte parentale

L'empreinte parentale correspond à l'inactivation spécifique par épigénèse d'un allèle d'un gène en fonction de son origine paternelle ou maternelle. Il y a entre 100 et 1000 gènes soumis à l'empreinte dans le génome des mammifères, et environ 40 ont été identifiés chez la souris et l'homme, la plupart jouant un rôle dans la croissance et le développement embryonnaire, fœtal ou placentaire, comme le montrent les exemples présentés dans le **tableau VI**.

Tableau VI : Gènes soumis à l’empreinte qui peuvent jouer un rôle dans le développement fœtal (d’après YOUNG et al., 2000).

Gène	Fonction
U2af1	Facteur d'épissage de l'ARN
Peg 3	Protéine à doigts de zinc
P57 / Kip2	Régulateur du cycle cellulaire
Xist	régulation du chromosome X
Peg1 / Mest	Comportement maternel
Mash 2	Croissance du trophoblaste
Ins 2	Régulation du développement du sac vitellin
IGF2, H19, IGF2R	Croissance fœtale et développement

Pour MONK, REIK, ainsi que SAPIENZA, cités par WALKER *et al.* (1996), l’une des composantes les plus importantes de l’empreinte parentale est représentée par la méthylation. Or, d’après WALKER *et al.* (1996), HOWLET et REIK, ont montré que, lorsque l’embryon ovin est l’objet de manipulations avant d’être transféré chez une receveuse, des séquences entières de gènes subissent des déméthylations parfois importantes lors des stades précoces de segmentation embryonnaire. Ceci concerne des gènes impliqués dans le développement fœtal, comme par exemple, le gène codant pour le facteur de croissance IGF-2, ou celui codant pour son récepteur. Le niveau d’expression de ces gènes se trouve alors modifié. GARRY *et al.* (1998), ont démontré que la concentration plasmatique en IGF-2 des fœtus clonés était significativement inférieure à celle de fœtus témoins non clonés. Les conséquences de tels changements sur le développement placentaire ou fœtal paraissent évidentes (NUMABE *et al.* 2000). C’est chez l’homme et la souris que ces phénomènes ont été le plus étudiés. Chez l’homme, la surexpression de IGF2 par la perte de l’empreinte entraîne un syndrome d’excès de développement, le syndrome de Beckwith–Wiedemann, caractérisé par une grande taille à la naissance, une surcroissance des organes et une augmentation de la fréquence des tumeurs pendant l’enfance (YOUNG *et al.*, 2000).

Par ailleurs, YANG *et al.*, (2005) ont montré que certains de ces gènes soumis à l'empreinte parentale sont effectivement affectés chez les veaux clonés qui ne survivent pas alors que leur expression est correcte chez ceux qui survivent.

De plus, les noyaux donneurs se trouvant en phase G0 subirait, au moment même de leur greffe dans des ovocytes receveurs énucléés, une inactivation temporaire d'un ou de plusieurs de leurs gènes portés par le chromosome X. La réactivation de ces gènes interviendrait à des moments variables du développement embryonnaire précoce, de façon plus ou moins complète (réactivation totale, partielle ou nulle des gènes concernés). De tels défauts de reprogrammation des gènes du noyau transféré conduiraient inévitablement à des anomalies du développement fœtal (WALKER *et al.* 1996).

6. Le statut immunitaire

Au cours d'une gestation normale, le premier trimestre voit le contact entre l'endomètre et l'allantochorion s'initier avec l'implantation vers la quatrième semaine de gestation, puis s'accroître de façon très importante avec le développement de microvillosités, des cotylédons et l'augmentation de la vascularisation. Durant cette période et jusqu'au cinquième mois, le trophoblaste n'exprime pas de molécules du CMH-1 (Complexe majeur d'Histocompatibilité de classe 1) dont le rôle est de présenter à la surface des cellules des peptides provenant de la dégradation des molécules internes. De cette présentation découle la reconnaissance par les lymphocytes des cellules du soi et du non - soi.

HILL *et al.*, (2002) ont cherché à mettre en évidence si une incompatibilité immunologique pouvait être mise en cause dans les pertes précoces des gestations de clones, car elles surviennent principalement dans la période d'implantation. Pour cela, ils ont prélevé plusieurs échantillons de placenta (endomètre *et* allantochorion) des cotylédons et des zones intercotylédonnaires de la corne utérine gravide, chez huit porteuses de clone entre 34 et 63 jours de gestation et huit témoins dans les mêmes stades de gestation. Au moment de la récupération des placentas trois clones de 3 jours étaient morts depuis moins de trois jours (après la dernière vérification échographique) et un fœtus témoin également. L'évaluation du

stade de gestation par la taille du fœtus a révélé des retards de croissance chez 4 des 6 clones de 35 jours.

Des analyses immunohistochimiques ont mis en évidence l'expression du CMH-1 par le trophoblaste de tous les clones de l'étude mais chez aucun des fœtus témoins. Le niveau de cette expression était maximum pour le clone présentant le plus grand retard de croissance, retrouvé mort, mais la relation entre le niveau d'expression et l'apparente viabilité du clone n'est pas retrouvée dans tous les cas. Les analyses de l'endomètre ont permis de quantifier la présence des lymphocytes CD3+, sous forme d'agrégats ou de cellules éparses. L'endomètre des porteuses de clones présentait un nombre d'agrégats de lymphocytes significativement plus important (dans près de 37% des champs observés) que pour les témoins (moins de 2% des champs) et ces agrégats étaient de plus grande taille (entre 200 et plusieurs milliers de lymphocytes pour ceux des porteuses de clone contre moins de 200 pour les témoins).

Le nombre accru de lymphocytes dans les gestations des clones et leur distribution dans l'endomètre suggèrent un recrutement actif en réponse à un stimulus antigénique fort. De plus, le nombre de lymphocytes était maximal au niveau de l'endomètre, lorsque les gestations des clones étaient récemment interrompues, ce qui ne peut pas être relié à la mort fœtale en elle-même car on ne retrouve pas ce phénomène chez le fœtus témoin mort.

La conclusion de cette étude est qu'un défaut d'expression des gènes liés au CMH-1, probablement induit par le clonage, est probablement à l'origine d'une réaction immunitaire de l'endomètre, qui pourrait entraîner un défaut de fonctionnement trophique du placenta, avec pour conséquence un défaut de croissance fœtale voir une mort fœtale.

Une réserve émise par ces auteurs est l'utilisation, dans leur étude, d'embryons issus d'une unique lignée cellulaire. Des résultats différents ont ainsi été trouvés à l'INRA avec d'autres lignées cellulaires, ce qui permet d'affirmer que ce mécanisme n'est pas général (CHAVATTE-PALMER communication personnelle).

7. Syndrome du gros veau ou plutôt syndrome du gros placenta ?

Le placenta normal des bovins est composé de 60 à 120 placentomes, qui sont des structures en forme de champignon, distribuées le long de la muqueuse utérine grâce auxquelles les villosités fœtales (cotylédons) et les cryptes maternelles (caroncules) sont étroitement enchâssées. Les placentomes apparaissent vers le 2^{ème} mois de gestation et sont tous en place à la fin du premier trimestre. Avant la formation des placentomes, vers le 20^{ème} jour de gestation, les échanges foeto-maternels se font grâce à des microvillosités interdigitées qui commencent à se développer entre l'épithélium utérin et trophoblastique (CONSTANT *et al.*, 2006). CONSTANT *et al.*, en 2006, ont comparé la composition tissulaire des placentomes de vaches porteuses témoins et de vaches porteuses de clones somatiques dont la gestation était compliquée par une hydroallantoïdie (NTH = Nuclear Transfert recipient-cows with hydroallantois), et ont relié ces données au poids fœtal et placentaire afin d'établir une relation entre la croissance foetale et placentaire. Pour cela, ils ont étudié l'organisation structurale des placentomes par stéréologie au moment de l'apparition des signes cliniques. L'analyse stéréologique est une technique de morphométrie qui permet à partir de coupes histologiques en 2D, d'obtenir la structure en 3D.

Les données macroscopiques montrèrent que la croissance excessive du placenta précédait celle du fœtus et que le rapport poids du fœtus sur poids total des placentomes était plus faible chez les NTH que chez les témoins après le 220^{ème} jour de gestation. Cela suggère que la croissance excessive du placenta est due à un défaut du placenta lui-même plutôt qu'à une croissance excessive du fœtus. D'ailleurs, l'analyse stéréologique a confirmé cette hypothèse en montrant un dérèglement primaire de la croissance des tissus cotylédonaires. Les altérations observées telles qu'un amincissement de l'épithélium maternel au sein des placentomes et un accroissement de la surface trophoblastique pourraient être des adaptations secondaires. Les nombreux exemples de déficience placentaire observés, suggèrent que les anomalies fœtales décrites chez les veaux des NTH, comme la cardiomégalie, l'omphalomégalie et les ascites abdominales, sont des conséquences d'un dysfonctionnement placentaire. Ainsi, il vaudrait mieux parler de syndrome du gros placenta plutôt que du syndrome du gros veau (CONSTANT *et al.*, 2006).

Nous ne pouvons parler que de causes potentielles car, si les manipulations subies *in vitro* sont mises en cause avec certitude, ni l'influence exacte des différents paramètres, ni les mécanismes mis en jeu ne sont connus actuellement. En effet, l'incidence du LOS après manipulation d'embryons varie de 0 à presque 100% ; il apparaît de manière inconstante même entre deux études utilisant le même protocole ou pour une même équipe, entre deux périodes différentes. Il est ainsi imprévisible, ponctuel et pléiotropique.

En résumé, si aujourd'hui on sait donner naissance à des clones de fœtus et d'adultes de nombreuses espèces, tous les paramètres sont loin d'être connus et maîtrisés : le rôle du milieu de culture utilisé, les conséquences sur les phénomènes épigénétiques, sont des éléments reconnus du processus de clonage mais on ne sait pas prévoir, encore moins éviter, les trop nombreuses interruptions de gestation et le LOS.

Le faible taux de réussite et les anomalies fœtales rencontrées sont donc un obstacle important à l'application de ces techniques au monde agricole. Ce dernier n'est d'ailleurs pas prêt à accepter le clonage à visée reproductive et commerciale, toujours interdit par la législation actuelle.

II. Le développement après la naissance

A. La croissance

WILSON *et al.* (1995) ont publié une étude comparative de poids de veaux issus de clonage somatique, de transfert embryonnaire (TE) ou par IA ou monte naturelle (MN) (**tableau VII et figure 3**). Ces données comparent les poids à la naissance, à 205 jours et à 365 jours pris sur trois années consécutives. Les veaux sont issus pour 70% des races Angus, Brangus et Simbrah, 418 clones, 4687 TE et 8925 IA /MN ont permis d'obtenir les données présentées. Nous nous sommes intéressés uniquement aux données du clonage somatique et d'IA (ou MN) et pas à celles du transfert embryonnaire.

Tableau VII : Comparaison des poids (kg) de veaux issus de clonage somatique (Clone) et d'insémination artificielle (ou monte naturelle) (IA/MN) d'après WILSON et al. (1995)

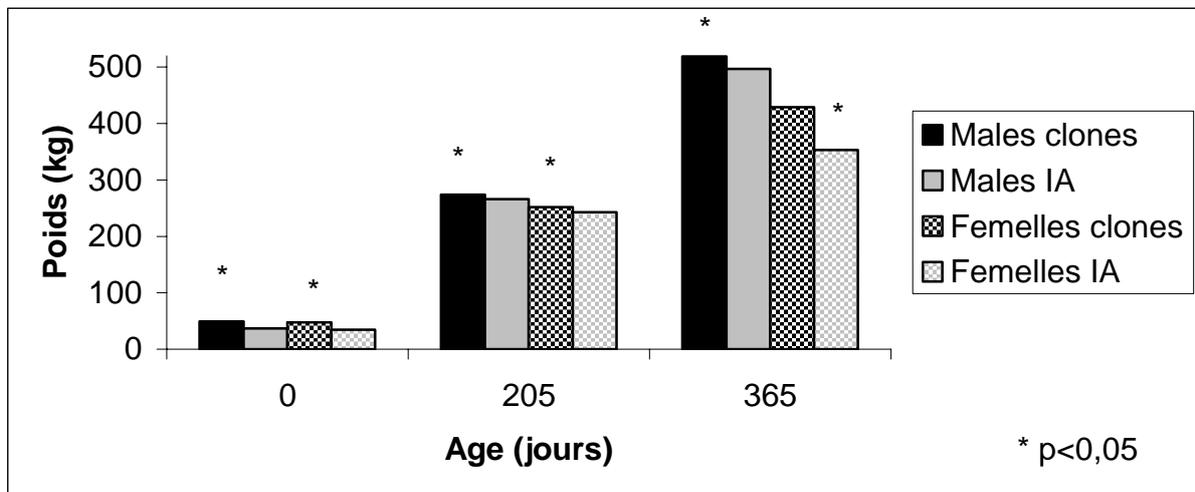
M = Mâle

F = Femelle

N = Nombre de veaux de l'étude

Veau	Sexe	N	Moyenne (kg)	Ecart type (kg)	Normes (kg)
<i>Poids de naissance</i>					
Clone	M	270	49,5	10,5	24,5-81,6
IA/MN	M	4745	36,8	6,2	15,4-72,6
Clone	F	148	47,5	10,5	21,8-82,6
IA/MN	F	4180	34,6	5,4	15,9-71,2
<i>205 jours</i>					
Clone	M	141	274,1	44,6	161,0-390,1
IA/MN	M	2124	265,7	37,8	131,1-404,6
Clone	F	78	251,8	34,6	165,1-336,1
IA/MN	F	1771	242,8	33,2	115,7-353,4
<i>365 jours</i>					
Clone	M	52	519,0	52,3	392,8-634,6
IA/MN	M	1006	497,0	50,6	337,5-664,1
Clone	F	14	429,1	44,1	360,6-488,1
IA/MN	F	624	352,9	35,2	269,4-489,0

Figure 3 : Histogramme comparatif des poids des veaux mâles et femelles (kg) issus de clonage somatique et témoins issus d'IA (d'après les données de WILSON et al., 1995)



A la naissance, le poids moyen des veaux mâles d'IA est 36,8 kg +/- 6,2 et celui des femelles de 34,6 kg +/- 5,4.

A 205 jours, il est de 265,7 kg +/- 37,8 chez les mâles et 242,8 kg +/- 33,2 chez les femelles.

A 1 an, il est de 497 kg +/- 50,6 chez les mâles et 352,9 kg +/- 35,2 chez les femelles.

Il ressort de l'étude de WILSON *et al.* (1995), que les poids des veaux clonés à 205 jours et à 365 jours sont moins variables que leurs poids de naissance. Les poids moyens à 205 jours des veaux clonés ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$) de ceux des veaux obtenus par transfert embryonnaire. Par contre, ils sont significativement supérieurs à ceux des veaux produits par IA ou MN.

Les poids moyens à 365 jours des veaux clonés sont significativement plus élevés ($P < 0,05$) que ceux des autres catégories de veaux. La différence est toutefois moins marquée que pour les poids de naissance. Exprimée en pourcentage de la masse corporelle totale, cette différence est effectivement inférieure à 5% à 365 jours contre 24% à la naissance.

Plus récemment, la croissance de veaux issus de clonage somatique a été comparée à celle de témoins contemporains élevés dans les mêmes conditions par GOVONI *et al.*, (2002). Les vitesses de croissance jusqu'à l'âge de 15 mois, mesurées chez 3 familles de clones de différentes origines génétiques sont normales et comparables aux témoins (**tableau VIII**). Pour chaque clone au sein d'une même famille, le Gain Moyen Quotidien (GMQ) n'est pas affecté par le poids de naissance. Ceci semble indiquer que l'environnement prénatal qui est impliqué dans le surpoids à la naissance n'a pas d'influence sur la croissance pondérale ultérieure. Les mesures d'indice de consommation des veaux clonés sont comparables à celles de veaux témoins issus d'IA avec la même origine paternelle. Les concentrations plasmatiques en hormone de croissance (GH) ne sont pas différentes entre 5 et 11 mois chez les animaux clonés (HEYMAN *et al.*, 2005).

Tableau VIII : Vitesse de croissance (GMQ) des veaux clonés et de leurs témoins contemporains entre la naissance et l'âge de 12 ou 15 mois (d'après GOVONI *et al.*, 2002 ; HEYMAN *et al.*, 2005).

Groupes	Nombre d'animaux	GMQ kg/j ± écart type
Clone A (0-12 mois)	N=8	0,701 ± 0,064
Témoins contemporains (0-12 mois)	N=10	0,804 ± 0,113
Clone B (0-15 mois)	N=6	0,782 ± 0,041
Clone C (0-15 mois)	N=9	0,711 ± 0,061
Témoins contemporains (0-15 mois)	N=10	0,766 ± 0,089

B. Les maladies

1. Maladies rencontrées chez les clones

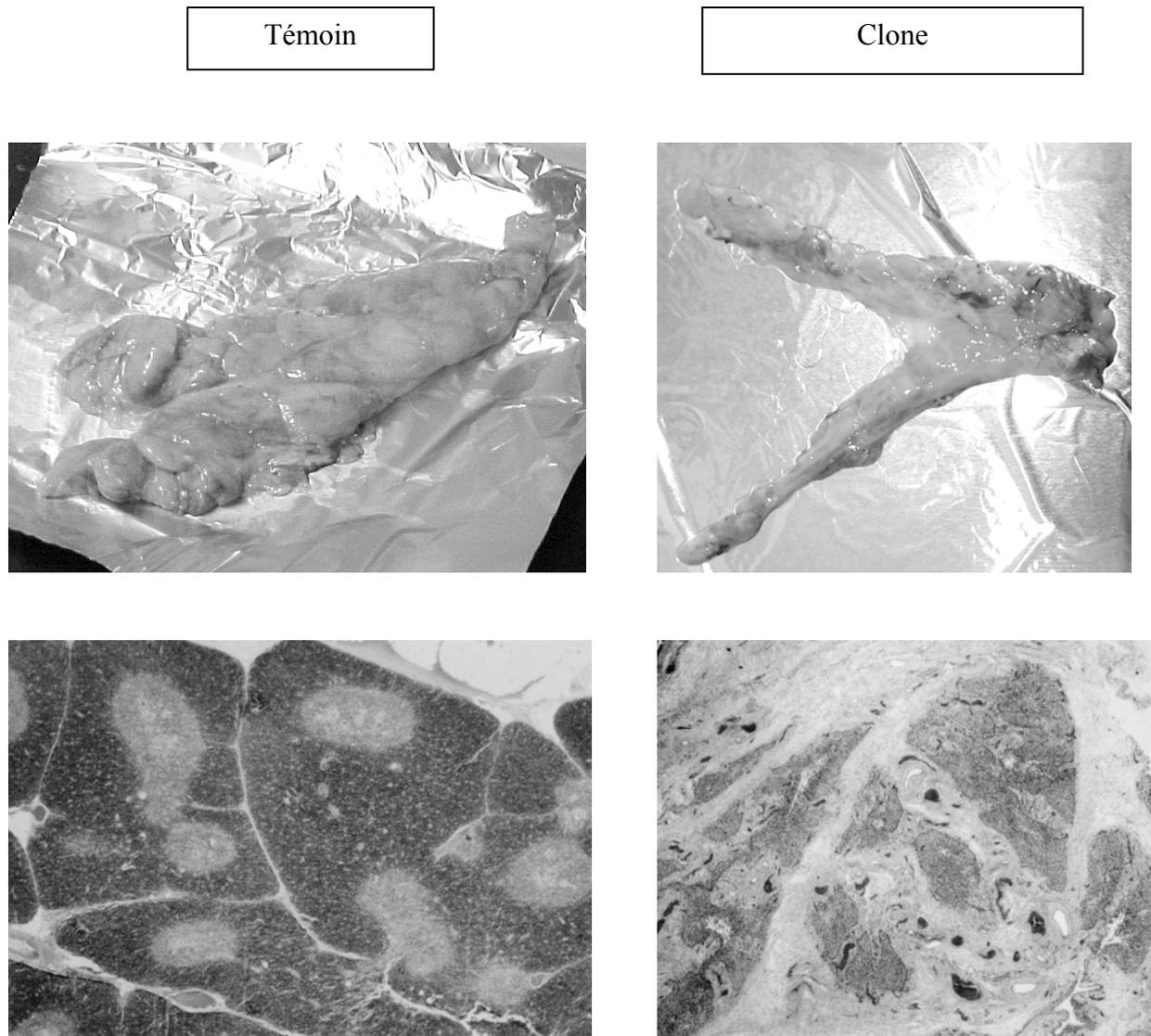
Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses maladies et anomalies ont été décrites chez les clones. WELLS *et al.* (2004), révèlent qu'entre la naissance et l'âge de 4 ans, le taux de mortalité des animaux issus de clonage somatique était de 8% et bien que les raisons de la

mort soient variables, la principale origine de mortalité durant cette période est l'euthanasie à cause d'anomalies musculosquelettiques.

CHAVATTE-PALMER *et al.*, (2004) annoncent qu'en moyenne, 30% des veaux clonés meurent avant l'âge de 6 mois pour des raisons très variables incluant le plus souvent, des détresses respiratoires, un développement anormal des reins, une stéatose hépatique. Le poids du cœur et du foie en rapport avec la masse corporelle est aussi accru.

Durant la période entre 1 semaine et 4 mois, un large éventail d'autres maladies a pu être observé chez les clones, incluant des infections comme des ruminites ou des abomasites (WELLS *et al.* 1998), des coccidioses (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2004). Il est rapporté qu'un cas de veau cloné présentant une aplasie thymique a été directement corrélé au processus même de clonage puisque ses clones embryonnaires (l'un d'eux avait donné la cellule donneuse) étaient tous normaux (RENARD *et al.* 1999^a). Et depuis, quatre autres cas similaires sont apparus. Des échantillons de thymus de 10 clones et de 6 témoins ont été examinés. Une organisation anormale fut détectée sur 5 thymus de clones qui avaient une atrophie thymique à l'autopsie (**figure 4**).

Figure 4 : Comparaison macroscopique et microscopique de thymus de témoins et de clones (source INRA)



Les causes de mortalité des clones adultes reste encore peu documentées. LANZA *et al.* (2001), dans une étude clinique portant sur 24 clones et incluant l'étude des paramètres biochimiques classiques et un typage lymphocytaire succinct ont conclu que ces animaux étaient en bonne santé. Sur 9 clones et 9 témoins en Nouvelle Zélande (WELLS *et al.* 2004), aucune différence n'a été constatée à 2 ans entre clones et témoins sur la base de bilans sanguins et d'apparition de phénomènes pathologiques. 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 (CHAVATTE- PALMER, communication personnelle).

2. Cas particulier du « vieillissement » des clones

La presse a beaucoup parlé du possible vieillissement prématuré de la brebis Dolly et de la longueur de ses télomères. SHIELS *et al.*, (1999) font état d'une découverte qui porte sur la taille des chromosomes de trois clones de brebis (dont Dolly). Leur taille s'est en effet avérée inférieure d'environ 20% à ce qu'elle aurait dû être. Les extrémités de chromosomes, baptisés télomères, s'érodent naturellement à chaque division cellulaire : leur taille peut donc être considérée comme une véritable horloge biologique affichant l'âge de la cellule et celui de l'organisme dont elle est issue. Dans le cas de Dolly, les chercheurs ont observé que ses télomères affichaient 9 ans d'âge soit son âge de naissance (3 ans) augmenté de celui de la brebis donneuse du noyau, âgée de 6 ans au moment du prélèvement du tissu mammaire donneur (GAULON, 2003).

Cependant, ce résultat n'a pas été confirmé chez d'autres espèces et le critère de longueur des télomères, sujette à de grandes variations d'un individu à l'autre doit être interprétée avec beaucoup de précaution. Le cytoplasme de l'œuf possède une activité télomérase, qui permet au noyau somatique transplanté de retrouver une longueur de télomères similaire à celle rencontrée dans des individus non clonés de même âge comme cela a été montré chez la souris et le bovin (MIYASHITA *et al.*, 2002 ; HEYMAN *et al.*, 2005).

De plus, dans leur rapport final, RHIND *et al.*, (2003) précisent la cause du décès de Dolly. Dolly a dû être euthanasiée car elle était touchée par le syndrome d'adénocarcinome pulmonaire ovin (SPA) causé par un rétrovirus et contre lequel il n'existe aucun traitement. D'autres animaux de la bergerie avaient été contaminés et il semble peu probable que Dolly ait été plus sensible au virus parce qu'elle était clonée. Dolly n'est donc pas morte de « vieillissement prématuré » mais de détresse respiratoire causée par un virus, comme n'importe quel autre brebis touchée par le SPA.

Dans le travail de LANZA *et al.*, (2000) dans l'espèce bovine, l'équipe a réussi à produire 6 veaux après transplantation de noyaux de fibroblastes fœtaux transgéniques dans des ovocytes receveurs énucléés et transfert d'une partie des blastocystes reconstitués (n=79) chez des receveuses. Les fibroblastes utilisés ici comme donneurs de noyaux ont été cultivés *in vitro* pendant une période supérieure à 95% de leur durée de vie totale, et leur morphologie était compatible avec celle des cellules sénescents. Malgré les caractéristiques initiales, après analyse, la longueur des télomères de cellules sanguines nucléées prélevées sur les animaux clonés s'est révélée supérieure à la longueur des télomères de cellules identiques prélevées sur des veaux (âgés de 2 semaines à 10 mois) et de vaches (âgées de 6 mois à 19 ans) témoins. En outre, la longueur des télomères des fibroblastes fœtaux sénescents utilisés pour le transfert nucléaire a été démontrée comme étant nettement inférieure à celle de fibroblastes recueillis sur des fœtus clonés produits à partir de ces cellules.

Ces résultats montrent, d'une part que des développements à terme peuvent être obtenus après clonage de cellules somatiques bovines sénescents, et d'autre part, que la reprogrammation lors de transfert de noyaux permet d'étendre la longueur des télomères des bovins clonés au-delà de la longueur des télomères de veaux nouveaux nés non clonés. Par ailleurs, Lanza *et al.* 2000 ont souligné que les élongations des télomères des cellules des bovins clonés étaient concomitantes d'un allongement de la durée de vie multiplicative de ces cellules. D'après les auteurs, ces données suggèrent que les embryons bovins reconstitués par transplantation nucléaire disposent d'un mécanisme autorisant la régénération des télomères au cours des événements du développement pré et post-implantatoire. Les contradictions entre les conclusions de cette étude et celles de SHIELS *et al.*, (1999) à propos de Dolly pourraient être dues à des différences entre espèces, à des différences dans la technique de transplantation de noyaux, ou à des différences dépendantes du type cellulaire des noyaux donneurs. D'ailleurs, une autre étude montre que les télomères ne sont pas diminués chez les bovins clonés (TIAN *et al.*, 2000) et que leur longueur dépend effectivement du type cellulaire de la cellule donneuse (MIYASHITA *et al.* 2002, CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2004^b). Chez les ovins, ils seraient effectivement plus courts mais cette anomalie ne serait pas transmise à la descendance (ALEXANDER *et al.* 2004, CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2004^b).

SHIGA *et al.*, (2005), ont mesuré les télomères de 2 veaux issus du clonage somatique d'un vieux taureau infertile de 12 ans. La longueur des télomères dans les leucocytes des 2 clones

était respectivement de 19,6 et 19,9 kb, similaire à la longueur attendue pour des animaux non clonés. Il a été décrit que la source des cellules donneuses de noyaux détermine la longueur des télomères chez les animaux ; dans cette étude, bien que la longueur des télomères du taureau donneur de noyau étaient courts (17,2 kb), probablement à cause de son âge, ceux des clones produits à partir de cellules musculaires du donneur avaient de long télomères (20,1 kb), ce qui rentrait bien dans l'intervalle de la normale.

Néanmoins, il est nécessaire de recourir à une enquête internationale pour évaluer la survie à long terme des bovins clonés sur un effectif suffisant. A l'INRA, parmi les bovins issus de clonage somatique, les vaches les plus âgées suivies actuellement ont entre 6 et 7 ans (HEYMANN *et al.*, 2005).

Récemment, YONAI *et al.* en 2005 ont évalué la croissance, la reproduction et la lactation de vaches issues de clonage somatique qui présentaient des télomères significativement plus courts que la normale et ont montré que tous les paramètres étudiés étaient normaux.

3. La reproduction

Les clones en bonne santé peuvent – ils se reproduire et donner naissance à une descendance normale ?

a) Capacité des clones à se reproduire

De nombreuses autres études ont montré que des animaux clonés mâles ou femelles de différentes espèces sont féconds (Wells et Gauthier cités par HEYMANN *et al.*, 2005 ; LANZA *et al.*, 2001). Les génisses clonées ont une fertilité normale après insémination artificielle (WELLS *et al.*, 2004). Elles sont capables de vêler spontanément à terme et sans aide. Les descendants de génisses clonées ont un poids de naissance normal et une survie postnatale correcte puisque 85% d'entre eux survivent jusqu'à l'âge adulte selon les données de Ag Research en Nouvelle Zélande (HEYMANN *et al.*, 2005). Les génisses obtenues par clonage sont donc capables de se reproduire normalement et de mener à bout une gestation.

b) Statut hormonal et puberté des clones

D'après Richard *et al.*, (2006), les bovins produits par clonage somatique ont prouvé qu'ils étaient capables de se développer, d'être sexuellement matures et de se reproduire par monte naturelle ou par IA. Néanmoins, il n'y a encore que peu de publications sur les caractéristiques de reproduction chez les femelles clonées. LANZA *et al.*, (2001) rapportent que les animaux clonés atteignaient la puberté à l'âge et au poids attendu, mais ENRIGHT *et al.*, (2002) qui ont étudié le statut hormonal des génisses clonées ont observé un retard de puberté chez les génisses clonées par rapport aux témoins.

Dans l'étude de ENRIGHT *et al.*, (2002), quatre génisses obtenues par clonage de cellules somatiques adultes d'une vache Prim'Holstein de 13 ans, sont comparées à quatre génisses témoins produites par insémination artificielle.

Dans cette étude, les témoins atteignent la puberté à un âge de $272 \pm 4,4$ jours et un poids de $302,8 \pm 4,5$ kg.

Les clones, quant à eux atteignaient la puberté plus tardivement que les témoins ($314,7 \pm 9,6$ jours) et avec un poids plus élevé que les témoins ($336,7 \pm 13$ kg).

Il n'y avait pas de différence entre les clones et les témoins pour la durée du cycle, le nombre de vagues folliculaires (2 ou 3), le diamètre du follicule ovulatoire, l'apparence du follicule et son taux de croissance ou le nombre totaux de follicules sur un cycle. La dynamique folliculaire des clones était normale : recrutement, sélection et dominance des follicules se déroulaient comme pour les témoins. Il n'y avait pas de différence entre clone et témoins pour le profil des différentes hormones : FSH, LH, oestradiol et progestérone. Les clones avaient un développement normal de l'axe gonado-pituitaire et les mécanismes de rétrocontrôle fonctionnaient. Enfin, trois génisses clonées sur quatre ont été gestantes avec moins de 3 IA.

Ces résultats indiquent que les clones pourraient avoir besoin d'atteindre un poids et un âge critique plus élevé que les témoins pour débiter leur puberté. L'arrivée tardive de la puberté chez les clones suggère une influence génétique sur l'âge d'apparition de la puberté. Cependant les 4 génisses clonées de cette étude étaient toutes issues du même donneur. D'autres études impliquant des clones issus de plusieurs génotypes sont donc nécessaires.

Plus récemment, RICHARD *et al.*, (2006), ont évalué la maturité sexuelle d'un groupe de femelles clonées et l'ont comparé à celle de femelles témoins nées et élevées dans les mêmes conditions à la ferme expérimentale de l'INRA. Les clones (n=10) étaient issus de cultures de fibroblastes de peau de trois adultes donneuses Holstein. Les génisses témoins (n=11), contemporaines des clones étaient issues d'IA. Tous les veaux ont été élevés dans les mêmes conditions et ont été suivis régulièrement. La croissance a été évaluée à l'aide d'une pesée mensuelle. Afin de détecter l'apparition de la cyclicité par dosage de la progestérone plasmatique, des échantillons de sang ont été prélevés sur toutes les femelles tous les 10 jours entre l'âge de 8 mois et 14 mois. La détection des chaleurs était faite deux fois par jour par observation. L'âge de la puberté a été évalué par estimation de la première ovulation avant le pic de progestérone, associé à un comportement d'oestrus. A l'âge de 15-16 mois, les clones et les témoins cyclées ont été inséminés par IA afin de mesurer la fertilité. De la semence congelée provenant du même taureau a été utilisée pour l'insémination au moment de l'oestrus induit par un traitement de synchronisation par implant de progestagènes.

Dans ces conditions, les clones ont atteint la puberté significativement plus tard (62 jours) que les témoins et à un poids plus élevé (56 kg). Cela n'est pas dû à une différence du GMQ (gain moyen quotidien) qui était similaire dans les deux groupes. Après la première ovulation, néanmoins, la taille moyenne du cycle oestral était identique dans les deux groupes. A l'issue de la première insémination, 5 femelles sur 10 sont gestantes dans le groupe des clones et 4 ont déjà mis bas. Ces résultats étaient similaires dans le groupe des témoins dans lequel 7 femelles sur 10 se sont trouvées pleines à la première IA et ont vêlé.

D'après ces différentes études, il semble que chez les génisses clonées, les profils hormonaux liés à la reproduction soient normaux, mais que la puberté apparaisse à un âge plus tardif. Mais cela n'a pas de conséquence sur leur capacité à se reproduire.

4. La production

Le clonage somatique par transfert nucléaire a des applications en agriculture notamment pour dupliquer des animaux de rente de haute valeur génétique pour la production de nourriture. Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, il y a une corrélation entre le clonage et des expressions aberrantes de certains gènes, ainsi que des anomalies de développement et de forts taux de mortalité néonatale. Ces découvertes suggèrent l'existence d'une réactivation incomplète de certains gènes inactivés issus des cellules différenciées du donneur. Comme les connaissances sont encore limitées en ce qui concerne la nature de cette dysrégulation des gènes chez les clones, il y a eu un débat public pour savoir si les denrées alimentaires issues d'animaux clonés étaient sûres pour la consommation humaine. Aux Etats-Unis comme en France d'ailleurs, les administrations de sécurité alimentaire (Food and drug Administration's Centre for Veterinary Medicine et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) a interdit l'introduction d'animaux clonés, de leur progéniture ou de leur produits dérivés comme le lait ou la viande dans les chaînes destinées à l'alimentation humaine et animale (HEYMAN *et al.*, 2005 et 2007).

Afin d'éclaircir les incertitudes concernant la sécurité sanitaire des aliments issus de clones, diverses études ont été menées qui comparent la qualité de la viande et du lait de issus de clones.

a) Production laitière

Bien que l'on s'attende à ce que des animaux laitiers clonés aient des performances identiques à des animaux normaux, leurs performances n'avaient pas encore été étudiées. Les jumeaux naturels sont portés par la même vache, et il a été montré que les naissances multiples influençaient les performances de la vache et des veaux. (ECHTERNKAMP et GREGORY, 2002).

Ces inconvénients liés aux naissances multiples ne sont pas rencontrés lors du clonage qui utilise une receveuse par embryon pour assurer la gestation.

L'intérêt suscité par l'impact des biotechnologies sur la santé animale et ses implications sur la sécurité alimentaire a fait se pencher sur le lait produit par les vaches clonées.

Le lait d'une vache domestique (*Bos taurus*) est composé de 85 à 88 % d'eau, 3 à 4 % de protéines, 4,6 à 5,2% de lactose et 3 à 5 % de matière grasse. La composition du lait est sous l'influence de l'élevage, du numéro de lactation, de l'âge de la vache, de l'alimentation, de la taille de l'intervalle entre deux lactations, de la température ambiante, des maladies (spécialement les mammites) et de la saison (KAUFMANN *et al.* 1987). La détection de différences entre la composition du lait de clones et de non clone doit donc prendre en considération ces facteurs de variation.

La production laitière des vaches clonées a été étudiée sur le plan quantitatif (NORMAN et WALSH, 2004) et qualitatif (HEYMAN *et al.*, 2006).

La composition du lait de vaches clonées fait l'objet de beaucoup d'attention dans le contexte actuel du moratoire INRA interdisant l'introduction des produits issus de clones dans la chaîne alimentaire humaine. Une étude de WALSH *et al.*, (2003) portant sur l'analyse complète du lait de 15 vaches clonées issues de 5 génotypes et 3 races différentes n'a pas permis de mettre en évidence une différence dans la composition chimique, les acides gras ou les profils de protéines. Il en est de même dans l'étude de TIAN *et al.*, (2005).

Plus récemment, une étude sur l'analyse quantitative et qualitative du lait de clone a été menée par l'INRA (HEYMAN *et al.*, 2006) portant sur 12 clones de 3 génotypes différents ainsi que leurs témoins contemporains. Les analyses ont été menées sur une lactation (305 jours) à raison d'une analyse par mois faite par le contrôle laitier. Les courbes de lactation des clones et des témoins étaient similaires. Tous les paramètres mesurés par le contrôle laitier (taux protéique, taux butyreux et comptage cellulaire) étaient dans les normes. Cependant, le taux protéique était significativement supérieur chez les clones par rapport aux témoins. Ce taux plus élevé était principalement dû à 3 clones du même génotype qui avaient un taux protéique plus élevé et une production laitière plus faible que les clones des autres génotypes.

La composition en acides gras du lait n'a pas montré de différence significative entre clones et témoins excepté pour l'acide stéarique (C18:0) et le C18:1 trans 11 qui étaient significativement moins élevés dans le lait de clones. L'activité de l'enzyme $\Delta 9$ desaturase, impliquée dans la transformation de C18:0 en C18:1 par désaturation de cet acide gras, était plus élevée chez les clones que chez les témoins aux mêmes stades de lactation.

La valeur nutritionnelle du lait issu de bovin cloné a fait l'objet de comparaisons sur le modèle rat (TOME *et al.*, 2004). L'ingestion d'un régime à base de lait ou de viande de clones n'induit chez le rat aucune différence de prise alimentaire, de prise de poids, de composition corporelle, ni de réaction allergique, par rapport au lot témoin soumis à un régime de même composition mais élaboré à partir de produits d'animaux non clonés HEYMAN *et al.*, (2006). Des résultats similaires ont été trouvés dans une autre étude au Japon par TAKAHASHI et ITO (2004).

b) Production carnée

La composition de la viande de clone a été analysée sur une centaine de paramètres par différentes équipes (BERTHELOT *et al.*, 2004, TIAN *et al.*, 2005). Les résultats de TIAN *et al.*, (2005) ont montré l'absence de différence significative entre clones et témoins pour plus de 90 % des tous les paramètres examinés, en accord avec les résultats de BERTHELOT *et al.*, (2004). Il y avait néanmoins 12 analyses pour lesquelles clones et témoins montraient des différences : la teneur corporelle en gras mésentérique, la teneur en acides gras, tous les paramètres qui concernent le rapport muscle /gras étaient significativement supérieurs chez les clones que chez leurs témoins.

Dans l'étude menée par l'INRA (HEYMAN *et al.*, 2006, JURIE *et al.*, 2006), les biopsies répétées de muscles ont montré que les génisses clonées présentaient des muscles à contraction plus lente et à métabolisme musculaire plus oxydatif que les génisses témoins, en particulier à 8 et 12 mois d'âge. Ces différences peuvent s'expliquer comme la conséquence d'un retard de différenciation contractile et métabolique des animaux clonés puisqu'une activité similaire est rencontrée chez des témoins plus jeunes. En effet, chez le fœtus bovin, le

métabolisme oxydatif augmente en fin de vie fœtale puis diminue après la naissance (PICARD *et al.*, 2006).

Il semble que pour la reproduction, les animaux sont normaux à l'exception d'un retard à la puberté. En ce qui concerne la production de lait et de viande, il apparaît un certain nombre de différences significatives mises en évidence lors des enquêtes cas-témoins. Il sera intéressant à l'aide des études futures de montrer si ces différences ont un impact sur la santé humaine.

III. Les paramètres cliniques, hématologiques et biochimiques

A. Paramètres cliniques

1. Fréquence respiratoire

Chez les jeunes bovins, les normes sont comprises entre 20 et 50 mouvements par minute. Chez l'adulte, elles sont comprises entre 15 et 35 mouvements par minute.

2. Fréquence cardiaque

Chez le veau, les valeurs normales sont comprises entre 90 et 110 battements par minute. Chez le jeune bovin, elles sont entre 70 et 90 battements par minute et chez l'adulte, entre 65 et 80 battements par minute.

3. Température

De 4 à 12 mois, la température rectale moyenne est comprise entre 38.5°C et 39.5°C, puis elle diminue à l'âge adulte pour être comprise entre 38°C et 39°C.

B. Paramètres hématologiques

Le **tableau IX** présente les valeurs hématologiques normales dans l'espèce bovine (JAIN, 1993 et SMITH, 1996). Il convient de préciser que les données sur les paramètres hématologiques sont un peu différentes d'un auteur à l'autre dans la littérature, en ce qui concerne notamment les intervalles de variation.

Tableau IX : Valeurs hématologiques normales des bovins adultes (d'après JAIN, 1993 et SMITH, 1996)

PARAMETRE ETUDIE	Intervalle	Moyenne
Nombre d'hématies (*10⁶/μL)	5,0-10,0	7
Hématocrite (%)	24,0-46,0	35
Taux d'hémoglobine (g/dL)	8,0-15,0	11
Volume corpusculaire moyen (μm³)	40,0-60,0	52
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (pg)	11,0-17,0	14
Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (%)	30,0-36,0	32,7
Réticulocytes (%)	0	0
Leucocytes (/μL)	4000-10000	8000
Lymphocytes	2500-7500	4500
Neutrophiles	600-4000	2000
Monocytes	25-840	400
Eosinophiles	0-2400	700
Basophiles	0-200	50
Formule leucocytaire (%)		
Lymphocytes	45-75	58
Neutrophiles	15-45	28
Monocytes	2-7	4
Eosinophiles	0-20	9
Basophiles	0-2	0,5
Thrombocytes (*10⁵)	1,0-8,0	5
Fibrinogène (g/dL)	0,1-0,6	

1. La lignée rouge

Nous étudierons les normes chez les bovins de race laitière au cours de la croissance jusqu'à l'âge adulte. En effet, les variations que l'on peut rencontrer tiennent essentiellement à la race et à l'âge (BEZILLE, 1993).

Les érythrocytes de bovins sont des cellules discoïdes anucléées biconcaves de 5 à 6 µm de diamètre et ont une durée de vie longue par rapport aux autres mammifères de 130 jours (KRAMER, 2000).

La première fonction de l'érythrocyte est le transport de l'hémoglobine, qui apporte l'oxygène aux tissus (THRALL, 2004).

L'érythropoïèse est l'ensemble des processus qui aboutissent à la libération des globules rouges dans la circulation. Elle débute très tôt chez l'embryon puisque les premières cellules sanguines apparaissent déjà dans les îlots des parois de la vésicule ombilicale. Ce sont des cellules d'origine mésenchymateuses, dont l'activité débute chez les bovins vers le 28^{ème} jour jusqu'à la 10^{ème} semaine. Le relais est pris par le foie entre le 60^{ème} et le 140^{ème} jours. A partir du milieu de la gestation, l'érythropoïèse devient progressivement splénique. Cependant, dès le 100^{ème} jour de gestation commence la localisation médullaire, qui deviendra le site exclusif de la production d'hématies après la naissance, sauf dans des conditions pathologiques par exemple d'aplasie ou d'hypoplasie médullaire, où la rate et le foie retrouvent leur potentiel hématopoïétique. La moelle osseuse hématopoïétique est localisée dans le tissu spongieux des os plats et des vertèbres et l'épiphyse des os longs. (ISSENMAN, 2003 ; FONTAINE 1996).

La régulation de l'érythropoïèse est hormonale et passe principalement par l'érythropoïétine, glycoprotéine d'origine essentiellement rénale. Le foie peut accessoirement produire de l'érythropoïétine (15-20% maximum), mais en quantité insuffisante pour compenser un déficit rénal. La synthèse de cette hormone répond à une hypoxie veineuse quelle qu'en soit l'origine : diminution de la saturation du sang artériel en oxygène ou diminution de la masse érythrocytaire circulante.

L'érythrocyte normal de bovin est caractérisé par une anisocytose physiologique (diversité de taille des érythrocytes), surtout lors de premières semaines de la vie (KRAMER, 2000).

Il peut être normal de retrouver des réticulocytes, ou érythrocytes immatures, en circulation les premiers jours de la vie du veau. En revanche, un bovin adulte ne présente pas de réticulocytes en circulation (FRANCOZ *et al.*, 2003).

La population érythrocytaire circulante peut aisément être quantifiée. Certains caractères quantitatifs sont mesurés au laboratoire, d'autres sont calculés à partir des valeurs précédentes.

La réalisation de l'hémogramme nécessite de disposer d'un échantillon de sang veineux recueilli dans un tube contenant un anticoagulant (par exemple l'EDTA).

a) Numération globulaire (NG)

Le nombre moyen d'hématies chez le veau est de 6 à 10 millions par mm^3 , mais les données sont très variables d'un auteur à l'autre car il existe de grandes variations entre individus.

Au cours des 2 à 3 premières semaines qui suivent la naissance, on assiste à une activité croissante de l'érythropoïèse de la moelle osseuse, alors que les globules rouges sont détruits en masse. Au cours des semaines et des mois suivants, la nouvelle formation des érythrocytes est limitée par un approvisionnement insuffisant en fer surtout lors d'alimentation uniquement lactée (anémie ferriprive fréquente). Malgré cela, le nombre de globules rouges par mm^3 de sang est souvent un peu plus élevé chez les veaux et les jeunes bovins que chez les adultes (ISSENMANN 2003).

La numération globulaire est le nombre d'hématies présentes dans le sang par unité de volume. Elle diminue pendant les 24 premières heures après la naissance : cette diminution initiale du nombre d'hématies est attribuée à une hémodilution après la prise de colostrum (TENNANT *et al.*, 1974). De plus, ADAMS *et al.* (1992) remarquent que le nombre d'hématies, le taux d'hémoglobine et l'hématocrite sont plus bas à la naissance,

à 24 et 48 heures pour les veaux nés avec assistance que pour les veaux nés sans assistance (ISSENMANN, 2003).

Chez l'adulte la valeur moyenne est de 7 millions par mm³.

La numération globulaire diminue jusqu'à l'âge de 5-6 ans puis reste constante.

De façon physiologique, la numération érythrocytaire est un peu plus élevée chez la femelle gestante ou chez les individus séjournant de façon prolongée en altitude (adaptation à l'hypoxie).

b) Hématocrite (Ht)

L'hématocrite est le pourcentage en volume occupé par la population érythrocytaire dans le sang. Il varie selon le degré de dilution du sang et la numération érythrocytaire.

Il est de 25-50 % chez les bovins. A la naissance, il suit les mêmes variations que la numération globulaire. En général, l'hématocrite est très élevé à la naissance, chute ensuite brutalement pour remonter vers les valeurs adultes et rediminuer ensuite lentement avec l'âge.

La détermination de l'hématocrite est une épreuve de détection par excellence. Couplé au dosage des protéines totales, l'hématocrite est la seule épreuve capable de différencier et de détecter une anémie, une polycythémie, une hémococoncentration et une hémomodilution, ce que la numération des globules rouges ne peut réaliser.

L'hématocrite diminue lors d'anémie ou d'hémomodilution ; il augmente lors de déshydratation.

On parle d'érythrocytose lors d'une augmentation de l'hématocrite, de la numération globulaire et de la concentration d'hémoglobine au dessus des valeurs de référence. L'érythrocytose peut être relative, c'est-à-dire être la conséquence d'une hémococoncentration ou d'un choc septique ou endotoxique ou absolue, c'est à dire être la conséquence d'une augmentation de l'érythropoïèse (FRANCOZ *et al.*, 2003).

c) Taux d'hémoglobine (Hb)

C'est la masse d'hémoglobine présente dans le sang par unité de volume.

Usuellement, sa valeur est exprimée en g/100mL.

Les veaux ont une teneur en hémoglobine sanguine plus élevée que les bovins adultes (jusqu'à 14 ou 15 g/100mL parfois).

Le taux d'hémoglobine est directement lié à la quantité d'oxygène transporté dans l'organisme.

L'anémie se définit comme une diminution de la quantité d'hémoglobine contenue dans le volume sanguin, le volume plasmatique n'ayant pas changé. L'anémie par carence en fer est fréquente chez les jeunes dont l'alimentation est strictement lactée. Plusieurs situations sont à considérer selon le type d'alimentation (allaitement naturel ou lactoreplaceur) et de production (veau de boucherie ou d'élevage). Lors d'allaitement naturel, les apports en fer sont faibles et très variables : 200 à 1000 µg/kg de lait, soit 1,5 à 7,6 ppm/MS chez les bovins. Il ne semble pas exister de relation entre le fer alimentaire de la mère et les teneurs en fer du lait. A la naissance, le jeune dispose de réserves hépatiques constituées pendant la gestation, sûrement par phagocytose des globules rouges maternels, permettant ainsi un transfert placentaire. Les quantités de fer ainsi stockées sont très variables d'un individu à l'autre et moins importantes que chez l'adulte. L'anémie se développe quand les stocks hépatiques sont épuisés et lors de croissance rapide, les apports ne permettant pas alors de couvrir les besoins. Compte tenu de ces éléments, on conçoit que l'âge d'apparition de l'anémie est variable, mais se situe fréquemment aux alentours d'un mois (ISSENMANN, 2003). Des défauts de transfert materno-fœtal pourraient être à l'origine d'anémie congénitale (TENNANT *et al.*, 1975).

La numération des globules rouges et le dosage de l'hémoglobine n'ont d'utilité qu'au travers des indices de Wintrobe (VGM, CCMH, TGMH). Puisque dans une même espèce, pour diverses raisons, le volume moyen du globule rouge peut varier, la numération de ceux-ci ne convient pas pour la détection d'une anémie comme le fait l'hématocrite.

d) Indices de Wintrobe (VGM, CCMH, TGMH)

- **Volume Globulaire Moyen (VGM)**

Le VGM est un index qui exprime le volume moyen d'une hématie.

Il se mesure en μm^3 et se calcule en effectuant le rapport de l'hématocrite (= Ht exprimé en pourcentage et multiplié par 10) à la numération globulaire (= NG exprimée en millions par mm^3).

$$\text{VGM} = (\text{Ht} \times 10) / \text{NG}$$

La valeur moyenne chez l'adulte est comprise entre 40 à 60 μm^3 (JAIN, 1993).

Le VGM est de 48,5 (\pm 4,5) μm^3 à la naissance ; il diminue progressivement pendant les deux premiers mois, puis, après 6 mois, il augmente progressivement jusqu'à 2 ans pour atteindre la valeur adulte. (TENNANT *et al.*, 1974).

Le VGM diffère de manière importante selon la durée de gestation de l'animal. En effet, les veaux prématurés ont un VGM augmenté.

- **Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH)**

La CCMH exprime la concentration moyenne de l'hémoglobine dans les globules rouges.

Elle est obtenue en g/100mL en effectuant le rapport du taux d'hémoglobine (= Hb exprimé en g/100 mL et multiplié par 100) à l'hématocrite (exprimé en pourcentage).

$$\text{CCMH} = (\text{Hb} \times 100) / \text{Ht}$$

La valeur moyenne chez l'adulte est comprise entre 30 à 36 g/100mL (JAIN, 1993).

L'hémoglobine étant présente à l'état normal en solution pratiquement saturée dans le globule rouge, il ne peut y avoir d'élévation significative de la CCMH au dessus de la valeur normale. La CCMH est très constante (FONTAINE, 1996).

- **Teneur Globulaire Moyenne en Hémoglobine (TGMH)**

C'est la quantité d'hémoglobine présente en moyenne dans un globule rouge.

Elle est obtenue en picogrammes en effectuant le rapport du taux d'hémoglobine (exprimé en grammes pour 100 mL et multiplié par 10) à la numération globulaire (exprimée en millions par mm³)

$$\text{TGMH} = (\text{Hb} \times 10) / \text{NG}$$

La valeur moyenne chez l'adulte est comprise entre 11 et 17 pg (JAIN, 1993).

La TGMH présente des variations corrélées à celles du VGM.

e) Thrombocytes ou plaquettes

Les plaquettes sanguines sont les plus petits éléments figurés du sang. Ce sont des fragments cellulaires anucléés qui ont un rôle essentiel dans l'hémostase et dans certains phénomènes inflammatoires.

La numération plaquettaire chez les bovins est comprise entre 100 000 et 800 000 / mm³ (500 000/ mm³ en moyenne), (JAIN, 1993).

2. La lignée blanche (leucocytes)

Les cellules du système immunitaire peuvent être divisées en deux groupes : un groupe à action spécifique et un autre à action non spécifique, bien que ceux-ci soient complètement associés *in vivo*. La partie non spécifique comprend les cellules phagocytaires (dont le granulocyte neutrophile), les granulocytes basophiles et éosinophiles. La partie spécifique fait appel à l'activité des lymphocytes B et T dépendants de l'antigène (ISSENMANN, 2003).

La numération leucocytaire est effectuée à partir d'un échantillon de sang recueilli sur anticoagulant, dilué et hémolysé. Elle peut être réalisée manuellement, au microscope, à l'aide d'une cellule de Malassez, ou automatiquement à l'aide d'un compte globule. Elle fournit un nombre total de leucocytes par unité de volume. Elle s'exprime généralement en nombre de cellules par mm^3 (ou μL).

La formule leucocytaire est la répartition en pourcentage des différents types de leucocytes : granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles), monocytes et lymphocytes. Elle est obtenue par comptage au microscope, sur un frottis sanguin coloré par la méthode de May-Grünwald et Giemsa, à partir de 100 ou 200 cellules. Certains appareils en hématologie humaine effectuent automatiquement la formule leucocytaire ; ces appareils nécessitent un paramétrage pour les analyses vétérinaires (FONTAINE, 1996).

On en déduit la numération de chaque type leucocytaire en multipliant la numération leucocytaire totale par le pourcentage correspondant obtenu dans la formule et en divisant le résultat par 100.

Seules les données numériques sont interprétables. Elles sont comparées à la fourchette des valeurs normales observées dans l'espèce considérée.

a) Granulocytes neutrophiles (ou polynucléaires neutrophiles)

Les granulocytes neutrophiles sont des leucocytes caractérisés par de nombreuses granulations cytoplasmiques riches en substances antimicrobiennes, notamment antibactériennes, et par un noyau plurilobé.

Leur rôle principal est la phagocytose et la digestion de particules étrangères, surtout bactériennes. Ils apparaissent dans toute zone d'inflammation (d'origine infectieuse ou non). Ils sont attirés par des facteurs chimiotactiques provenant du complément. Ils ont donc un rôle essentiel dans la réponse immunitaire locale non-spécifique.

Le sang constitue pour les granulocytes un milieu de transit entre le lieu de production, la moelle osseuse et le lieu d'action, les tissus. La population granulocytaire est rapidement renouvelée dans les tissus et le temps pendant lequel les granulocytes restent dans la circulation est très faible. En effet, le temps de demi-vie est de 10 à 12 heures.

Les granulocytes sanguins se distribuent au secteur circulant, où ils peuvent être dénombrés, et en un secteur marginal (c'est-à-dire fixés à la paroi des vaisseaux), avant la migration tissulaire par diapédèse.

La valeur moyenne est de 2000 / μL chez un bovin adulte (valeurs normales comprises entre 600 et 4000 / μL) (JAIN 1993).

A l'état normal, les granulocytes neutrophiles présents dans l'appareil circulatoire se répartissent en deux groupes quantitativement comparables et en échanges permanents : les cellules libre circulantes et les cellules marginées, accolées à l'endothélium vasculaire. Seules les premières sont prélevées lors d'une prise de sang effectuée dans de bonnes conditions.

Un stress (contention brutale), ou un effort physique intense remettent en circulation les cellules marginales ; on peut ainsi observer sur l'hémogramme un doublement apparent de la population granulocytaire neutrophile.

Une augmentation du nombre de granulocytes neutrophiles est qualifiée de neutrophilie. Elle est observée dans le cas de maladies infectieuses notamment bactériennes. Une forte neutrophilie est observée lors d'infection suppurée.

Une diminution du nombre de granulocytes neutrophiles est qualifiée de neutropénie. Elle est observée dans le cas de lésions médullaires graves d'origine virale, tumorale ou toxique.

b) Granulocytes éosinophiles

Les granulocytes éosinophiles sont identifiables par de grosses granulations éosinophiles orangées, riches en peroxydase, en enzymes lytiques diverses et en protéine basique majeure.

Après leur formation dans la moelle osseuse, ils ne séjournent dans le sang que quelques heures (6 à 8 heures). Après quoi ils vont coloniser les tissus. Leur durée de vie est de quelques jours seulement. Leur bref passage dans le sang explique les valeurs extrêmement variables de leur numération. Les éosinophiles peuvent phagocyter. Ils sont attirés dans les tissus par les substances éosinotactiles.

Le granulocyte éosinophile est particulièrement impliqué dans la destruction des parasites, la destruction des immuns-complexes, notamment ceux mettant en jeu des IgE (réactions allergiques), et la modulation des réactions inflammatoires qui pourraient s'avérer nocives pour l'organisme.

La valeur moyenne est de 700 / μL (entre 0 et 2400 / μL) (JAIN, 1993).

Une augmentation du nombre de granulocytes éosinophiles est qualifiée d'éosinophilie. Elle est observée dans le cas d'une hypersensibilité de type I et d'infestations parasitaires tissulaires.

Une diminution est qualifiée d'éosinopénie et est observée en cas d'hypercorticisme surrénalien ou de traitement par les glucocorticoïdes.

c) Granulocytes basophiles

Les granulocytes basophiles contiennent également de nombreuses granulations, dont la composition est voisine de celle du mastocyte : histamine, leucotriènes... Ils sont très peu nombreux dans le sang. Plusieurs processus immunitaires peuvent intervenir dans la libération de l'histamine et des substances vaso-actives : réaction allergique de type I (réaction d'un anticorps cytophile IgE fixé sur la cellule basophile avec un antigène) ; réaction allergique de type III : réactions antigène-anticorps capables de fixer le complément et ainsi de libérer des anaphylotoxines qui dégranulent les basophiles.

La valeur moyenne est de 50 / μL (entre 0 et 200 / μL) (JAIN, 1993).

Il n'y a pas de variation du nombre de granulocytes basophiles (en dehors de quelques affections tumorales).

d) Monocytes

Les monocytes ne représentent que 2 à 3 % des leucocytes circulants.

Ils sont inclus dans le grand ensemble des phagocytes mononucléés et admettent une cellule souche médullaire commune avec les polynucléaires neutrophiles. Après un court séjour dans la moelle (absence de maturation et faibles réserves), leur distribution sanguine se répartit en un secteur marginal et un secteur circulant à demi-vie brève (quelques heures). Après leur passage irréversible dans les tissus, ils se transforment en macrophages. L'essentiel de leurs fonctions s'exprime alors et ils sont capables de survivre plusieurs mois. Parmi leurs nombreuses fonctions, les plus importantes sont : leur rôle de défense contre certains micro-organismes (bactéries, virus), la phagocytose de cellules ou de débris cellulaires, la participation au processus de cicatrisation, la sécrétion de nombreuses molécules biologiquement actives (enzymes protéolytiques, interférons, interleukine I, prostaglandines...) (JONGH, 1993).

e) Lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules qui réagissent de manière spécifique face à l'antigène.

Les cellules lymphoïdes appartiennent à une même lignée cellulaire originaire des tissus hématopoïétiques. Elles effectuent des migrations dans l'organisme en empruntant les voies sanguines et lymphatiques et disséminent dans les tissus conjonctifs et dans de nombreux tissus spécialisés : les organes lymphoïdes. Au cours de ces étapes, les cellules se multiplient et acquièrent progressivement une différenciation morphologique et fonctionnelle.

On définit deux types de lymphocytes : les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les lymphocytes B sont à l'origine de la réponse immunitaire à médiation humorale ; ils

produisent les anticorps. Les lymphocytes T sont responsables de la réponse immunitaire à médiation cellulaire et jouent un rôle important dans la régulation de l'immunité par l'intermédiaire des nombreuses interleukines qu'ils produisent.

Au sein des leucocytes, les lymphocytes forment la population cellulaire majoritaire. Le comptage lymphocytaire augmente progressivement jusqu'à l'âge de 3 mois pour représenter 60 à 80% du comptage total des leucocytes. Puis, après quelques années, la population lymphocytaire diminue progressivement (FRANCOZ *et al.*, 2003).

La valeur moyenne est de 4500 lymphocytes / μ L (entre 2500 et 7500/ μ L).

Une augmentation de la population lymphocytaire est qualifiée de lymphocytose. On peut l'observer en phase tardive, résolutoire de maladies infectieuses notamment virales, de façon inconstante en période post vaccinale chez le jeune et chez les bovins infectés par le virus leucémogène (BLV), sous forme d'une lymphocytose persistante (CRESPEAU, 2001) avec un taux de lymphocytes B pouvant aller jusqu'à 97% de la population lymphocytaire alors qu'ils ne constituent habituellement que 20% de cette population (SMITH, 1996).

C. Les paramètres biochimiques

Le **Tableau X** représente les valeurs biochimiques normales chez des bovins adultes d'après SMITH, 1996.

Tableau X : Valeurs biochimiques sanguines normales des bovins adultes (SMITH, 1996).

PARAMETRE ETUDIE	Unité	Intervalle
Urée	mmol/L	3,3-5
Créatinine	µmol/L	88,4-176,6
β OH-butyrate (B OH)	mg/dL	0-9
Protéines totales	g/L	67-75
Albumine	g/L	30-36
Gamma-glutamyl transferase (γGT)	UI/L	15-39
Aspartate aminotransferase (ASAT)	UI/L	43-127
Fibrinogene	g/L	1-6

1. Urée

L'urée a pour origine l'excrétion d'ammoniaque générée par le catabolisme des protéines. Elle est filtrée dans le glomérule du rein et partiellement réabsorbée dans les tubuli.

Les ruminants sont les meilleurs utilisateurs d'urée car la microflore du rumen utilise l'azote uréique dans la synthèse des protéines. Lors d'un apport de protéines alimentaires bas,

99% de l'urée filtrée par le rein est ainsi réabsorbée. On peut cependant retrouver de l'urémie chez les ruminants.

La production d'urée a lieu de manière quasi exclusive dans le foie, ainsi un problème hépatique est souvent associé à une baisse du taux d'urée.

La production d'urée est directement liée à la ration apportée à l'animal.

Le taux d'urée a tendance à être plus bas chez les veaux en période néonatale, car il y a une prise importante de fluides par l'animal et une forte croissance (d'où un anabolisme accru).

La faim ou tout autre processus entraînant un catabolisme rapide des tissus comme la fièvre ou l'administration de corticostéroïdes peuvent entraîner une élévation modérée du taux d'urée.

La fraction azotée de la ration est dégradée à 70% en ammoniac. Elle favorise le développement des bactéries du rumen, dont les constituants donnent les PDIM, ou protéines d'origine microbiennes digestibles dans l'intestin, et optimise donc l'utilisation de la ration. Si l'apport azoté est trop important, l'ammoniac excédentaire dans la panse passe dans le sang, est métabolisé dans le foie en urée, qui est ensuite éliminée par le lait, l'urine et la salive (VERRIELE *et al.*, 1999).

Ainsi chez une vache laitière sans aucune pathologie, lorsque l'urémie est basse, il y a un manque de PDIN (protéines digestibles permises par l'azote de la ration) dans la ration, qui s'accompagne de sous production et de baisse du TP (taux protéique). Il convient d'ajouter de l'urée, des tourteaux non protégés, de l'ensilage d'herbe ou de la luzerne. L'urée est le reflet du rapport $(PDIE - PDIN) / UFL$, les PDIE étant les protéines digestibles permises par l'énergie de la ration et l'UFL (Unité Fourragère Lait). Quand les PDIE sont très supérieures aux PDIN, il n'y a pas assez de production d'ammoniac dans le rumen d'où une urémie basse, et inversement. Les valeurs hautes supérieures à 35 mg/dL témoignent d'un excès de PDIN par excès de tourteaux, d'ensilage d'herbe... Il est indispensable de remplacer les tourteaux non protégés par une partie de tourteaux protégés, d'apporter de la cellulose digestible

(pulpes), de l'amidon... si la ration est déficitaire en énergie. Il y a corrélation inverse entre le taux d'urée sanguine et la réussite en insémination (VERRIELE *et al.*, 1999).

Le taux d'urée, tout comme la créatinine, est un indicateur sensible de l'insuffisance rénale. Mais le taux d'urée est plus influencé que la créatinine par l'alimentation. Ainsi, la créatinine sera un meilleur indicateur de la fonction rénale. Cela est particulièrement vrai chez les ruminants chez qui le taux d'urée peut rester dans des valeurs normales alors qu'une insuffisance rénale est déjà installée (SMITH, 1996).

L'urémie est d'environ 25 (20-40) mg/dL en valeurs normales chez le bovins.

2. Créatinine

La créatinine est produite par le cycle d'utilisation de la phosphocréatinine, qui libère de l'énergie pour les muscles. Elle est excrétée par le rein, après filtration glomérulaire.

La créatinine est d'environ 1,2 (1,0 – 1,5) mg / 100 mL chez les bovins. On observe une élévation de la créatininémie lors d'hypovolémie (par exemple lors d'entérite, de péritonite, de déficience cardiaque grave ou d'hémorragie), d'atteinte rénale ou d'urolithiases (SMITH, 1996).

3. β -Hydroxy-butyrate (BOH)

Le BOH est un corps cétonique issu de l'oxydation des acides gras non estérifiés (AGNE) et est produit dans la paroi du rumen. Les AGNE, encore appelés acides gras libres sont la source principale d'acides gras et proviennent de la mobilisation des graisses de réserve. Certains AGNE sont utilisés directement par les tissus périphériques mais au moins 25% d'entre eux sont captés par le foie. Dans cet organe, ils peuvent suivre une voie catabolique en pénétrant dans les mitochondries où ils se transforment principalement en corps cétoniques ou une voie anabolique (synthèse de triglycérides) en restant dans le cytosol.

Quand la quantité d'AGNE disponibles augmente, l'oxydation complète des ces lipides est rapidement limitée par les besoins énergétiques du foie. Les AGNE sont alors oxydés en corps cétoniques BOH et acétoacétate. Ces derniers ne doivent pas être considérés comme des substances toxiques mais au contraire comme des nutriments énergétiques qui épargnent le glucose. Grâce à leur solubilité et à leur aptitude à pénétrer dans les cellules plus facilement que les acides gras, ils se substituent avantageusement à ces derniers.

Cependant des troubles apparaissent lorsque la vitesse de production des corps cétoniques dépasse leur vitesse d'utilisation par les tissus périphériques. C'est pour le BOH que la saturation intervient le plus vite. En effet, il constitue le corps cétonique prédominant chez les ruminants et son utilisation maximale par les tissus périphériques est plus faible que celle de l'acétoacétate (JEAN-BLAIN, 1995).

Les valeurs normales sanguines du BOH sont comprises entre 0 et 9 mg/dL (SMITH, 1996).

4. Protéines totales

Les protéines plasmatiques constituent un groupe très hétérogène comprenant des holoprotéines (molécules constituées d'un enchaînement d'acides aminés), des glycoprotéines et des lipoprotéines.

Actuellement une centaine de protéines ont été dénombrées dans le plasma.

Elles interviennent principalement :

- dans le maintien de la pression oncotique sanguine (albumine...),
- dans le transport non spécifique de substances physiologiques comme le fer (transferrine), l'hémoglobine (haptoglobine), les triglycérides, le cholestérol, les phospholipides (lipoprotéines) ou des médicaments (albumine),
- dans l'inhibition des protéases plasmatiques et tissulaires,
- dans la coagulation (fibrinogène, prothrombine),

- dans l'immunité humorale (Immunoglobulines et fractions du complément),
- dans les systèmes tampons sanguins (MAURICE- ESTEPA *et al.*, 2003).

Les valeurs sériques des protéines totales sont influencées par cinq séries de facteurs : la variation des valeurs hydriques de l'animal (toute hémococoncentration ou hémodilution provoque respectivement des hyperprotéinémies et des hypoprotéinémies dites fonctionnelles) ; la réduction des précurseurs (carence alimentaire en acides aminés) ; la réduction de l'efficacité de la synthèse (troubles hépatiques) ; une réponse immunitaire humorale, la synthèse de globulines, l'immunodéficience ; les fuites anormales intestinales ou rénales. Dans ce dernier cas, l'hypoprotéinémie implique une protéinurie rénale massive.

Les hyperprotéinémies sont dues à des phénomènes d'hémococoncentration et surtout à des hypergammaglobulinémies (myélomes) (TREMBLAY, 2000 ; MAURICE- ESTEPA *et al.* 2003).

Les protéines totales sériques (ou plasmatiques) peuvent être dosées par des méthodes physiques ou chimiques, la difficulté majeure à leur détermination étant liée à leur hétérogénéité.

Actuellement 90% des laboratoires utilisent une technique colorimétrique reposant sur la réaction de coloration du biuret. En milieu alcalin (hydroxyde de sodium) les liaisons peptidiques des protéines réagissent avec les ions cuivriques pour former des complexes de coloration rouge, présentant un maximum d'absorption à 540 nm. L'intensité de la coloration dépend du nombre de liaisons. Cette réaction étant caractéristique de la liaison peptidique, toutes les protéines, à l'exception de quelques glycoprotéines, sont susceptibles de réagir pour former un composé coloré.

5. Albumine

L'analyse des paramètres biochimiques sanguins ne se limite pas aux indicateurs nutritionnels. Les variations de concentration des protéines plasmatiques peuvent refléter l'altération de certaines fonctions de l'organisme (VERRIELE *et al.*, 1999).

La synthèse de l'albumine, du fibrinogène et plus généralement des α et β -globulines, a lieu dans le foie. Les albumines sont synthétisées à partir des PDIM et des PDIA absorbées dans l'intestin et des protéines corporelles (muscles).

L'albumine, de poids moléculaire 69 000 daltons, représente 40 à 50% des protéines plasmatiques. Son rôle biologique est l'apport d'acides aminés ou d'hormones vers les tissus. Elle joue un rôle dans la détoxification. Son taux moyen normal chez la vache laitière est compris entre 30 et 36 g/L (SMITH, 1996), les valeurs sont très stables.

Le taux d'albumine est directement fonction de la différence entre les prélèvements tissulaires, l'excrétion et les apports alimentaires.

Les valeurs moyennes faibles de l'albumine ne sont pas en soi à l'origine de troubles fonctionnels. Elles indiquent cependant que tous les tissus de l'organisme ont subi le même sort que le foie. Tous les tissus sont incapables de renouveler de manière adéquate leurs protéines (TREMBLAY, 2000). Les principaux facteurs de baisse des albumines plasmatiques sont : une insuffisance hépatique marquée et chronique (stéatose sévère, fibrose étendue (fasciolose)) ; le parasitisme digestif ; une sous-alimentation globale, en particulier protéique ; une excrétion rénale ou digestive accrue (amyloïdose, entérite chronique).

Des valeurs élevées de l'albumine sont associées à une surproduction par le foie lorsque la disponibilité en acides aminés du pool extracellulaire est très importante. Cette situation peut être associée à un état de suralimentation (TREMBLAY, 2000).

6. Gamma glutamyl transpeptidase (GGT)

L'enzyme GGT est une carboxypeptidase associée aux membranes cellulaires. Elle est abondante dans les reins mais la variation de l'activité sérique est principalement hépatique.

La concentration normale de GGT est comprise entre 15 et 39 UI/L (SMITH, 1996). Une augmentation de GGT signe une atteinte des voies hépatobiliaires (cholestase, nécrose des hépatocytes, stéatose hépatique) (VERRIELE *et al.*, 1999).

Le colostrum contient une activité très élevée de GGT et l'enzyme semble être absorbée par l'intestin du veau par un mécanisme similaire à celui des gamma globulines. La valeur de GGT du veau à la naissance et les jours suivants donne une bonne indication de la quantité de colostrum ingérée (TREMBLAY, 2000).

7. Aspartate Aminotransférase (ASAT)

Cette enzyme se trouve en quantité importante dans de nombreux tissus comme les muscles squelettiques et cardiaque, les érythrocytes, les reins et le foie. Cette enzyme est un indicateur non spécifique de la nécrose des tissus. Sa demi-vie est relativement longue et de élévations de sa quantité peuvent persister jusqu'à 10 jours après une nécrose musculaire ou une atteinte hépatique. (SMITH, 1996).

Une augmentation moyenne de l'ASAT indique une affection hépatique (steatose, fasciolose, intoxication (Cu par exemple)).

Son taux normal est compris entre 50 et 150 UI/L.

Les concentrations d'ASAT augmentent dans toutes les affections musculaires, parallèlement à celles de la créatine kinase (CK) (VERRIELE *et al.*, 1999 ; AUBADIE, 2003).

8. Fibrinogène

Le fibrinogène est une grosse protéine produite par le foie. Il sert de substrat à la thrombine pour la formation de fibrine pendant l'hémostase. Il est retrouvé dans le plasma, les vaisseaux lymphatiques, les tissus et les espaces interstitiels.

La teneur en fibrinogène plasmatique est d'environ 5 (3-7) g/L chez les bovins, ce qui est notoirement plus élevé que chez les autres animaux. Elle est plus basse chez les veaux : $1,6 \pm 1,3$ g/L (JAIN, 1993). Il n'y a pas de variation avec le sexe ou la gestation.

Elle augmente lors d'inflammation (abcès, mammite, réticulopéritonite...), mais cette augmentation n'est pas toujours corrélée à la sévérité de la maladie. Le taux de fibrinogène augmente dès qu'il y a un dommage cellulaire. Dans une étude de Mc SHERRY *et al.* (1970), les vaches atteintes de péricardite ou de péritonites étaient celles qui présentaient le taux de fibrinogène le plus haut.

Le taux de fibrinogène diminue lors d'un problème hépatique important, le foie étant le lieu de synthèse du fibrinogène. Cependant, il faut qu'une très grande partie du foie soit endommagée pour que le taux de fibrinogène chute. La teneur en fibrinogène plasmatique diminue lorsque le fibrinogène est consommé rapidement, c'est-à-dire en cas de fibrinolyse ou de relargage de thromboplastine. Ceci peut se produire lors d'accidents obstétricaux, de choc ou de cancer généralisé. (Mc SHERRY *et al.*, 1970).

Le fibrinogène est un très bon marqueur de l'inflammation chez les bovins, qui produisent beaucoup de fibrine lors des processus inflammatoires (SMITH, 1996). Le taux de fibrinogène augmente en 24 heures après le début de l'inflammation et reste élevé tant que le processus est actif. Il est un meilleur marqueur de l'inflammation que la numération leucocytaire. En effet, la réserve médullaire en neutrophiles est faible chez les bovins ; les neutrophiles sont donc rapidement consommés et une neutropénie s'installe. Dans une étude de SUTTON et HOBMAN (1975), sur 716 vaches atteintes de processus infectieux, 10% avaient un taux de fibrinogène augmenté et des résultats hématologiques normaux.

9. Facteurs de variation des analyses biochimiques

a) Variations liées au conditionnement et au stockage du prélèvement

La température modifie la stabilité des enzymes. Il convient donc d'effectuer les dosages la plus rapidement possible ou de conserver les prélèvements au froid (ASAT stable 4j à 20°C et 112j à -120°C sur anticoagulant oxalate ; GGT stable 7j à 20°C, 4j à 4°C, 28j à -20°C sur anticoagulant oxalate et citrate) (AUBADIE, 2003).

b) Variations selon la saison et le moment de la journée

Certains éléments varient avec la saison (hématocrite, hémoglobine, et K ont des valeurs 7 à 10% plus élevées en été et 25 à 30% pour l'urée).

La prise alimentaire modifie beaucoup les concentrations de l'urée : l'urémie atteint son maximum deux à quatre heures après le repas (AUBADIE, 2003).

10. Biochimie lors des syndromes inflammatoires

Lors de syndromes inflammatoires, il convient de doser les protéines (PT, Albumine et Fibrinogène). Ces syndromes se manifestent par une hyperglobulinémie (>40g/L) et une élévation du fibrinogène (>7g/L) et des PT (>75g/L). Si les PT dépassent 90g/L, le pronostic est sombre (AUBADIE, 2003).

Avec les protéines totales, il est impératif de doser l'albumine car, lors d'atteinte hépatique ou de carence alimentaire, l'hypoalbuminémie peut masquer une hyperglobulinémie. Cependant les valeurs des globulines et par conséquent des protéines totales, montent très vite en cas d'inflammation, alors que l'albumine évolue très lentement, ce qui rend son dosage peut utile en début d'affection (AUBADIE, 2003).

DEUXIÈME PARTIE :
ÉTUDE PERSONNELLE

Cette étude est une étude prospective réalisée entre 2002 et 2005 dans le cadre d'une étude plus large entreprise par l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique), l'INA-PG (Institut National d'Agronomie de Paris-Grignon) et l'ENVA (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort), afin d'expertiser la qualité des bovins issus de clonage somatique. Le protocole « Qualité des clones » vise à évaluer les risques alimentaires, sanitaires, nutritionnels, allergiques ou toxiques que pourraient représenter ces animaux ou leurs produits s'ils entraient dans la chaîne alimentaire humaine. L'étude est menée en grande partie à l'Unité expérimentale de Bressonvilliers dans l'Essonne, où naissent et sont élevés ces bovins clonés. Cette grande étude comprend quatre volets et notre travail s'inscrit dans celui orienté vers l'étude clinique des clones. Il fait directement suite à celui réalisé en 2003 par Hedwige ISSENMANN qui avait étudié neuf critères hématologiques (taux d'hémoglobine, hématocrite, volume globulaire moyen, numérations des lymphocytes, des neutrophiles et des monocytes) et quatre paramètres biochimiques (glucose, urée, créatinine et taux de fibrinogène) chez 23 veaux produits par clonage somatique et 12 témoins d'IA, entre 1 et 63 jours après la naissance.

I. Animaux, Matériels et Méthodes

A. Période

Cette étude est une étude rétrospective effectuée à partir de résultats que nous avons collectés chez les veaux de 4 mois à 24 mois, de Décembre 2002 à Juin 2005. Nous comparerons ici les résultats recueillis chez des veaux témoins avec ceux obtenus chez des veaux produits par clonage.

B. Animaux

Tous les animaux pris en compte dans cette étude sont des génisses de race Prim'Holstein, âgées de 4 mois à 24 mois, nés et élevés à l'Unité expérimentale de Bressonvilliers. Deux catégories d'animaux sont distinguées : les clones, obtenus par clonage somatique et qui constituent le groupe 1 de l'étude, et les témoins issus d'insémination artificielle, qui constituent le groupe 2. L'inventaire de tous ces animaux se situe en **annexe 1**.

C. Méthodes d'obtention des individus clonés

Comme nous l'avons vu, il existe plusieurs méthodes pour obtenir un clone. La méthode utilisée à l'heure actuelle est le transfert nucléaire. Il s'agit d'extraire le matériel chromosomique d'un ovocyte ovulé en métaphase II et de le remplacer par le noyau d'une cellule donneuse. Le nombre d'individus par clone dépend alors du nombre de cellules donneuses. Il peut être très important dans le cas de cellules somatiques. Le principe du clonage par transfert nucléaire est assez bien rodé, et est commun à la plupart des équipes de recherche travaillant sur les clones. Les protocoles sont par contre spécifiques pour chaque équipe de par les milieux de culture utilisés ainsi que les cellules donneuses. Les individus

clonés utilisés dans notre étude ont été obtenus pas le protocole actuellement en usage à l'INRA (CHAVATTE-PALMER *et al.* 2002, HEYMANN *et al.* 2002).

1. Obtention des ovocytes

Les ovocytes proviennent d'ovaires, collectés en abattoir sur des animaux sains destinés à la consommation humaine, rincés plusieurs fois avec une solution saline et acheminés dans un milieu PBS stérile à 33°C au laboratoire dans les 3 heures qui suivent l'abattage. Puis, les complexes ovocytes – cumulus des follicules de 2 à 7 mm sont aspirés, mesurés, calibrés, lavés puis choisis morphologiquement par rapport à la densité cellulaire de leur cumulus. Ensuite les complexes sont placés dans un milieu de maturation : un milieu de *culture tissulaire medium 199* (TCM 199) supplémenté à 10% en sérum foetal bovin (SFV), pendant 22 h à 39°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Après la maturation, les ovocytes peuvent servir soit à la fécondation *in vitro*, soit dans notre cas, à recevoir une cellule somatique afin de produire un individu cloné.

2. Obtention des embryons

a) Le transfert nucléaire

Les ovocytes matures en métaphase II sont débarrassés mécaniquement des cellules du cumulus. Ils sont ensuite mis en culture en présence de hyaluronidase pendant 10 minutes (TCM 199 + 0,5% (w/v) hyaluronidase) afin de digérer la zone pellucide, puis en présence d'un colorant vital fluorescent (TCM 199 + 0,5 µg/mL de Hoechst 33342) pendant 20 minutes. Ce procédé permet de visualiser la plaque métaphasique sous une lumière de faible intensité. A l'aide d'une pipette biseautée introduite sous la membrane pellucide, on extrait le premier globule polaire puis le matériel nucléaire en métaphase après avoir traversé la membrane cytoplasmique. Les ovocytes « vides » sont alors prêts à recevoir un autre matériel nucléaire.

Les cellules donneuses sont dans notre cas des 3 lignées de cellules somatiques adultes issues de cultures de fibroblastes. Les cellules sont mises en culture afin d'obtenir des populations quiescentes ou des populations en croissance. Quelques minutes avant le transfert les cellules sont séparées les unes des autres mécaniquement par centrifugation pendant 5 minutes à 1200 x g et remises en suspension dans un nouveau milieu de culture TCM 199.

La reconstitution de l'embryon se fait par micromanipulation. On introduit chaque cellule somatique isolée dans l'espace périvitellin à l'aide d'une pipette biseautée. Puis on provoque la fusion de la membrane ovocytaire et de la membrane cytoplasmique de la cellule donneuse en soumettant l'embryon à un champ électrique entre deux électrodes. Environ une heure après, la fusion est effective. L'électrostimulation provoque également l'activation et la reprise du développement embryonnaire (VIGNON *et al.* 1998).

b) Devenir *in vitro* des embryons

Les embryons reconstitués issus de transfert nucléaire sont mis en culture dans 50 µL de milieu B avec 2,5% de SFV et en présence de cellules *Vero* (lignée cellulaire issue du rein d'un singe africain *Cercopithecus aethiops*, communément utilisé comme milieu de culture). Les micro-puits de culture sont ensuite fermés avec une huile minérale et mis à incuber pendant 7 jours à 39°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. Après 2 jours de culture, les embryons sont examinés afin de vérifier la formation de blastocystes. Après 7 jours de culture, les embryons sont évalués par comptage du nombre de cellules par blastocyste et seuls ceux de grade 1 et 2 seront implantés dans les génisses receveuses.

3. Préparation des receveuses

Les receveuses sont des génisses de race Normande, Maine Anjou ou croisées, nées et élevées en fermes. Nous choisissons d'utiliser des génisses parce qu'elles ont un meilleur taux de réussite en transfert embryonnaire (HEYMAN *et al.*, 2005, BRISVILLE, 2006). Elles sont introduites à l'âge de 12 à 14 mois à la ferme expérimentale de Bressonvilliers après avoir subi différents tests (cutanés, virologiques, sérologiques), 2 mois de quarantaine et une

vaccination contre *Mannheimia haemolytica* (Tecvax ®) afin de garantir leur statut indemne des maladies infectieuses suivantes : brucellose, leucose, tuberculose, IBR, fièvre Q, Herpesvirus bovin 4, chlamydie, néosporose et BVD. Après quelques semaines d'acclimatation à leur nouvel environnement et après avoir vérifié que les génisses sont bien cyclées, elles sont synchronisées à l'âge de 15 à 18 mois à l'aide d'un protocole Crestar® (pose d'un implant de progestagènes, injection de prostaglandines à 9 jours et retrait à 11 jours). Les génisses en chaleur, qui sont synchronisées à 24 h près avec l'âge de l'embryon et qui ont un corps jaune seront receveuses. Après 7 jours de culture, les blastocystes sont transférés à raison d'un par receveuse. L'embryon est introduit de manière non chirurgicale, au moyen d'une seringue munie d'une canule, dans la corne ipsilatérale au corps jaune détecté. L'opération se fait sous anesthésie épidurale basse.

4. Suivi des gestations

Les génisses receveuses ont été suivies tout au long de leur gestation

a) Suivi biochimique

Un dosage de la progestérone plasmatique a été réalisé 21 jours après ovulation, soit 14 jours après l'implantation, afin de s'assurer qu'elles étaient bien gestantes, que les transferts s'étaient bien passés et que les embryons s'étaient bien implantés. Les génisses sont considérées comme non gestantes si leur taux de progestérone est inférieur à 1 mg/mL et supposées gestantes si le taux est supérieur à 2 mg/mL.

b) Suivi échographique

Toutes les génisses sont échographiées à 35 jours de gestation présumée afin de confirmer ou d'infirmer la présence d'un embryon viable. Il s'agit d'un examen par voie transrectale avec une sonde de 5 MHz. Les échographies sont répétées à 50, 70 et 90 jours de gestation. Un suivi échographique est effectué ensuite par voie rectale et transabdominale pour détecter et

interrompre les gestations pathologiques (anomalies placentaires, hydropisie des enveloppes) et les anomalies de développement fréquentes chez les clones (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2006 ; CONSTANT *et al.*, 2006).

5. Naissance

La naissance des animaux clonés se fait par césarienne 36 heures après une injection de dexaméthasone lorsque le vêlage n'est pas intervenu après 282 jours de gestation. Les premiers examens sont pratiqués dans les heures qui suivent la naissance : les veaux sont pesés, examinés et une prise de sang est réalisée avant la prise de colostrum.

6. Obtention des témoins

Les animaux témoins de notre étude sont des génisses Prim'Holstein contemporaines des veaux clonés et nées après insémination artificielle. Le but de notre étude étant de déterminer si les animaux clonés sont normaux, il nous a semblé plus judicieux d'utiliser comme témoins des individus nés dans des conditions les plus proches de celles du terrain (femelles Prim'Holstein obtenues par IA). Seules les femelles entrent dans le protocole afin d'éliminer le biais dû au sexe, et toutes les génisses, clonées ou témoins, sont élevées ensembles, de la même manière.

D. Examen des animaux

1. Animaux étudiés

Notre étude porte sur 15 veaux clonés issus de 3 génotypes différents, et 18 veaux témoins issus d'insémination artificielle. L'inventaire des animaux est présent en **annexe 1**.

Les animaux ont été examinés à intervalles réguliers au cours de la période néonatale et de la croissance jusqu'à l'âge de 36 mois. Les prélèvements analysés portent sur la période de 4 à 24 mois.

Les animaux sont élevés de la naissance jusqu'à l'âge de 2 mois en cases individuelles puis en groupes de même âge de 6 à 8 animaux. A partir de l'âge de 4 mois, les examens ont lieu tous les 2 mois jusqu'à l'âge de 18 mois (âge auquel une génisse Prim'Holstein normale entre dans le cycle de production), puis tous les 6 mois jusqu'à l'âge de 36 mois.

2. Examen clinique

L'examen clinique est pratiqué par des intervenants extérieurs à Bressonsvilliers, à savoir un vétérinaire (le Pr J-P Mialot (ENVA), le Dr P Chavatte-Palmer (INRA) ou le Dr D Remy (ENVA)) accompagné d'une ou plusieurs étudiantes de l'ENVA (H Issenmann, A-C Brisville ou nous-même).

L'examen clinique est effectué en suivant la feuille d'examen clinique présentée en **annexe 2**.

Il se décompose de la façon suivante :

- fréquence cardiaque mesurée à l'aide d'un stéthoscope sur 1 minute, trois fois à 10 minutes d'intervalle. On considère la moyenne des trois valeurs.
- Fréquence respiratoire mesurée à l'aide d'un stéthoscope sur 1 minute, trois fois à 10 minutes d'intervalle. On considère la moyenne des trois valeurs.
- Prise de température à l'aide d'un thermomètre électronique, une fois.
- Examen locomoteur : on observe la démarche des animaux et l'absence d'ataxie
- Examen des muqueuses oculaire, gingivale et vulvaires.

- Examen dermatologique : on relève les lésions cutanées observées.

E. Prises de sang et mesures effectuées

Les prélèvements de sang sont effectués par les techniciens de Bressonvilliers le matin même de la visite. Les prises de sang sont effectuées par ponction de la veine jugulaire dans des tubes sous-vide. Les échantillons sanguins pour la biochimie ont été prélevés sur tubes secs et héparinés et sur E.D.T.A pour les analyses hématologiques.

Les tubes de sang destinés aux analyses biochimiques sont immédiatement centrifugés et le sérum est congelé sous forme d'aliqots à -18°C. Les analyses hématologiques sont effectuées le jour même, ou lorsque cela s'avère impossible, les échantillons sont conservés à 4°C et examinés dans les 48 heures.

Les analyses hématologiques sont effectuées par le laboratoire d'analyses médicales d'Arpajon utilisant les méthodes habituelles. Les comptages cellulaires sont effectués par un analyseur d'hématologie automatique (Cell Dyn 3000 ® ; Abbot Laboratories, Rungis, France), et le dénombrement des leucocytes est effectué manuellement après coloration à l'éosine-nigrosine en comptant 100 cellules. Les concentrations en fibrinogène sont mesurées en utilisant une méthode chromométrique avec le réactif Fibrinomat (Hémolab Laboratory, Lyon, France).

Les analyses biochimiques ont été effectuées à l'ENVA au laboratoire dirigé par Dr A Ponter, avec Mme C Ficheux qui a bien voulu nous encadrer pour les manipulations.

Les dosages ont été réalisés par spectrophotométrie à l'aide de l'analyseur COBAS MIRA de Roche Diagnostics, 2 avenue du Vercors 38242 Meylan cedex.

Les divers protocoles sont détaillés en **annexe 3**.

F. Traitement statistique des données

Les données ont été traitées par le logiciel SAS (Statistic Analysis System). Nous avons pris le groupe (clone/témoin) et l'âge comme variables fixes.

Les individus ont été pris en compte par l'analyse des mesures répétées (proc mixed) (LITTEL *et al.*, 1998) pour les différents paramètres étudiés. Nous avons testé sur les différentes variables l'effet clone, l'effet jour de prélèvement et l'interaction combinée des deux (clone * âge). De plus, pour certains paramètres qui seront précisés, l'effet appartenance à un génotype donné a aussi été testé.

Une valeur p comprise entre 0.10 et 0.05 a été qualifiée de tendance à la différence et symbolisé par +. Une valeur p inférieure à 0.05 a été utilisée comme valeur seuil pour une différence statistiquement significative et symbolisée sur les graphes par *. Une valeur p inférieure à 0.01 a été symbolisée par ** et une valeur p inférieure à 0.001 par ***.

Les zones grisées représentent les intervalles de variation normaux.

II. Résultats

Les annexes 4, 5, 6 et 7 présentent les résultats des prises de sang de tous les animaux de l'étude.

A. Etude clinique

1. Température

Les températures des clones et des témoins se situent dans les zones de température normales (**Tableau XI, Figure 5**).

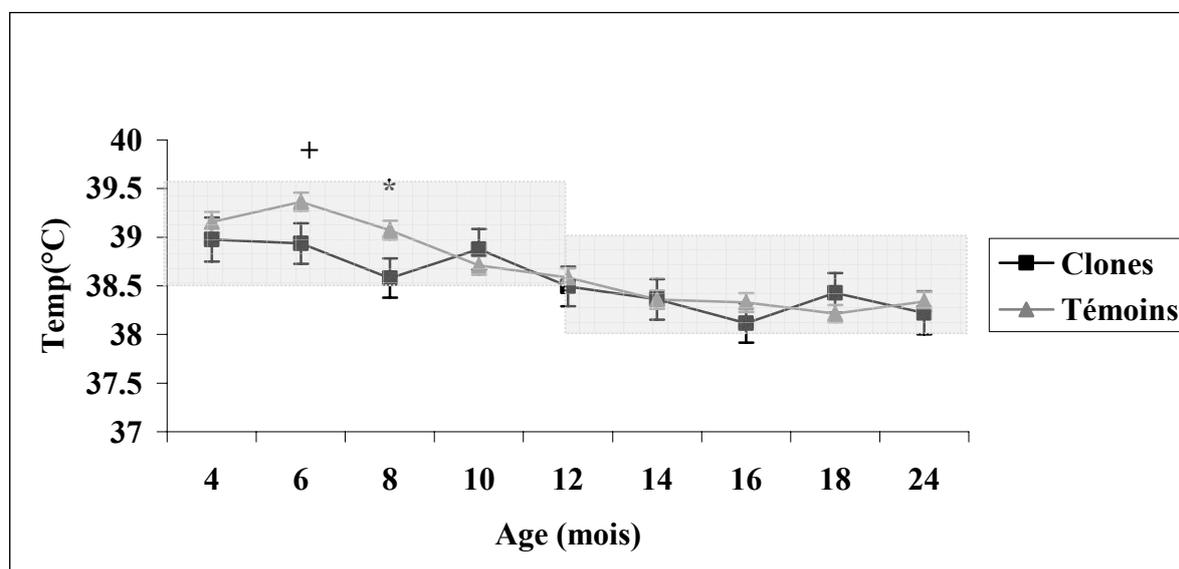
On observe une tendance des températures à diminuer avec l'âge, ce qui est un phénomène normal chez tous les mammifères. A partir de 12 mois, les températures rectales se stabilisent autour de 38,5, qui est la température normale d'une vache adulte.

On note une température rectale significativement plus basse chez les clones à 8 mois, par rapport aux témoins, ainsi qu'une tendance dans ce sens à 6 mois.

Tableau XI : Température moyenne et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins au cours du temps

Age (mois)	Température des clones (°C)	Température des témoins (°C)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	39,0	39,1	0,2	0,1
6	38,9	39,4	0,2	0,1
8	38,6	39,1	0,2	0,1
10	38,9	38,7	0,2	0,1
12	38,5	38,6	0,2	0,1
14	38,4	38,4	0,2	0,1
16	38,1	38,3	0,2	0,1
18	38,4	38,2	0,2	0,1
24	38,2	38,3	0,2	0,1

Figure 5 : Température moyenne et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins au cours du temps



2. Fréquence cardiaque

Les fréquences cardiaques des clones et des témoins se situent dans les normes sauf à 14 mois où elles sont un peu élevées (**Tableau XII et Figure 6**).

Il n'y a pas de différence significative entre clones et témoins.

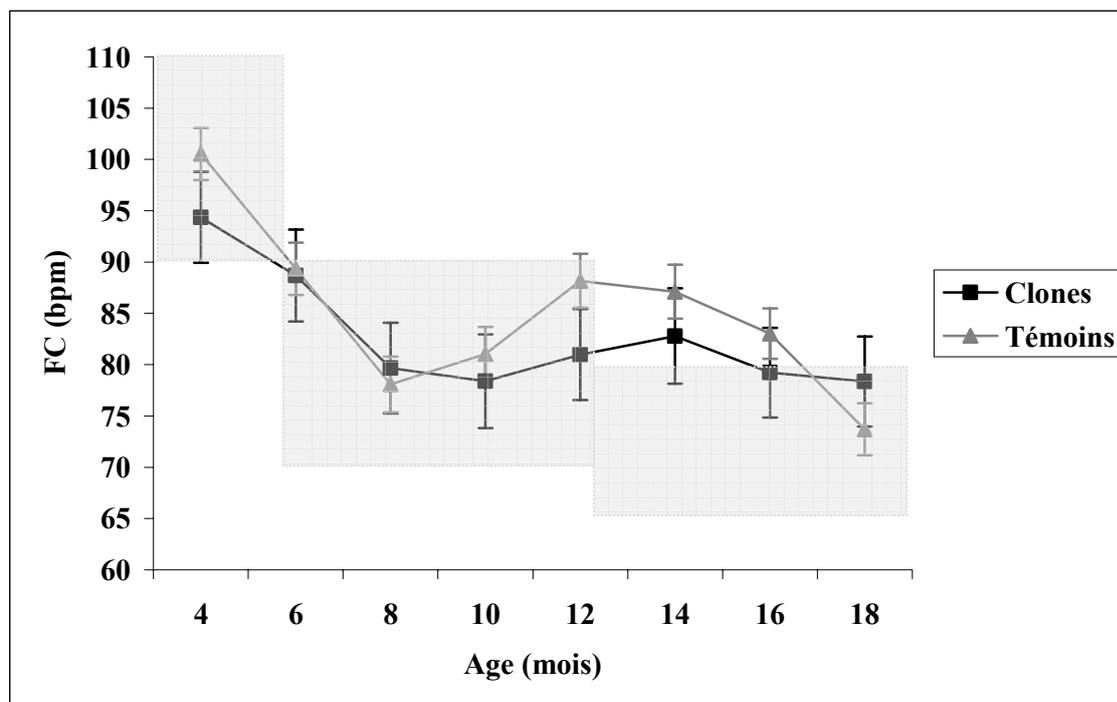
Tableau XII : Fréquence cardiaque moyenne et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins au cours du temps

bpm = battement par minute

Age (mois)	Fréquence cardiaque des clones (bpm)	Fréquence cardiaque des témoins (bpm)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	94	101	4	3
6	89	89	4	3
8	80	78	4	3
10	78	81	5	3
12	81	88	4	3
14	83	87	5	3
16	79	83	4	3
18	78	74	4	3
24	66	73	5	3

Figure 6 : Fréquence cardiaque moyenne et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins au cours du temps

FC = Fréquence cardiaque



3. Fréquence respiratoire

Les fréquences respiratoires des clones et des témoins se situent dans les normes (**Tableau XIII et Figure 7**).

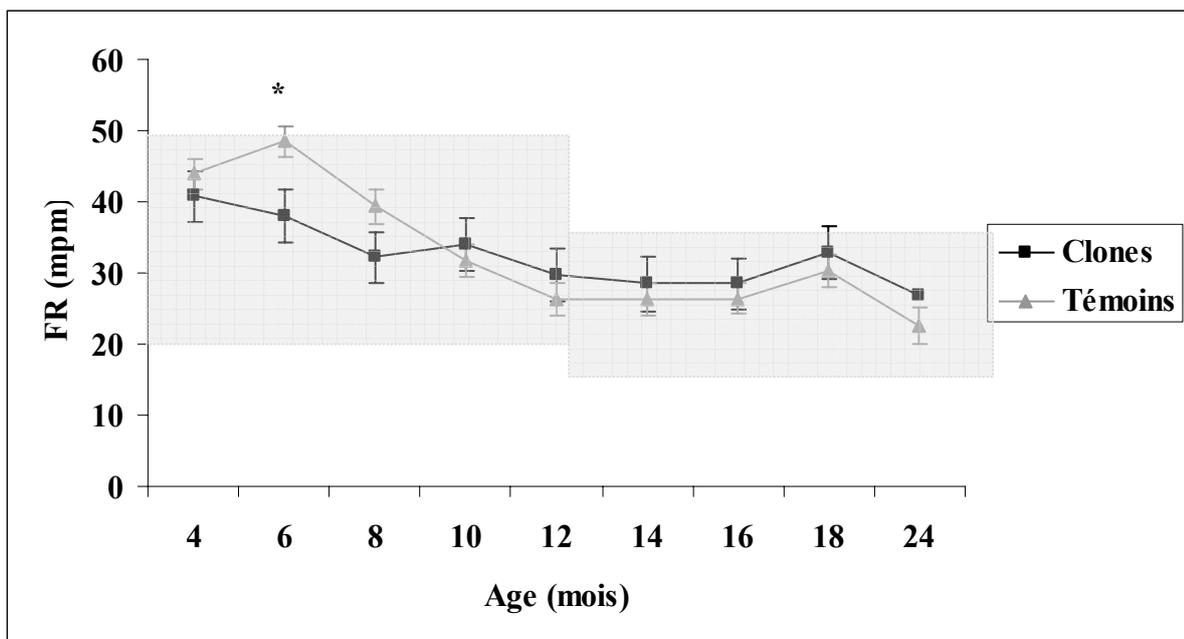
On note une FR plus élevée chez les témoins à 6 mois. Aux autres âges, il n'y a pas de différence significative ente clones et témoins.

Tableau XIII : Fréquence respiratoire moyenne et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins au cours du temps

mpm = mouvement par minute

Age (mois)	Fréquence respiratoire des clones (mpm)	Fréquence respiratoire des témoins (mpm)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	41	44	4	2
6	38	48	4	2
8	32	39	4	2
10	34	32	4	2
12	30	26	4	2
14	29	26	4	2
16	28	26	4	2
18	33	30	4	2
24	27	23	4	2

Figure 7 : Fréquence respiratoire moyenne et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins au cours du temps



B. Hématologie

1. Lignée rouge

a) Nombre d'hématies

On observe des valeurs moyennes du nombre d'hématies pour les clones et les témoins. Seuls les clones à 4 mois sortent très légèrement de la valeur normale supérieure avec un nombre d'hématies de $10.7 \cdot 10^6$ au lieu de $10 \cdot 10^6$ (**Tableau XIV**).

On note des variations au cours du temps et une dispersion des valeurs (visualisée par la taille de la barre d'erreur) plus marquée chez les clones que chez les témoins (**Figure 8**).

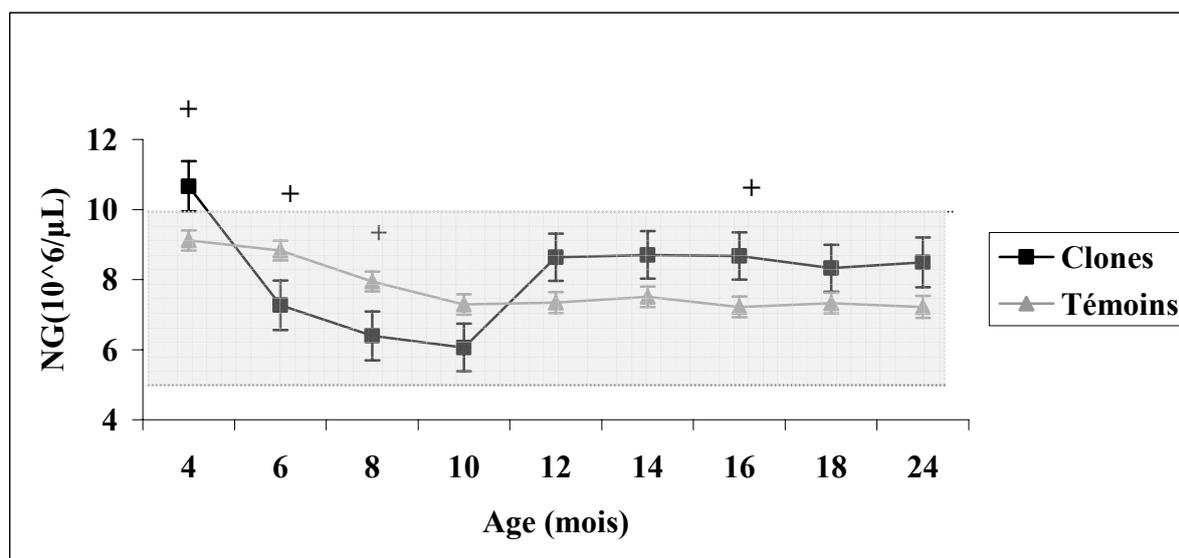
Dans l'ensemble, il n'y a pas de différence significative entre clone et témoins, seulement une tendance à 4, 6, 8 et 16 mois mais toujours dans les normes.

Statistiquement, il n'y a pas de différence significative entre clone et témoins.

Tableau XIV : Numération globulaire moyenne et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Hématies des clones ($10^6/\mu\text{L}$)	Hématies des témoins ($10^6/\mu\text{L}$)	\pm Erreur Standard clones	\pm Erreur Standard témoins
4	10,7	9,1	0,7	0,3
6	7,3	8,	0,7	0,3
8	6,4	7,9	0,7	0,3
10	6,1	7,3	0,7	0,3
12	8,7	7,3	0,7	0,3
14	8,7	7,5	0,7	0,3
16	8,7	7,2	0,7	0,3
18	8,3	7,3	0,7	0,3
24	8,5	7,2	0,7	0,3

Figure 8 : Numération globulaire moyenne et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins au cours du temps



b) Hématocrite

On observe des valeurs pour clones et témoins qui se situent dans les normes (**Tableau XV**).

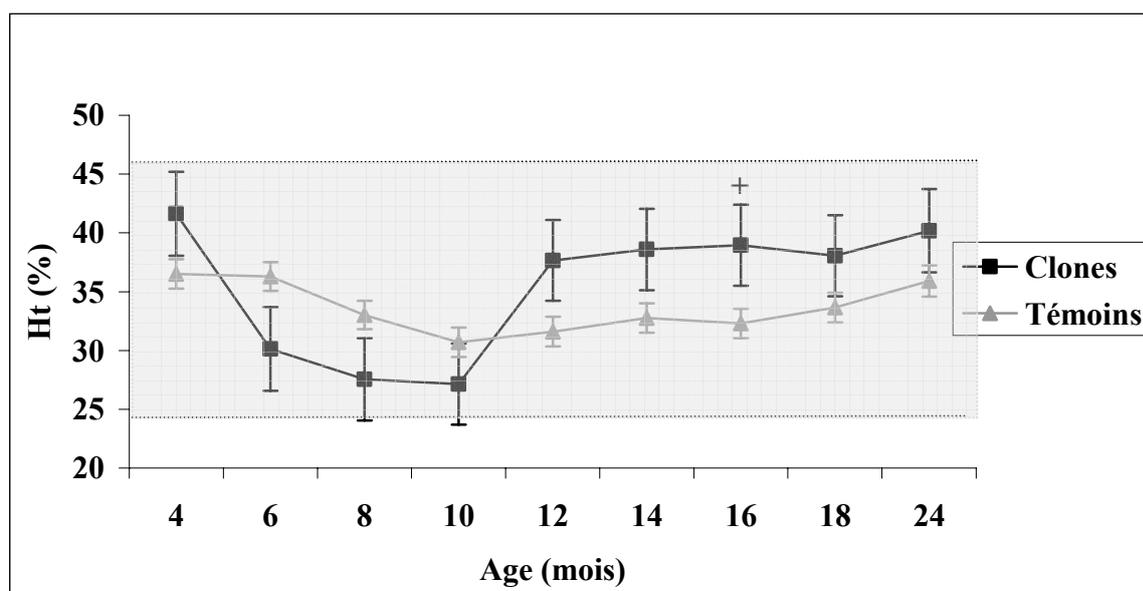
Les variations au cours du temps et la dispersion des valeurs sont plus importantes chez les clones que chez les témoins.

On note une tendance à la différence entre clones et témoins au 16^{ème} mois mais pas de différence statistiquement significative ente clones et témoins (**Figure 9**).

Tableau XV : Hématocrite moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Hématocrite des clones (%)	Hématocrite des témoins (%)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	41,6	36,5	3,6	1,2
6	30,1	36,3	3,6	1,2
8	27,5	33,0	3,5	1,2
10	27,2	30,7	3,4	1,2
12	37,7	31,6	3,4	1,3
14	38,6	32,8	3,5	1,3
16	39,0	32,3	3,4	1,3
18	38,1	33,6	3,4	1,3
24	40,2	35,9	3,5	1,3

Figure 9 : Hématocrite moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



c) Hémoglobine

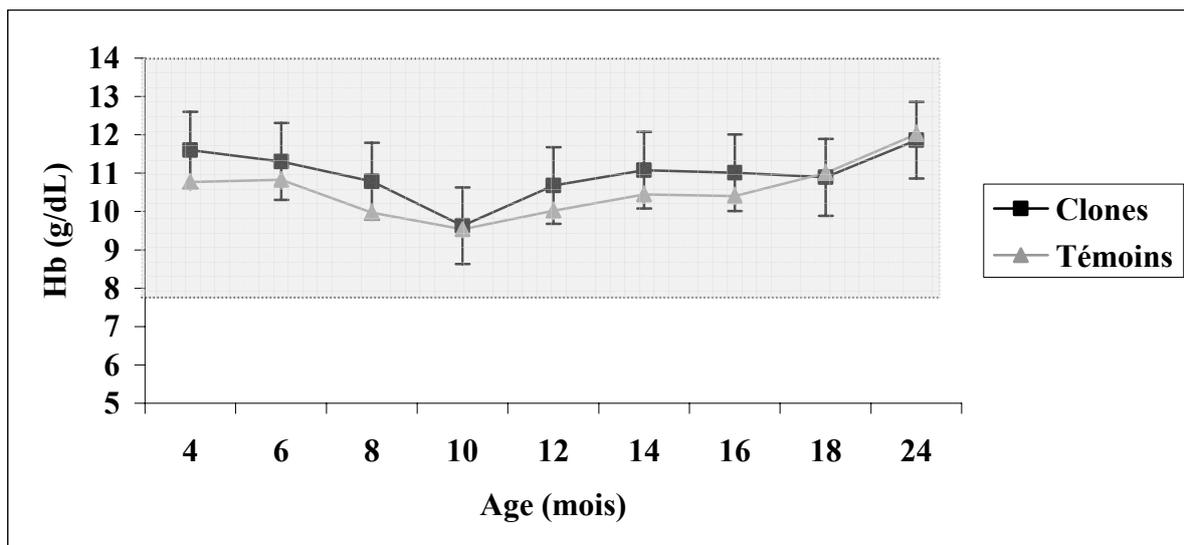
Le taux d'hémoglobine se situe dans les normes pour les clones et les témoins. La dispersion des valeurs est plus marquée chez les clones.

Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre clones et témoins. Globalement, l'interaction groupe par âge n'est pas significative.

Tableau XVI : Taux d'hémoglobine moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Hémoglobine des clones (g/dL)	Hémoglobine des témoins (g/dL)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	11,6	10,8	0,5	0,2
6	11,3	10,8	0,5	0,2
8	10,8	10,0	0,4	0,2
10	9,6	9,5	0,4	0,2
12	10,7	10,0	0,4	0,2
14	11,1	10,4	0,5	0,2
16	11,0	10,4	0,5	0,2
18	10,9	11,0	0,4	0,2
24	11,8	12,0	0,5	0,2

Figure 10 : Taux d'hémoglobine moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



d) Volume Globulaire Moyen

Les valeurs pour les clones et les témoins sont dans les normes (sauf à 4 mois pour les clones dont le VGM est très légèrement plus bas que la normale avec un VGM de $39,52 \mu\text{m}^3$ au lieu de $40 \mu\text{m}^3$) (**Tableau XVII**).

Il existe une différence statistiquement significative entre clones et témoins à 6 mois et 24 mois. A 6 mois, le VGM des clones est supérieur à celui des témoins et à 24 mois, c'est le VGM des témoins qui est supérieur à celui des clones (**Figure 11**).

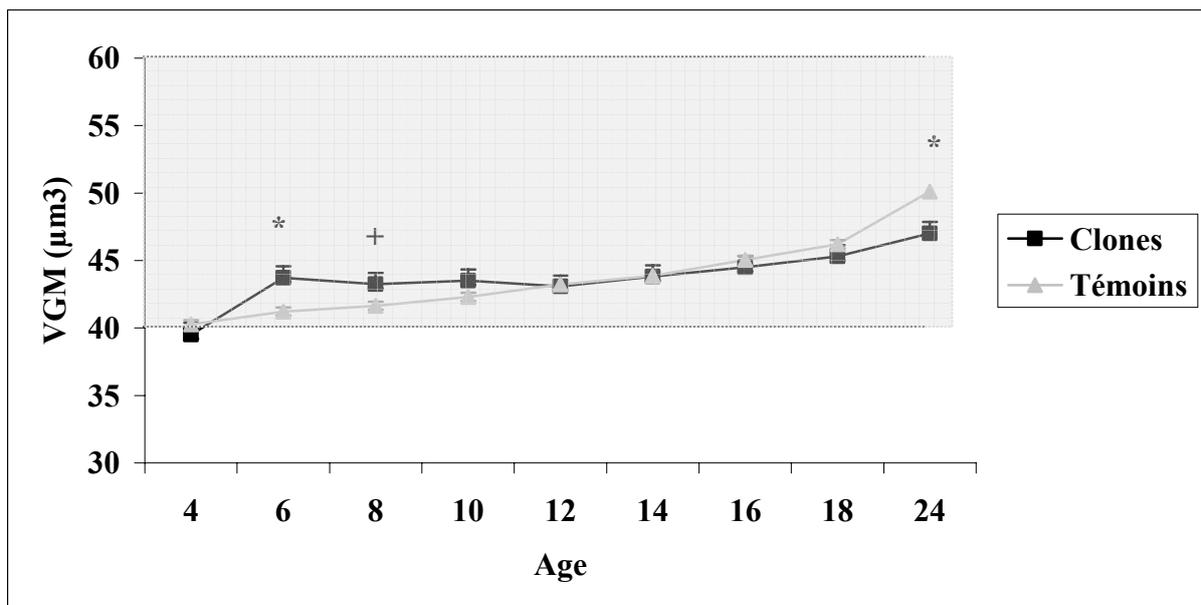
On note une tendance la différence entre clones et témoins à 8 mois.

Il y a une interaction groupe*age ($p < 0,001$) qui est liée au génotype ($p < 0,001$).

Tableau XVII : Volume Globulaire Moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	VGM des clones (μm^3)	VGM des témoins (μm^3)	\pm Erreur Standard clones	\pm Erreur Standard témoins
4	39,5	40,3	0,9	0,3
6	43,7	41,2	0,9	0,3
8	43,0	41,6	0,8	0,3
10	43,5	42,3	0,8	0,3
12	43,1	43,2	0,8	0,3
14	43,8	43,9	0,8	0,3
16	44,5	45,0	0,8	0,3
18	45,3	46,2	0,8	0,3
24	47,0	50,1	0,9	0,3

Figure 11 : Volume Globulaire Moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



e) CCMH

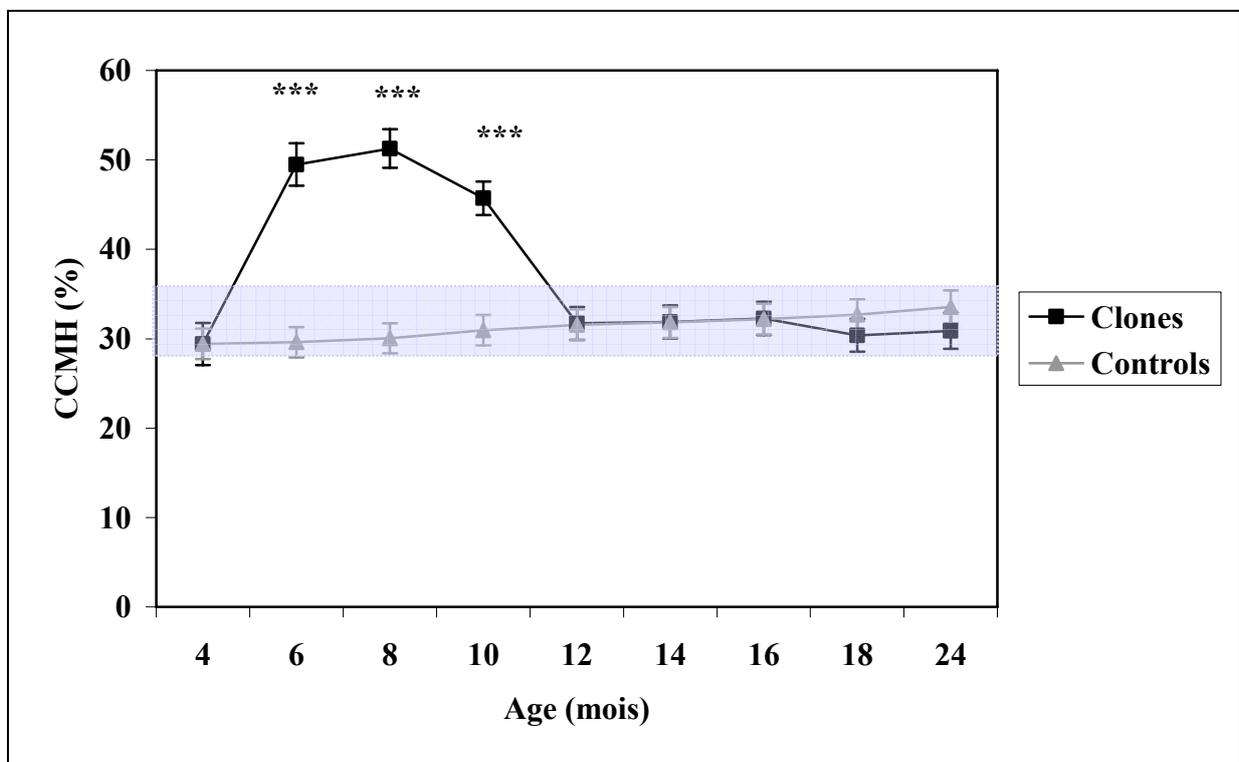
Les valeurs pour les clones et les témoins sont dans les normes sauf à 4, 6 et 8 mois pour les clones dont le CCMH est bien au dessus des valeurs normales (**Tableau XVIII et Figure 12**).

Il existe une différence statistiquement significative ente clones et témoins à 4, 6 et 8 mois.

Tableau XVIII : CCMH et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	CCMH des clones (%)	CCMH des témoins (%)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	29,4	29,4	2,4	1,7
6	49,5	29,6	2,4	1,7
8	51,3	30,0	2,1	1,7
10	45,7	31,0	1,9	1,7
12	31,7	31,6	1,8	1,7
14	31,9	31,8	1,9	1,7
16	32,3	32,2	1,9	1,7
18	30,4	32,7	1,8	1,7
24	30,9	33,6	2,0	1,8

Figure 12 : CCMH et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



f) TGMH

On observe des valeurs moyennes de TGMH pour les témoins. Par contre, les valeurs de TGMH pour les clones à 4, 6, 8 et 10 mois sortent des normes : elles sont en dessous des valeurs basses à 4 mois et au dessus des valeurs hautes à 6, 8 et 10 mois (**Tableau XIX et Figure 13**).

De plus, on note des variations au cours du temps et une dispersion des valeurs importante chez les clones.

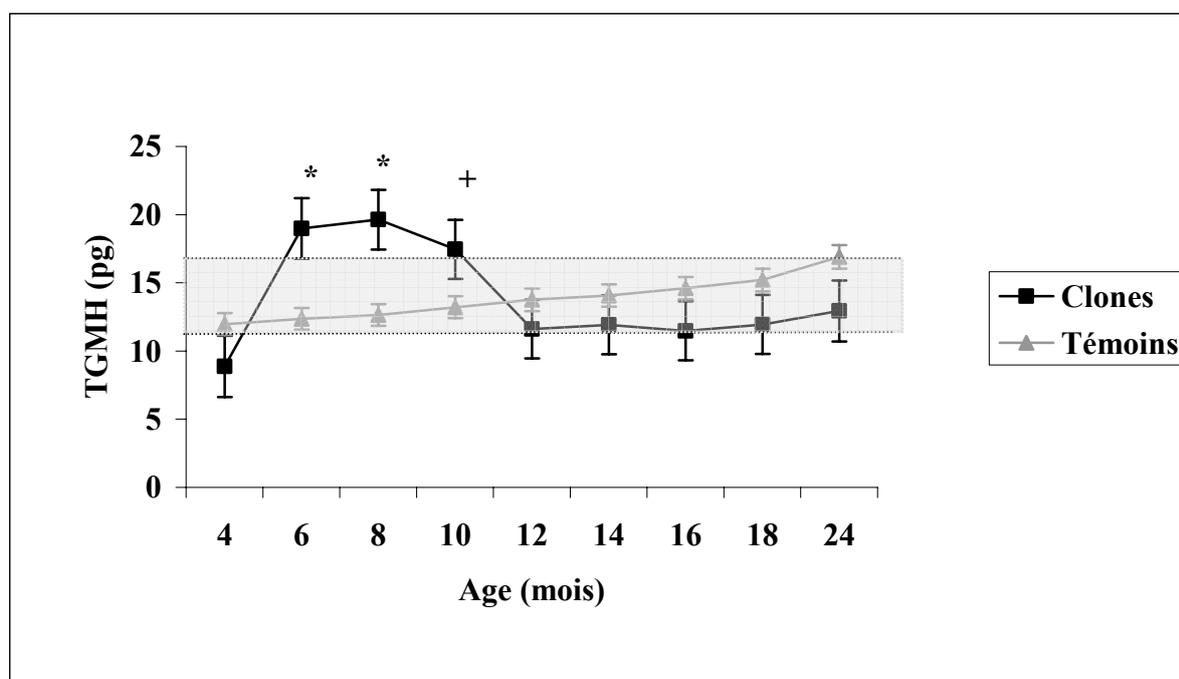
Il y a une différence statistiquement significative entre clones et témoins à 6 et 8 mois et une tendance à 10 mois.

Il existe une interaction groupe par âge ($p < 0.001$) qui n'est pas due au génotype ($p = 0.998$).

Tableau XIX : TGMH et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	TGMH des clones (pg)	TGMH des témoins (pg)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	8,9	12,0	2,3	0,8
6	19,0	12,4	2,2	0,8
8	19,6	12,6	2,2	0,8
10	17,5	13,2	2,2	0,8
12	11,6	13,8	2,2	0,8
14	11,9	14,1	2,2	0,8
16	11,5	14,6	2,2	0,8
18	11,9	15,2	2,2	0,8
24	12,9	16,9	2,2	0,9

Figure 13 : TGMH et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



g) Plaquettes

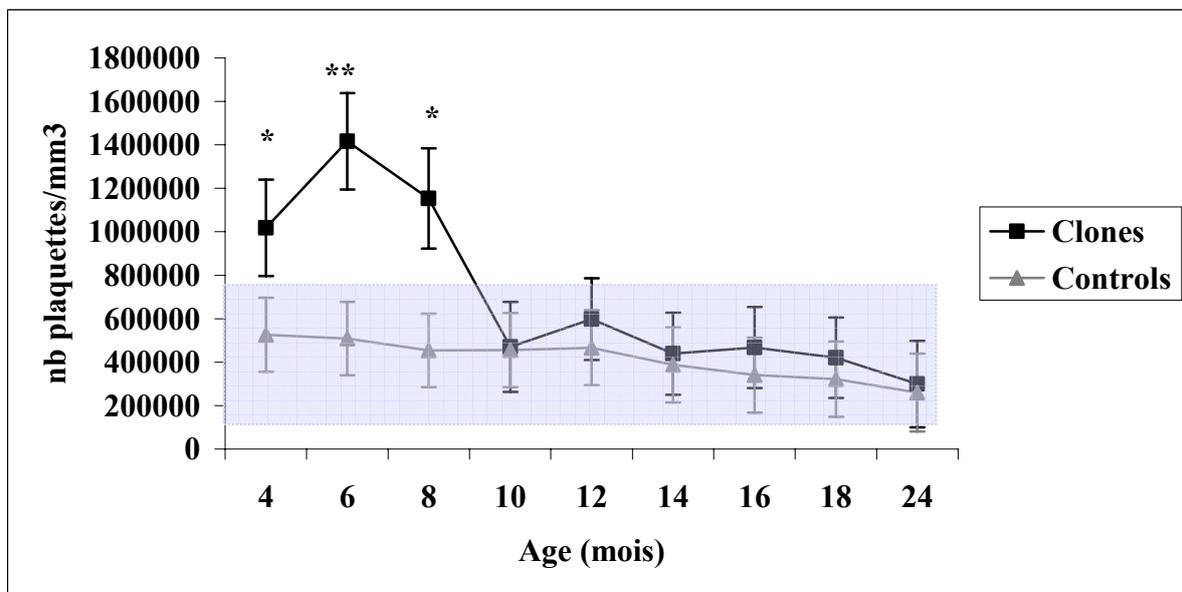
On observe des valeurs moyennes pour les clones et les témoins à partir de 10 mois. Par contre, à 4, 6 et 8 mois, les valeurs des clones sortent des normes (**Tableau XX et Figure 14**).

Il y a des différences statistiquement significatives entre clones et témoins à 4, 6 et 8 mois, les valeurs des clones étant très supérieures à celles des témoins.

Tableau XX : Numération moyenne des plaquettes et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Plaquettes des clones (/mm ³)	Plaquettes des témoins (/mm ³)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	1018068	525571	222243	170680
6	1416794	508722	221587	169098
8	1153349	453944	230868	169098
10	470220	455203	207772	170680
12	598285	466500	188329	172793
14	438818	387378	188678	172471
16	466663	340338	186496	172961
18	420133	321193	185237	173294
24	299218	259705	199490	179396

Figure 14 : Numération moyenne des plaquettes et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



2. Lignée blanche

a) Granulocytes neutrophiles

On observe des valeurs de neutrophiles dans les normes à la fois pour les clones et les témoins. Ces valeurs sont toutefois dans les normes supérieures (**Tableau XXI et Figure 15**).

Il existe une plus grande dispersion des valeurs chez les clones que chez les témoins.

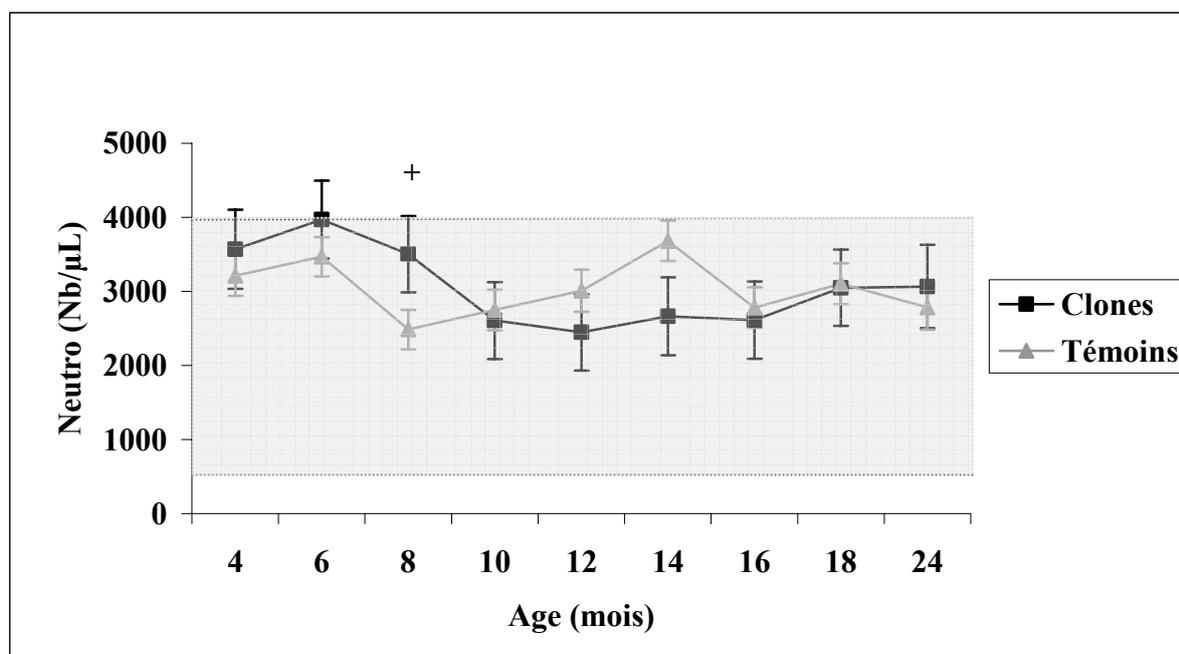
Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre clone et témoins, juste une tendance à 8 mois.

Globalement, il y a une interaction groupe par âge ($p=0,04$) mais qui est due à l'effet génotype ($p<0,001$).

Tableau XXI : Numération moyenne des neutrophiles et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Neutrophiles des clones (nb/ μ L)	Neutrophiles des témoins (nb/ μ L)	\pm Erreur Standard clones	\pm Erreur Standard témoins
4	3568,91	3212,90	532,89	272,24
6	3968,55	3468,54	525,37	264,37
8	3502,55	2486,15	515,08	264,37
10	2607,00	2749,10	519,14	273,21
12	2446,15	3007,84	515,08	285,02
14	2664,57	3682,60	525,43	273,98
16	2612,32	2781,10	520,3	273,99
18	3047,75	3103,72	515,08	274,00
24	3066,59	2785,79	563,44	302,17

Figure 15 : Numération moyenne des neutrophiles et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



b) Granulocytes éosinophiles

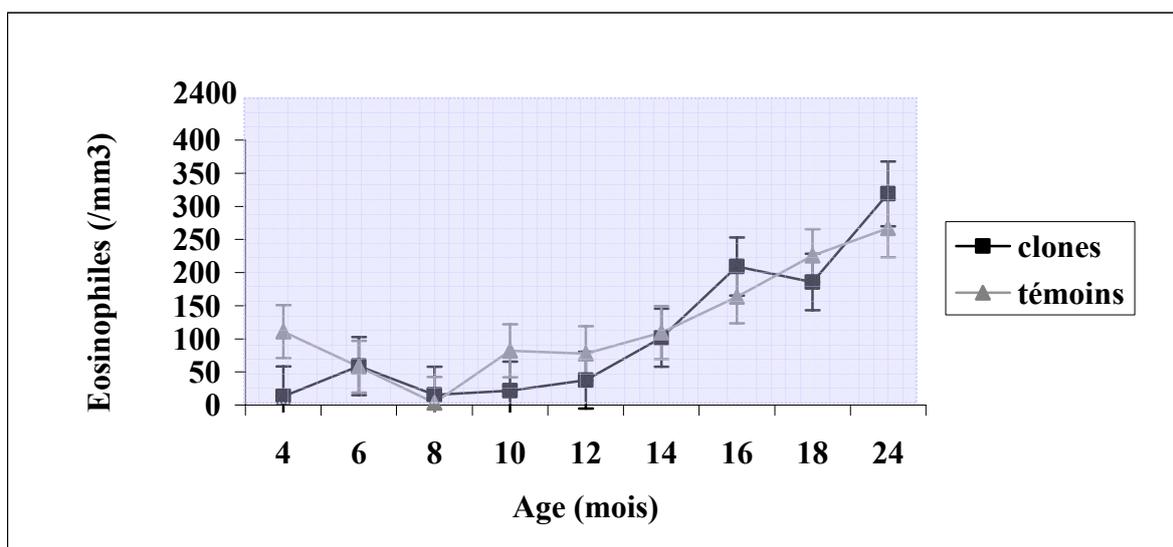
Les valeurs pour les clones et les témoins se situent dans les normes (**Tableau XXII et Figure 16**).

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre clones et témoins.

Tableau XXII : Numération moyenne des éosinophiles et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Eosinophiles des clones (/mm ³)	Eosinophiles des témoins (/mm ³)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	12,84	110,76	45,43	39,96
6	58,85	57,83	43,89	39,00
8	15,20	3,55	42,72	39,00
10	21,58	82,10	43,88	39,97
12	37,53	77,79	42,72	41,03
14	101,59	109,36	43,89	40,09
16	209,23	163,35	43,89	40,09
18	185,73	225,64	42,72	40,09
24	318,83	266,93	48,87	43,59

Figure 16 : Numération moyenne des éosinophiles et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



c) Basophiles

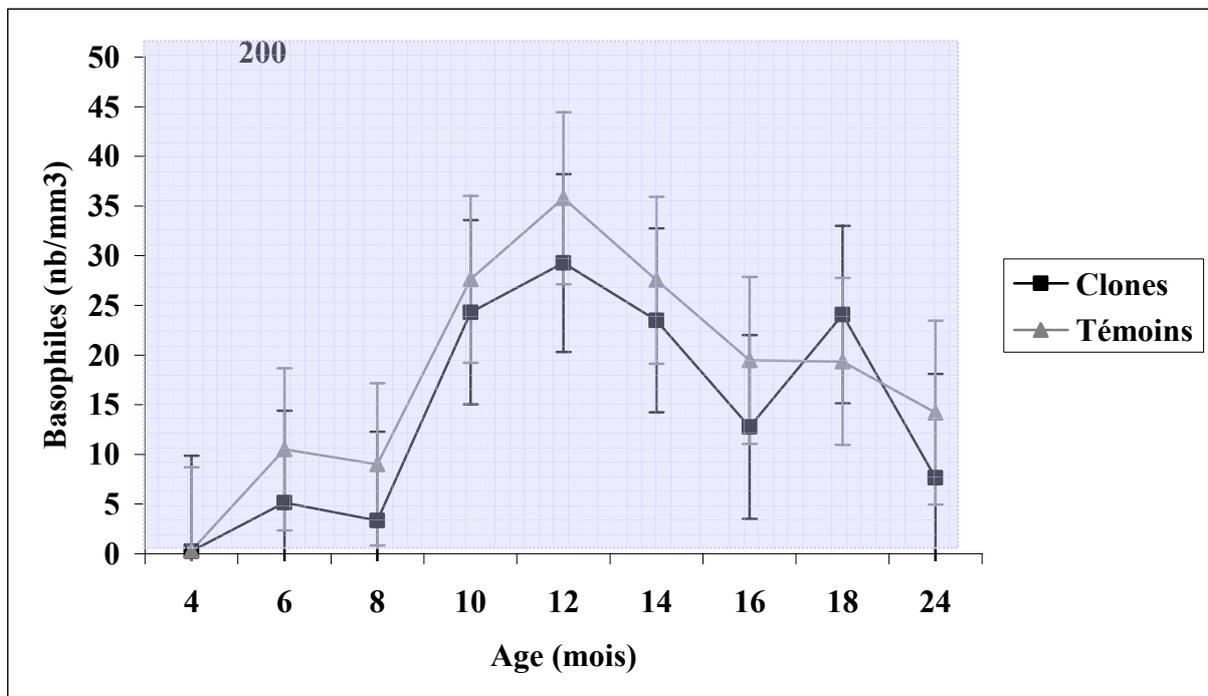
Les valeurs pour les clones et les témoins se situent dans les normes (**Tableau XXIII et Figure 17**).

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre clones et témoins.

Tableau XXIII : Numération moyenne des basophiles et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Basophiles des clones (/mm ³)	Basophiles des témoins (/mm ³)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	0,25	0,32	9,61	8,40
6	5,13	10,50	9,26	8,17
8	3,33	9,00	8,95	8,17
10	24,31	27,62	9,26	8,40
12	29,27	35,78	8,95	8,66
14	23,49	27,53	9,26	8,40
16	12,75	19,47	9,26	8,40
18	24,07	19,35	8,95	8,40
24	7,64	14,21	10,44	9,26

Figure 17 : Numération moyenne des basophiles et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



d) Monocytes

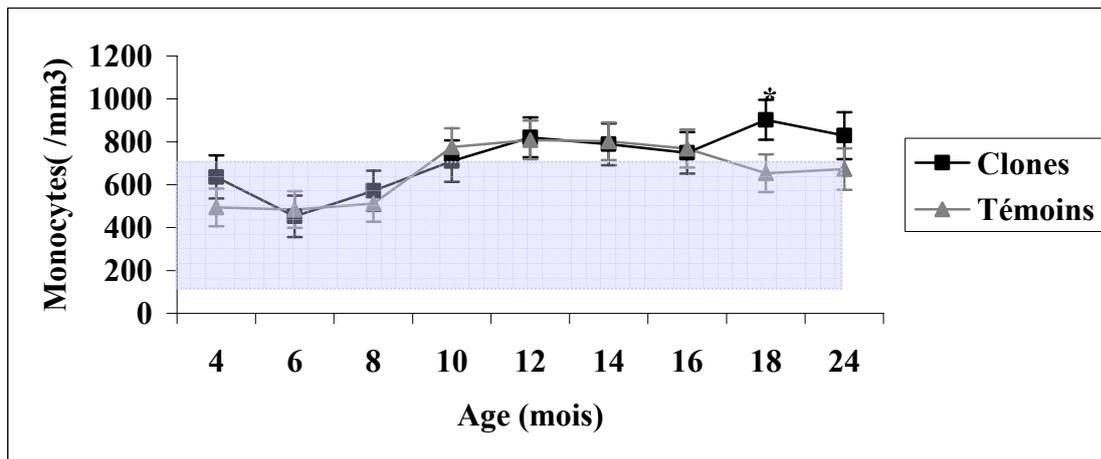
On observe des valeurs moyennes pour les clones et les témoins. La valeur pour les clones à 18 mois est légèrement au dessus de la normale (**Tableau XXIV et Figure 18**).

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre clones et témoins sauf à 18 mois où la valeur pour les clones est statistiquement supérieure à celle des témoins.

Tableau XXIV : Numération moyenne des monocytes et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Monocytes des clones (/mm ³)	Monocytes des témoins (/mm ³)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	636,38	494,47	100,46	87,92
6	452,88	484,44	96,811	85,49
8	571,67	512,33	93,65	85,49
10	710,06	775,09	96,81	87,92
12	821,07	809,00	93,65	90,57
14	788,37	802,2	96,81	87,97
16	749,21	768,89	96,81	87,97
18	902,87	653,06	93,65	87,97
24	828,82	672,59	109,07	96,77

Figure 18 : Numération moyenne des monocytes et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



e) Lymphocytes

On observe des valeurs moyennes de lymphocytes chez les clones comme chez les témoins (**Tableau XXV et Figure 19**).

On note une dispersion des valeurs plus marquée chez les clones que chez les témoins.

Il existe des différences significatives entre clones et témoins à 4 et 12 mois, où les valeurs des clones sont supérieures à celles des témoins, tout en restant dans les normes.

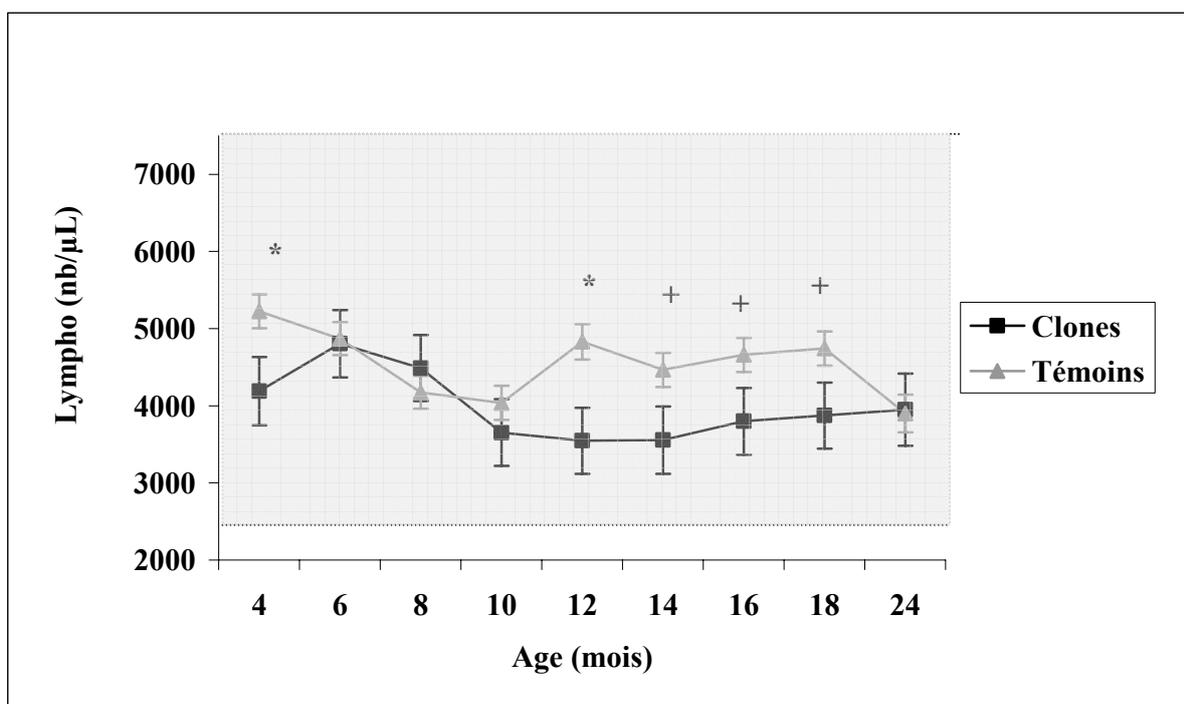
Notons une tendance à la différence entre clones et témoins à 14, 16 et 18 mois avec des valeurs pour les clones qui tendent à être supérieures à celles des témoins.

Il existe une interaction groupe par âge ($p=0,004$) mais qui est due à l'effet génotype ($p<0,001$).

Tableau XXV : Numération moyenne des lymphocytes et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Lymphocytes des clones	Lymphocytes des témoins	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	4187,45	5222,71	442,65	219,69
6	4805,46	4869,04	436,45	213,51
8	4488,2	4173,71	428,89	213,51
10	3652,65	4037,38	431,96	220,38
12	3546,94	4829,25	428,89	229,65
14	3554,82	4464,94	436,51	221,36
16	3798,77	4660,44	432,74	221,39
18	3873,87	4743,69	428,89	221,39
24	3950,11	3898,64	466,5	243,53

Figure 19 : Numération moyenne des lymphocytes et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



C. Biochimie

1. Urée

Les valeurs de l'urémie chez les clones et les témoins se situent bien en dessous des normes indiquées par SMITH *et al.*, 1996 (3,3-5 mmol/L) (**Tableau XXVI et Figure 20**).

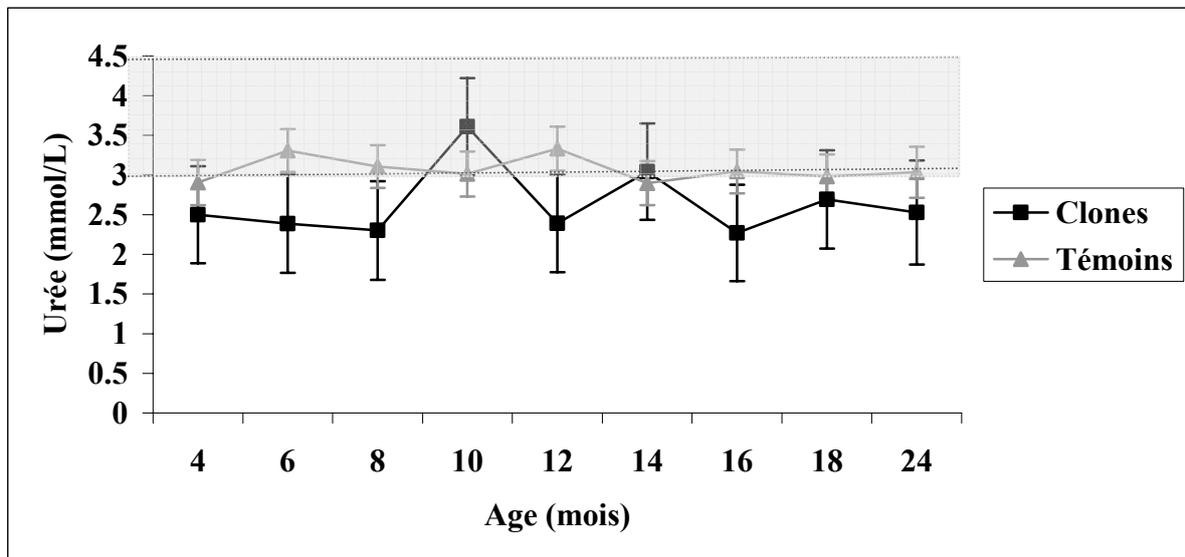
Il existe une plus grande dispersion des valeurs chez les clones que chez les témoins.

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre clones et témoins.

Tableau XXVI : Taux d'urée moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Urée des clones (mmol/L)	Urée des témoins (mmol/L)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	2,50	2,91	0,61	0,29
6	2,39	3,31	0,62	0,27
8	2,30	3,11	0,62	0,27
10	3,61	3,01	0,62	0,28
12	2,39	3,33	0,62	0,28
14	3,04	2,90	0,61	0,28
16	2,27	3,05	0,61	0,28
18	2,69	2,98	0,62	0,28
24	2,53	3,03	0,66	0,32

Figure 20 : Taux d'urée moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



2. Créatinine

Le taux de créatinine se situe bien dans les normes pour les clones et les témoins. Seules les valeurs des clones à 4 et 6 mois se situent légèrement en dessous des normes (**Tableau XXVII et Figure 21**).

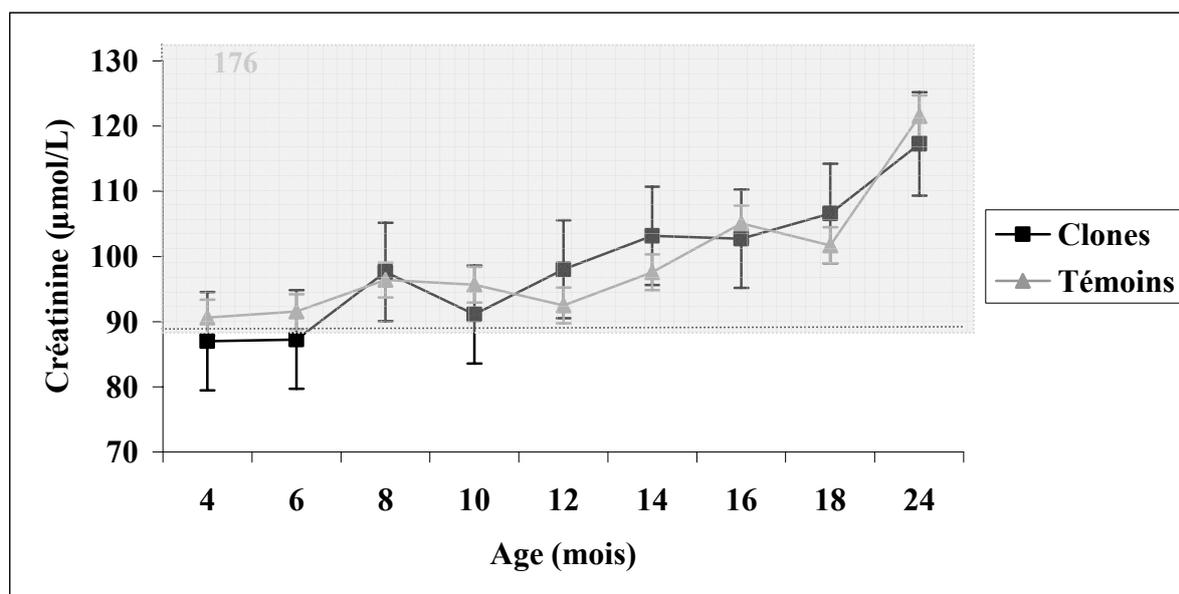
On remarque que le taux de créatinine augmente avec l'âge.

Il n'y a aucune différence statistiquement significative entre clones et témoins.

Tableau XXVII : Taux de créatinine moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Créatinine des clones ($\mu\text{mol/L}$)	Créatinine des témoins ($\mu\text{mol/L}$)	\pm Erreur Standard clones	\pm Erreur Standard témoins
4	86,99	90,60	7,56	2,77
6	87,26	91,54	7,56	2,67
8	97,62	96,40	7,56	2,67
10	91,09	95,66	7,53	2,74
12	98,03	92,48	7,53	2,75
14	103,16	97,57	7,53	2,76
16	102,72	105,05	7,53	2,76
18	106,60	101,70	7,64	2,76
24	117,26	121,53	7,94	3,17

Figure 21 : Taux de créatinine moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



3. β -hydroxybutyrate

Les taux de B-OH se situent dans les normes pour les clones et les témoins (**Tableau XXVII et Figure 22**).

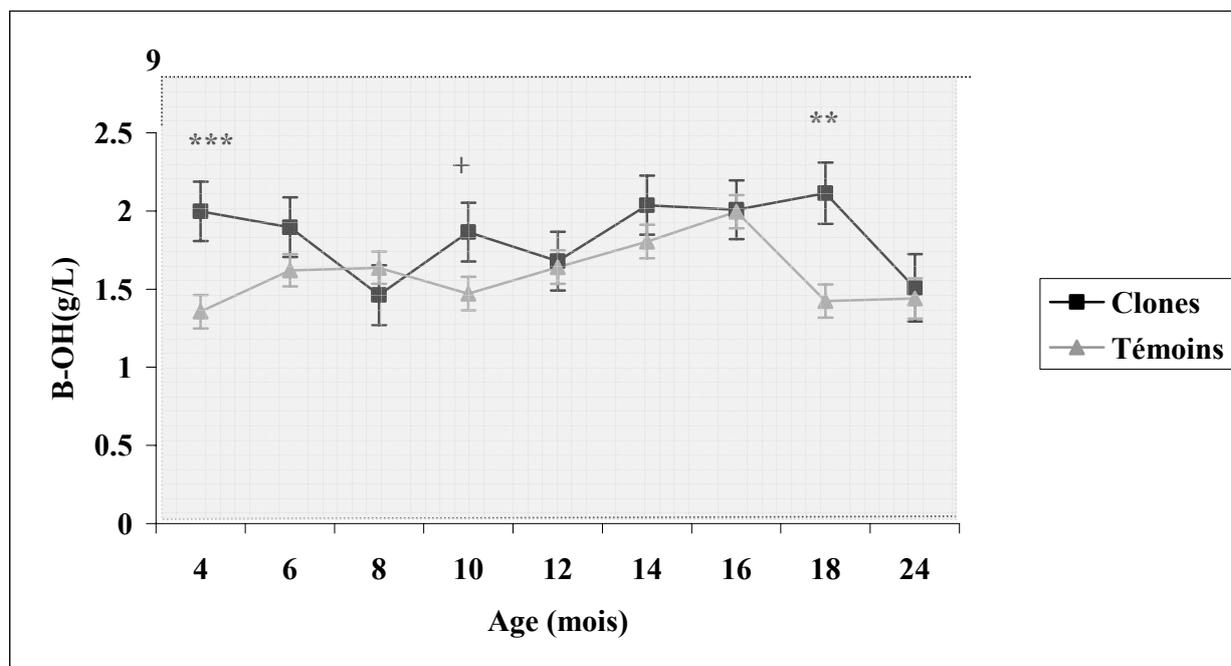
La dispersion des valeurs est plus marquée chez les clones.

A 4 mois et 18 mois, les taux des clones sont significativement plus élevés que pour les témoins. On note aussi une tendance dans ce sens à 10 mois. Aux autres âges, il n'y a pas de différence significative entre clones et témoins.

Tableau XXVIII : Taux de β -hydroxybutyrate moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	BOH des clones (g/L)	BOH des témoins (g/L)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	2,00	1,36	0,19	0,11
6	1,90	1,62	0,19	0,10
8	1,46	1,64	0,19	0,10
10	1,86	1,47	0,19	0,11
12	1,68	1,64	0,19	0,11
14	2,04	1,80	0,19	0,11
16	2,01	2,00	0,192	0,11
18	2,11	1,42	0,20	0,11
24	1,51	1,44	0,22	0,13

Figure 22 : Taux de β -hydroxybutyrate moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



4. Protéines totales

Les taux de protéines sont largement en dessous des normes pour les clones et les témoins (**Tableau XXIX et Figure 23**).

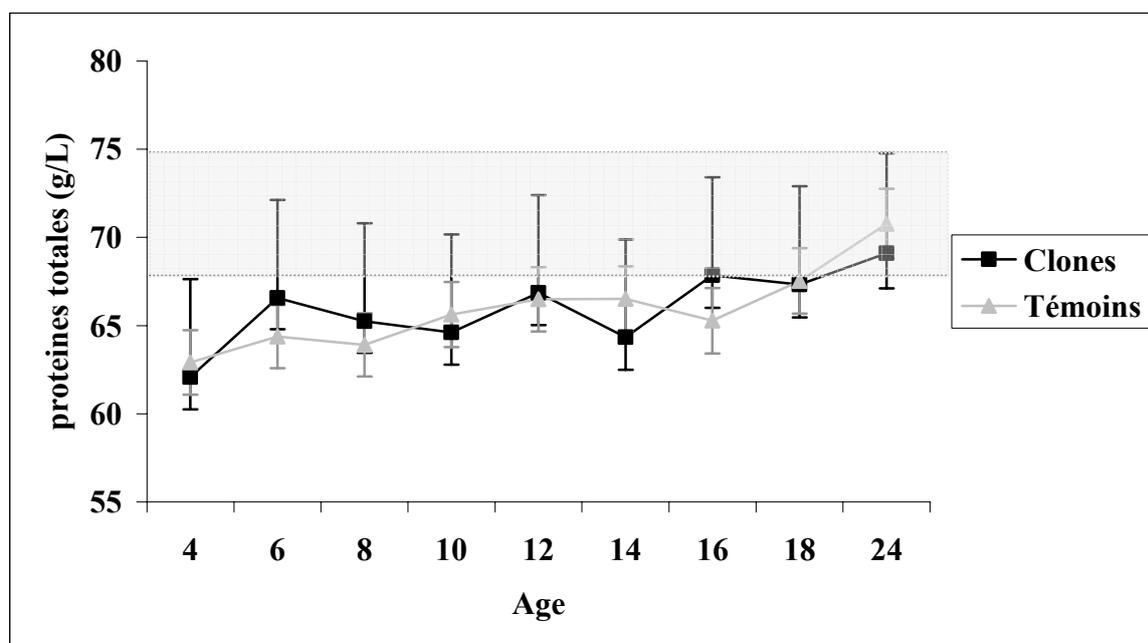
On observe une très grande dispersion des valeurs chez les clones par rapport aux témoins.

Il n'y a aucune différence significative entre clones et témoins.

Tableau XXIX : Taux de protéines totales moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Protéines des clones (g/L)	Protéines des témoins (g/L)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	62,08	62,91	5,57	1,83
6	66,57	64,38	5,55	1,79
8	65,24	63,91	5,55	1,79
10	64,62	65,63	5,55	1,84
12	66,86	66,49	5,55	1,82
14	64,34	66,51	5,55	1,85
16	67,86	65,28	5,55	1,85
18	67,32	67,53	5,60	1,85
24	69,11	70,77	5,67	2,00

Figure 23 : Taux de protéines totales moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



5. Albumine

Le taux d'albumine chez les témoins est largement au dessus des normes alors que chez les clones il est plutôt en dessous (à 8, 10, 12, 14 mois) (**Tableau XXX et Figure 24**).

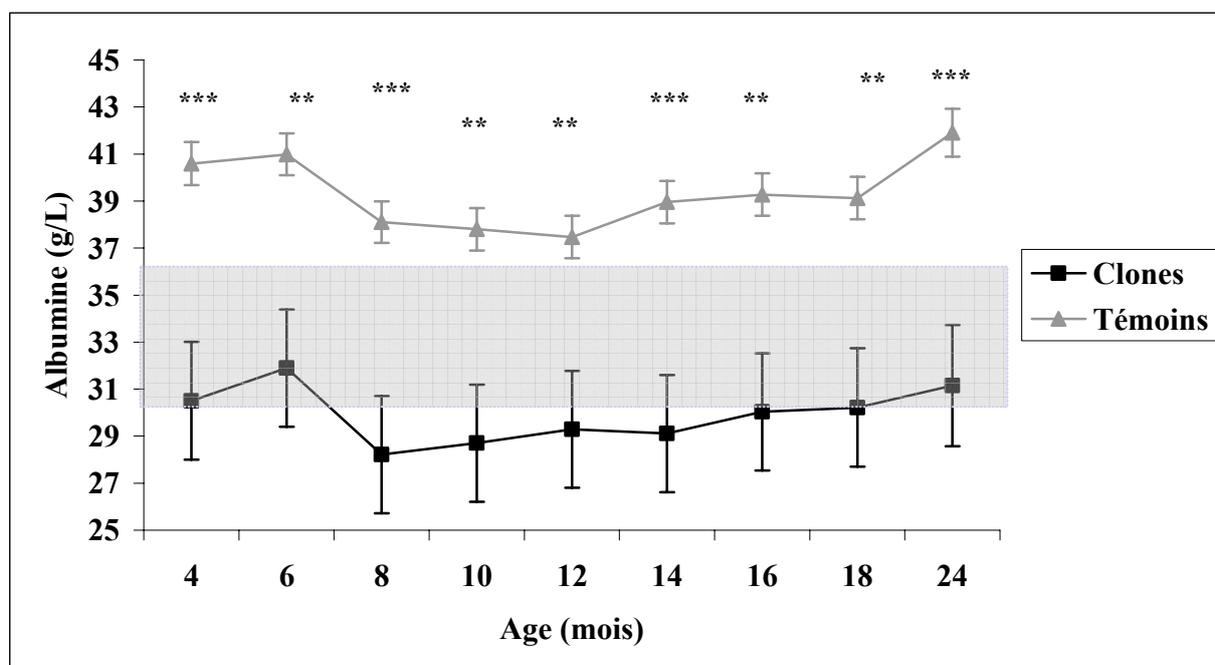
La dispersion des valeurs est importante chez les clones.

Il existe une grande différence statistiquement significative, entre les clones et les témoins.

Tableau XXX : Taux d'albumine moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Albumine des clones (g/L)	Albumine des témoins (g/L)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	30,50	40,59	2,50	0,91
6	31,89	40,99	2,49	0,88
8	28,21	38,10	2,49	0,88
10	28,70	37,80	2,49	0,90
12	29,29	37,47	2,49	0,90
14	29,11	38,95	2,49	0,90
16	30,03	39,28	2,49	0,90
18	30,22	39,13	2,52	0,90
24	31,15	41,91	2,58	1,02

Figure 24 : Taux d'albumine moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



6. GGT

Les valeurs des GGT chez les clones et les témoins se situent dans les normes sauf à 18 et 24 mois chez les clones dont les valeurs sont un peu basses (**Tableau XXXI et Figure 25**).

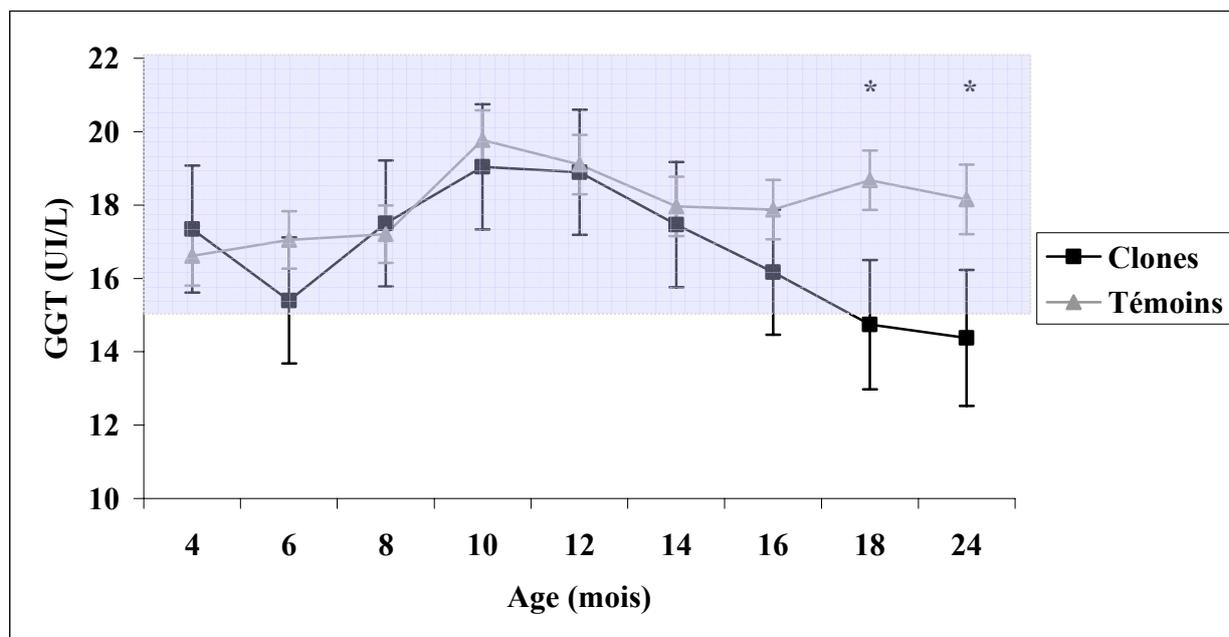
On observe une plus grande dispersion des valeurs chez les clones que chez les témoins.

A 18 et 24 mois, les valeurs des clones sont significativement plus basses que celles des témoins.

Tableau XXXI : Taux de GGT moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	GGT des clones (UI/L)	GGT des témoins (UI/L)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	17,34	16,62	1,73	0,81
6	15,40	17,05	1,72	0,78
8	17,50	17,21	1,72	0,78
10	19,04	19,78	1,71	0,81
12	18,89	19,11	1,71	0,81
14	17,47	17,96	1,71	0,81
16	16,17	17,88	1,71	0,81
18	14,74	18,68	1,76	0,81
24	14,38	18,15	1,85	0,95

Figure 25 : Taux de GGT et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



7. ASAT

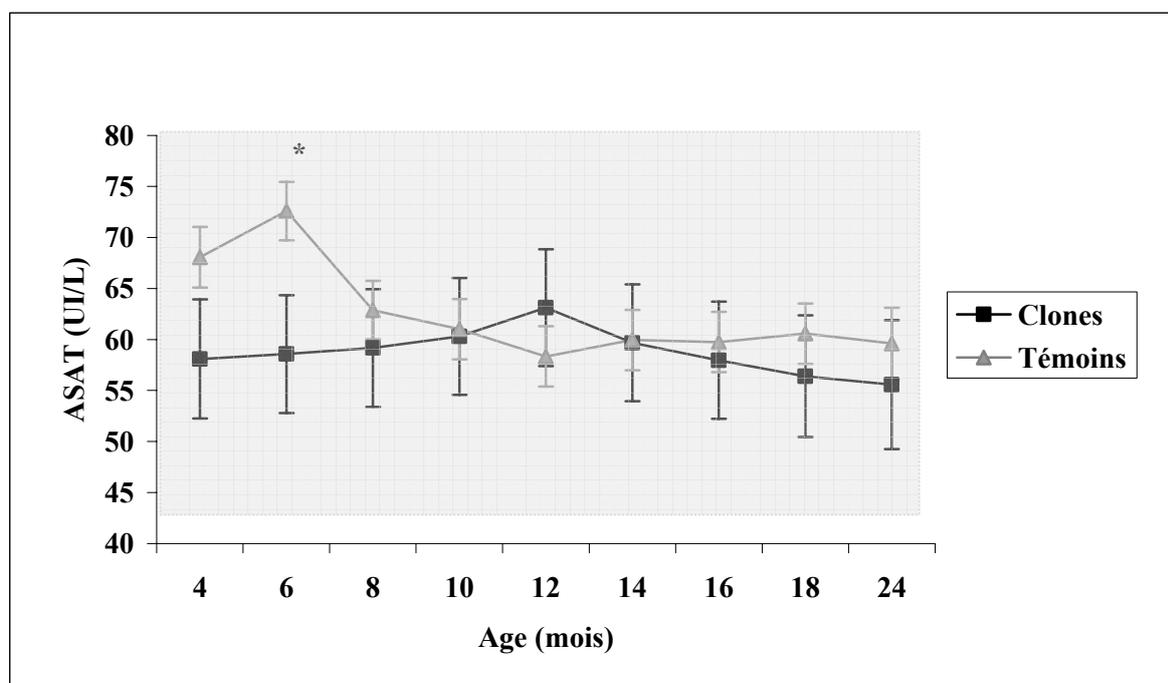
On observe des valeurs moyennes chez les clones et les témoins et une plus grande dispersion des valeurs chez les clones (**Tableau XXXII et Figure 26**).

Le taux d'ASAT à 6 mois est significativement plus élevé chez les témoins que chez les clones.

Tableau XXXII : Taux d'ASAT moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	ASAT des clones	ASAT des témoins	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	58,08	68,05	5,83	2,97
6	58,58	72,57	5,77	2,86
8	59,17	62,88	5,77	2,86
10	60,30	61,01	5,73	2,95
12	63,11	58,33	5,73	2,96
14	59,66	59,95	5,73	2,96
16	57,96	59,75	5,73	2,96
18	56,40	60,57	5,97	2,96
24	55,58	59,60	6,31	3,51

Figure 26 : Taux d'ASAT moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



8. Fibrinogène

Les valeurs du fibrinogène se situent dans les normes pour les clones et les témoins (**Tableau XXXIII et Figure 27**).

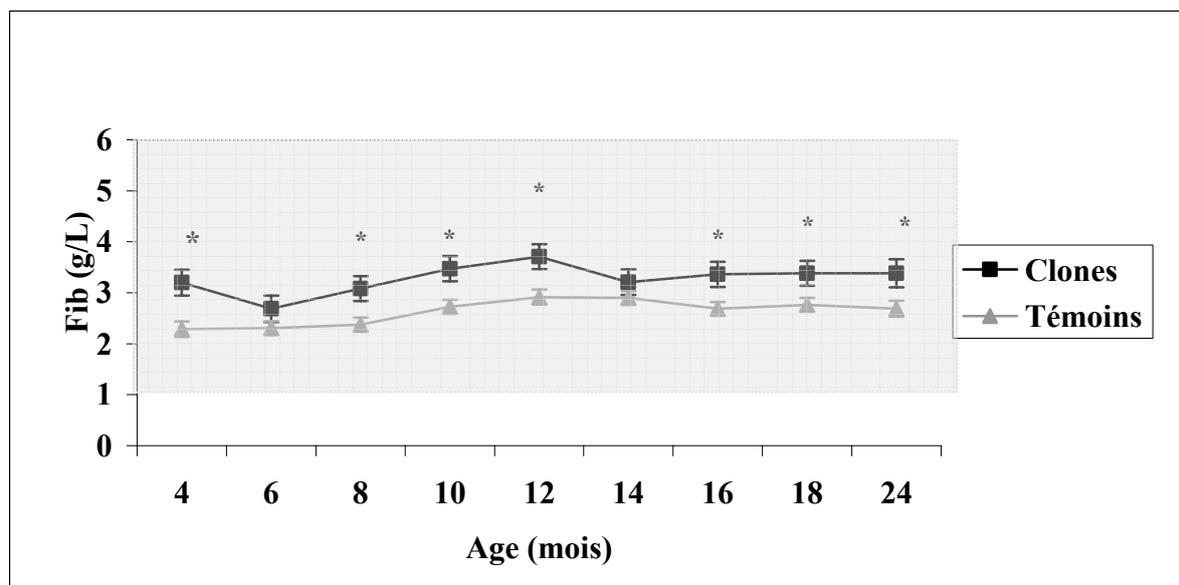
Il existe une différence statistiquement significative entre clones et témoins à tous les âges sauf à 6 et 14 mois : les clones ont des valeurs en fibrinogène supérieures au témoins à 4, 8, 10, 12, 16, 18 et 24 mois.

Globalement, il n'y a pas d'interaction groupe par âge ($p=0,51$).

Tableau XXXIII : Taux de fibrinogène moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge

Age (mois)	Fibrinogène des clones (g/L)	Fibrinogène des témoins (g/L)	± Erreur Standard clones	± Erreur Standard témoins
4	3,20	2,28	0,25	0,15
6	2,69	2,31	0,26	0,13
8	3,08	2,37	0,24	0,14
10	3,47	2,72	0,25	0,14
12	3,71	2,92	0,24	0,15
14	3,20	2,90	0,25	0,13
16	3,36	2,69	0,25	0,13
18	3,38	2,76	0,24	0,13
24	3,38	2,69	0,27	0,15

Figure 27 : Taux de fibrinogène moyen et erreur standard chez 15 clones et 18 témoins en fonction de l'âge



III. DISCUSSION

A. Choix des animaux

1. Témoins

Nous avons choisi des animaux issus d'insémination artificielle comme témoins. Or la technique de reproduction la plus proche du clonage somatique est la FIV, notamment en ce qui concerne les milieux de culture, la technique de fusion des membranes par stimulation électrique et le transfert de l'embryon dans des vaches porteuses synchronisées.

Cependant, le but de notre étude est de déterminer si les bovins clonés sont des animaux normaux qui pourraient un jour entrer dans la chaîne alimentaire. Il nous apparaissait plus indiqué d'utiliser comme animaux témoins, des animaux les plus normaux possibles, produits par la technique la plus fréquemment utilisée en élevage laitier, l'insémination artificielle.

2. Clones

Notre étude concernait au départ 21 clones issus de 4 génotypes différents (29, 5538, 2251 et 7711) et 20 témoins. Cependant les analyses statistiques n'ont pu être effectuées que sur 15 clones issus de 3 génotypes différents (29, 5538 et 2251) et 18 témoins, car pour certains animaux, un nombre trop important de données était manquant. En particulier, les clones issus du génotype 7711 étaient déjà âgés de 18 à 36 mois au début du protocole en Décembre 2002. De plus, on notera que nous avons beaucoup plus de représentants du génotype 5538 par rapport au génotype 29, qui n'en compte qu'un seul. La principale raison est que les tentatives

de clonage avec le génotype 29 n'ont donné que 4 naissances et seulement 3 veaux vivants : 309, présent dans notre étude, et 437 et 447 né après la fin du protocole. En effet, il existe des différences de rendement du clonage selon le génotype utilisé pouvant varier de 3 à 25% (HEYMANN *et al.*, 2005).

Afin d'éviter l'expression artificiellement exacerbée d'une caractéristique individuelle propre à un fond génétique donné, nous avons tenu compte dans nos analyses statistiques de l'effet génotype.

B. A propos des méthodes de mesure

1. Mesures cliniques

Les prises de température, de fréquence cardiaque et respiratoire n'ont pas toujours été faites par les mêmes personnes puisque 3 vétérinaires (J-P Mialot, D Remy et P Chavatte) et 3 étudiants (H Issenmann, A-C Brisville et nous-même) étaient chargés à tour de rôle de prendre ces mesures. De même, plusieurs stéthoscopes et thermomètres ont été utilisés.

2. Mesures effectuées sur les prélèvements de sang

Certaines mesures hématologiques aberrantes ont dû être éliminées. Elles concernaient des numérations globulaires et des plaquettes. En effet, chez certains animaux (surtout entre 4 et 8 mois), lorsque les globules rouges étaient de trop petite taille, l'automate n'était plus capable de faire la différence entre globules rouges et plaquettes et indiquait des valeurs aberrantes de plaquettes et de VGM. Pour ces animaux, seule l'hémoglobine a pu être prise en compte dans l'analyse de la lignée rouge et les autres paramètres ont été considérées comme données manquantes.

C. A propos des résultats

L'ensemble des résultats est caractérisé par une plus grande variabilité individuelle chez les clones qui présentent des écart types souvent beaucoup plus grands que ceux des témoins. Cette importante variabilité chez les clones a été retrouvée dans plusieurs autres études (ISSENMANN 2003, BRISVILLE 2006, CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002, 2004, LEE *et al.* 2004, HEYMAN *et al.* 2007). Cette variabilité peut s'expliquer par les différences de nature épigénétiques entre les individus clonés.

1. Clinique

Les résultats obtenus précédemment par CHAVATTE-PALMER *et al.* en 2002 et 2004 avaient montré que les veaux clonés présentaient des températures rectales significativement supérieures à celles des témoins du même âge, mais à des âges moins avancés, inférieurs à 2 mois. BRISVILLE en 2006 n'avait pas retrouvé cette différence. Nos résultats n'ont pas non plus révélé dans l'ensemble de différence significative entre clones et témoins après 4 mois, sauf à 8 mois où la température des clones était inférieure à celle des témoins. Elle reste cependant dans l'intervalle de normalité et nous ne pouvons pas expliquer cette différence.

La fréquence respiratoire des témoins à 6 mois était plus élevée que celle des clones. Nous n'avons pas non plus d'explication à cette différence.

2. Hématologie

Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre clones et témoins pour la numération globulaire, l'hématocrite, l'hémoglobine. Les valeurs étaient toutes dans les normes. Nos résultats sont conformes à ceux trouvés par CHAVATTE-PALMER *et al.*, (2002) qui ne trouvaient pas de différences significatives entre clones (n=21) et témoins(n=8) pour l'hématocrite et le taux d'hémoglobine, à ceux de LANZA *et al.* en 2001 et à ceux de WELLS *et al.* en 2003. GREEN *et al.* 2007, dans une étude comparant 11 taureaux Jersiais

clonés et 5 témoins à 6 mois, ont trouvé des valeurs significativement plus élevées chez les clones pour la numération globulaire, l'hématocrite et l'hémoglobine. De plus, chez ces clones, le poids moyen et la densité osseuse des fémurs étaient plus importants ce qui a amené l'équipe à suggérer que chez les clones, il y avait un problème de synthèse ou d'activité des ostéoclastes et peut être un problème de régulation de la différenciation des cellules dans la moelle osseuse lors de l'hématopoïèse.

Nous avons trouvé des différences significatives entre clones et témoins pour le CCMH et le TGMH aux mêmes âges (6, 8 et 10 mois) et pour les plaquettes à 4, 6 et 8 mois. Pour ces 3 paramètres, les valeurs des clones étaient beaucoup plus grandes que celles des témoins et hors normes. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par GREEN *et al.*, 2007 qui trouvaient un CCMH et des plaquettes plus petits chez les clones que chez les témoins, à 6 mois.

Nos résultats sont probablement à relier au problème d'analyse des globules rouges de petite taille dont nous avons parlé précédemment. En effet, on peut noter que ce problème n'a touché que les clones (animaux numéro 233, 234, 239, 244, 245, 247, 248 et 2259), (**annexe 5**). On pourrait se demander si les hématies des clones ne sont pas différentes de celles des témoins.

Une autre hypothèse pouvant expliquer l'augmentation du CCMH et du TGMH est un problème d'hémolyse car l'hémolyse *in vivo* ou *in vitro* augmente le CCMH. Il s'agirait plutôt ici d'hémolyse *in vitro* car aucun animal n'a présenté de symptôme faisant penser à une hémolyse *in vivo* (ictère, urines foncées...). Cependant, comment expliquer que seuls les tubes de sang des clones aient été hémolysés ? Cette hypothèse est discutable.

Cependant, en dehors de ces valeurs aberrantes entre 4 et 10 mois, on ne trouve plus de différence significative entre clones et témoins et les valeurs restent dans les normes.

Il ressort de notre étude que le VGM des clones à 4 mois est très légèrement en dessous des normes mais pas de manière significative. On notera que clones et témoins ont des valeurs basses de VGM qui augmentent avec l'âge : ces animaux ne présentent pas de signe de prématurité au niveau des paramètres sanguins comme l'avaient précédemment trouvé CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002) chez des animaux âgés de moins de 2 mois.

Le VGM des clones à 6 mois est supérieur à celui des témoins et l'on note une tendance à 8 mois. L'analyseur pourrait une nouvelle fois être rendu responsable. Enfin, à 24 mois, le VGM des clones redevient inférieur à celui des témoins. Plus d'investigations sont nécessaires. La mise en place systématique de lames permettrait une lecture *posteriori* en présence de différences significatives.

La quantité des lymphocytes chez les clones à 4 et 12 mois est significativement inférieure à celle des témoins du même âge, avec une tendance à 14, 16 et 18 mois. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux trouvés par CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002 et 2004) et ISSENMANN (2003) qui n'avaient pas trouvé de différence significative entre clones et témoins, sur des animaux cependant plus jeunes que dans cette étude. De même, WELLS *et al.* (2004), ne trouvent pas de différence significative entre clones et témoins. GREEN *et al.* (2007) trouvent une différence significative entre clones et témoins mais à l'inverse, les lymphocytes des clones étant plus élevés que ceux des témoins. Il est important de noter que dans l'étude de GREEN *et al.* (2007), il s'agit de mesures effectuées uniquement à 6 mois. De plus, la numération leucocytaire doit être interprétée avec précaution car elle est influencée par de nombreux facteurs tels que le stress, la température, les techniques d'élevage, l'injection de corticoïdes...

Nos résultats vont dans le sens de l'hypothèse de problèmes immunitaires des clones comme le suggérait la présence importante d'atrophies thymiques chez ces derniers (GARRY *et al.*, 1996, RENARD *et al.*, 1999, CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2004, HEYMAN *et al.*, 2007). Cependant, il n'y a pas de différence significative pour les granulocytes basophiles et éosinophiles et la seule différence significative pour les monocytes est à 18 mois avec des valeurs supérieures pour les clones. Or on sait que les monocytes ont un rôle de défense de l'organisme.

Nous rejoignons alors l'hypothèse de GREEN *et al.* (2007), selon laquelle, la régulation de l'hématopoïèse et par conséquent la production des diverses cellules hématopoïétiques serait perturbée chez les clones.

Une autre hypothèse allant dans ce sens est émise par HEYMAN *et al.* (2007) : ils soupçonnent la présence d'un défaut général de maturation des systèmes chez les clones, ce

qui expliquerait les différences observées selon l'âge des animaux. Elles s'estompent avec le temps et la limite généralement admise est d'environ 6 mois d'âge pour les bovins (CHAVATTE-PALMER, communication personnelle).

3. Biochimie

Dans notre étude, clones et témoins sont bien en dessous des normes indiquées par SMITH (1996) pour l'urée. Cependant, ces normes varient beaucoup d'un auteur à l'autre, ainsi, GREEN *et al.*, (2007) utilisent comme norme l'intervalle 2,7-12,3 mmol/L. En utilisant cet intervalle, nos animaux rentreraient dans les normes.

GREEN *et al.* (2007) ont décrit un problème de concentration des urines chez les clones. Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre clone et témoins pour l'urée et la créatinine indiquant un fonctionnement anormal des reins.

La fonction rénale est normale chez les clones de l'étude.

Le taux de BOH chez les clones est supérieur à celui des témoins à 4 et 18 mois, avec une tendance à 10 mois. WELLS *et al.* (2004) n'avaient pas trouvé de différence significative. Nos valeurs restent cependant dans les normes pour les clones et les témoins. L'origine du BOH est double : il peut provenir de la réduction de l'acétoacétate (AcAc) ou de la transformation du butyrate dans la paroi du rumen. Cette deuxième voie est reliée à l'alimentation et à la quantité de butyrate synthétisée par la flore microbienne du rumen. On peut donc poser deux hypothèses. Sachant que l'alimentation des clones et des témoins est identique, la première est que le métabolisme ruminal des clones est différent de celui des témoins. La deuxième hypothèse serait que la voie des corps cétoniques est plus importante chez les clones que chez les témoins.

Les protéines totales ont des valeurs très inférieures aux normes chez les clones comme chez les témoins sans qu'il y ait de différence significative entre clones et témoins. Ce faible taux de protéines totales a peut-être pour cause une carence dans l'apport de protéines dans la ration. Il serait intéressant de vérifier la ration sur la période d'étude.

Le taux d'albumine des témoins est très supérieur à celui des clones et complètement hors norme. Or, une valeur élevée d'albumine signe une surproduction par le foie liée souvent à un état de suralimentation, ce qui est complètement à l'opposé de l'hypothèse de carence en protéines émise précédemment comme interprétation des faibles valeurs des protéines totales ! De plus, clones et témoins ont reçu des rations identiques, et l'on observe que les clones ont plutôt des valeurs basses d'albumine ! Les valeurs basses de l'albumine reflètent un état de stéatose hépatique chronique, un excès de pertes digestives ou un problème de spoliation parasitaire. C'est peut être le cas des clones. C'est aussi ce qu'a noté GREEN (CHAVATTE-PALMER, communication personnelle). Notons cependant qu'en cas de spoliation parasitaire avec atteinte de l'intégrité des parois, les granulocytes éosinophiles augmentent, ce qui n'est pas notre cas.

Les GGT des témoins sont supérieurs à ceux des clones à 18 et 24 mois mais ils restent dans les normes. WELLS *et al.* (2004) n'avaient pas retrouvé cette différence. Nous n'avons pas d'explication pour expliquer cette différence.

Les ASAT des témoins sont supérieurs à ceux des clones à 6 mois mais ils restent dans les normes. WELLS *et al.* (2004) n'avaient pas retrouvé cette différence. Nous n'avons pas d'explication pour expliquer cette différence. Cependant, on peut remarquer que deux des trois paramètres précédents qui sont des paramètres permettant d'évaluer plus ou moins spécifiquement l'état de santé du foie montre chez les témoins une tendance à l'atteinte de l'intégrité hépatique alors que les clones semblent normaux.

Le taux de fibrinogène chez les clones est supérieur à celui des témoins à tous les âges étudiés sauf à 6 et 14 mois. Il reste cependant dans les normes. On ne peut pas donc dire qu'il y a plus de problèmes d'inflammation chez les clones. Ce résultat est en accord avec ce qu'avait trouvé ISSENMANN (2003) et CHAVATTE-PALMER (2004). WELLS *et al.* (2004) n'ont pas retrouvé ce résultat.

CONCLUSION

Nous avons étudié et comparé l'évolution des paramètres cliniques, hématologiques et biochimiques de 15 veaux produits par clonage somatique issus de 3 génotypes différents et de 18 veaux témoins contemporains issus d'insémination artificielle de l'âge de 4 mois à 2 ans. Notre travail s'intègre dans une étude beaucoup plus large menée par l'INRA, dont l'objectif est de déterminer si les bovins clonés sont des animaux normaux. Il s'agit également d'évaluer la qualité de ces clones afin d'envisager de permettre leur entrée ou celle de leurs produits dans la filière alimentaire. Il existe à l'heure actuelle un moratoire de l'INRA qui interdit l'introduction de clones ou de leurs produits dans la chaîne alimentaire. Jusqu'à ce jour, il n'y avait eu que peu d'études sur la santé des clones. L'originalité de notre étude repose sur le nombre important d'animaux (par rapport aux autres études) et sur le fait que c'est une étude prospective, qui compare des clones et des témoins contemporains, élevés dans les mêmes conditions. De plus, les paramètres sont évalués à différents âges au cours de la croissance des animaux.

Pour l'étude clinique, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre clones et témoins pour la température, la fréquence cardiaque et la fréquence respiratoire aux différents âges, sauf pour la température qui était inférieure chez les clones à 8 mois et la fréquence respiratoire des témoins à 6 mois, inférieure à celle des clones.

Nos résultats ont montré que les clones avaient des CCMH, des TGMH et des plaquettes significativement supérieures à ceux des témoins entre 4 et 10 mois. Ceci est probablement dû à un problème de l'analyseur pour compter certaines hématies des clones de trop petite taille.

La quantité des lymphocytes chez les clones à 4 et 12 mois était significativement inférieure à celle des témoins du même âge, avec une tendance à 14, 16 et 18 mois.

Cela va dans le sens de l'hypothèse de défaut général de maturation des systèmes chez les clones émise récemment.

Il n'y avait pas de différence significative entre clones et témoins pour tous les autres paramètres hématologiques étudiés.

Pour l'étude biochimique, nos résultats ont montré que la fonction rénale était normale chez les clones.

Par contre, les résultats des analyses des paramètres hépatiques nous amènent à suspecter un problème de stéatose hépatique chez les clones que l'on pourrait associer à l'augmentation de la production de BOH. Cependant, nous observons que ce sont les paramètres hépatiques des témoins (ASAT et GGT) qui sont plus élevés que ceux des clones. Enfin, le taux de fibrinogène était significativement plus élevé chez les clones mais toujours dans les normes donc il n'y avait pas de problèmes d'inflammation chez les clones de cette étude.

Pour la plupart des paramètres, les valeurs des clones se situent dans les normes malgré quelques différences d'avec les témoins.

On ne peut toutefois pas dire que clones et témoins soient identiques puisqu'il existe des différences significatives entre eux. De même, on ne peut pas dire que les clones soient tout à fait normaux puisque pour certains paramètres dont la mesure par l'analyseur est liée à la taille des hématies, (CCMH, TGMH, plaquettes) ils sortent des normes.

Par ailleurs, nous avons pu noter la présence d'une plus grande variabilité chez les individus clonés alors que l'on aurait pu s'attendre à une plus faible variabilité. Cette plus grande variabilité probablement due à des phénomènes épigénétiques entre individus clonés demande une étude approfondie.

Enfin, il reste à mener une étude comme la notre sur les descendants des clones afin de vérifier leur normalité.

Notons qu'à la vue des résultats des différentes études menées sur les clones, notamment sur la qualité de la viande et du lait, la FDA est sur le point d'approuver les clones dans la chaîne alimentaire.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS R, GARRY FB, ALDRIDGE BM, HOLLAND MD, ODDE KG. (1992) Hematologic values in newborn beef calves. *American Journal of Veterinary Research*, **53**, 944-950.

ALEXANDER B, PERRAULT S, PEURA T, BETTS DH, KING WA. (2004) Assessment of telomere length in nuclear transfer derived sheep clones, their offspring and control animals. *Reprod. Fertil. Dev.*, 134.

ALLEN WR, CARTER AM, CHAVATTE-PALMER P, DANTZER V, ENDERS AC, FREYER C, et al. (2003) Comparative placentation. Workshop report. *Placenta*, **24**, 100-103.

AUBADIE M. (2003) Biochimie sanguine de la vache laitière. *Point Vét.*, (Examens paracliniques chez les bovins), **34**, 36-40.

BERTHELOT V, BAS P, HEYMAN Y, CHAVATTE-PALMER P. (2004) Comparaison de la composition en acides gras du muscle et du lait de vaches Holstein issues de clonage somatique et d'animaux issus d'insémination artificielle. *Renc. Rech. Rum.*, **11**, 394.

BEZILLE P. (1993) Numération et formule leucocytaire chez les bovins. *Point Vét.*, **25**, 285-287.

BRISVILLE AC. (2006) Les marqueurs du stress chez les bovins issus de clonage somatique. *Thèse Méd. Vét., Alfort n°92*, 121p.

BROPHY B, SMOLENSKI G, WHEELER T, WELLS D, L'HUILLIER P, LAIBLE G. (2003) Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta casein and kappa casein. *Nature Biotechnology*, **21**, 138-139.

CAMPBELL KHS, MC WHIR J, RITCHIE WA, WILMUT I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, **380**, 64-66.

CHASTANT S, RENARD JP. (1998) Clonage des animaux domestiques : comment, pourquoi ? *Bull. Acad. Vét. de France*, **70**, 153-159.

CHASTANT S, CAMPION E, RENARD JP. (2000) Clonage et reprogrammation du noyau dans l'embryon préimplantatoire. In : *Clonage animal, Clonage humain, Journée Thématique SFEF / INSERM*. Paris, 19 Mai 2000. Paris : Carré des Sciences, 3-14.

CHAVATTE-PALMER P, HEYMAN Y, RENARD JP. (2000) Clonage et physiopathologies de la gestation associées. *Gynecol. Obstét. Fertil.*, **28**, 633-642.

CHAVATTE-PALMER P, HEYMAN Y, RICHARD C, MONGET P, LE BOURHIS D, KANN G *et al.* (2002) Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol. Reprod.*, **66**, 1596-1603.

CHAVATTE-PALMER P, REMY D, CORDONNIER N, RICHARD C, ISSENMAN H, LAIGRE P *et al.* (2004)^a Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning and Stem Cells*, **6**, 94-100.

CHAVATTE-PALMER P, VIGNON X, HEYMAN Y, RICHARD C, REMY D, MIALOT JP *et al.* (2004)^b Clonage somatique chez les bovins : situation actuelle et premier bilan. *Rencontre Recherche Ruminants*, **11**, 355-360.

CHAVATTE-PALMER P, DE SOUSA N, LAIGRE P, CAMOUS S, PONTER AA, BECKERS JF *et al.* (2006) Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology*. En cours de publication.

CIBELLI JB, STICE SL, GOLUEKE PJ, KANE JJ, JERRY J, BLACKWELL C, *et al.* (1998) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, **280**, 1256-1258.

COLLEAU JJ. (1993) Les biotechnologies de l'embryon bovin : application à la sélection, réalité et enjeux économiques. *Cahiers Agriculture*, **2**, 93-102.

COLLEAU JJ, HEYMAN Y, RENARD JP. (1998) Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *INRA Prod. Anim.*, **11**, 41-56.

CONSTANT F, GUILLOMOT M, HEYMAN Y, VIGNON X, LAIGRE P, SERVELY JL et al. (2006) Large Offspring or Large Placenta Syndrome ? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydroallantois. *Biology of Reproduction*, **75**, 122-130.

CRESPEAU F. (2001) *Techniques hématologiques courantes*. Polycopié. Ecole nationale Vétérinaire d'Alfort. Unité Pédagogique d'Histologie-Anatomie Pathologique. 48p.

DE SOUSA PA, KING T, HARKNESS L, YOUNG LE, WALKER SK, WILMUT I. (2000) Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol. Reprod.*, **65**, 23-30.

ECHTERNKAMP SE et GREGORY KE. (2002) Reproductive, growth, feedlot, and carcass traits of twin vs single births in cattle. *J. Anim. Sci.*, **80**, E64-E73. disponible sur : www.asas.org/jas/symposia/esupp2/jas2051.pdf.

ECTORS FJ, DELVAL A, BECKERS JF, DRION PV, REMY B, ECTORS F. (1997) Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine. *Ann. Méd.Vét.*, **141**, 239-244.

ENRIGHT BP, TANEJA M, SCHREIBER D, RIESEN J, TIAN XC, FORTUNE JE et al. (2002) Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, **66**, 291-296.

FABER DC, FERRE LB, METZGER JM, ROBL JM et KASINATHAN P. (2004) Agro-Economic impact of cattle cloning. *Cloning and Stem Cells*, **6**, 198-207.

FONTAINE JJ. (1996) *Histologie générale du système hémato-lympho-poiétique*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique d'Histologie-Anatomie Pathologique.

FORSBERG EJ, STRELCHENKO NS, AUGENSTEIN ML, BETTHAUSER JM, CHILDS LA, EILERTSEN KJ et al. (2002) Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biol.Reprod.*, **67**, 327-333.

FRANCOZ D, DERY A, LANEVSCHI A. Les examens hématologiques en pratique bovine. *Point Vét.*, **34** (Examens paracliniques chez les bovins), 42-48.

FRERET S. (2000) Transfert nucléaire dans l'espèce bovine : culture, caractérisation et synchronisation des cellules somatiques utilisées comme source de noyaux. *Thèse Med. Vet. Alfort*, n° 76, 119p.

GARRY FB, ADAMS R, MC CANN JP, ODDE KG. (1996) Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*, **45**, 141-152.

GARRY F, ADAMS R, HOLLAND MD, HAY WW, MC CANN JP, WAGNER A et al. (1998) Arterial oxygen, metabolite and energy regulatory hormone concentrations in cloned bovine fetuses. *Theriogenology*, **49**, 321.

GAULON P. (2003) Clonage par transfert nucléaire chez les bovins : technique, résultats actuels et perspectives. *Thèse Méd. Vét.*, Alfort, n° , 192p.

GOVONI KE, TIAN C, KAZMER GW, TANEJA M, ENRIGHT BP, RIVARD AL, et al. (2002) Age-related changes of the somatotrophic axis in cloned holstein calves. *Biol. Reprod.*, **66**, 1293-1298.

GREEN MP, BERG MC, LEE RSF (2007) Anatomical deviations in apparently healthy, weaned, cloned calves. *Reprod. Fertil. Dev.*, **19**, 37 (abstract).

HEYMAN Y, CHESNE P, LE BOURHIS D. (1996) Clonage et sexage embryonnaire : recherche et perspectives d'application chez les bovins. *Point Vét.* (Reproduction des ruminants) **28**, 873-880.

HEYMAN Y, CHAVATTE-PALMER P, LE BOURHIS D, CAMOUS S, VIGNON X, RENARD JP. (2002) Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol. Reprod.*, **66**, 6-13.

HEYMAN Y, CHAVATTE-PALMER P, VIGNON X, RICHARD C, RENARD J-P. (2005) Le clonage somatique : un état des lieux chez les bovins et les petits ruminants. *INRA Prod. Anim.*, **18**, 339-354.

HEYMAN Y, CHAVATTE-PALMER P, FROMENTIN G, BERTHELOT V, JURIE C, BAS P et al. (2006) Quality and safety of bovine clones and their products. *Animal*, sous presse.

HEYMAN Y, CHAVATTE-PALMER P, BERTHELOT V, FROMENTIN G, HOCQUETTE JF, MARTIGNAT L et al. (2007) Assessing the quality of products from cloned cattle : an integrative approach. *Theriogenology*, **67**, 134-141.

HIENDLEDER S, BEBBERE D, ZAKHARTCHENKO V, REICHENBACH HD, WENIGERKIND H, LEDDA S et al. (2004)^a Maternal-fetal transplacental leakage of mitochondrial DNA in bovine nuclear transfer pregnancies : potential implications for offspring and recipients. *Cloning and Stem Cells*, **6**, 150-156.

HIENDLEDER S, MUND C, REICHENBACH H-D, WENIGERKIND H, BREM G, ZAKHARTCHENKO V, et al. (2004)^b Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by *in vitro* techniques. *Biol. Reprod.*, **71**, 217-223.

HIENDLEDER S, REICHENBACH HD, WENIGERKIND H, BEBBERE D, BREM G, ZAKHARTCHENKO V, et al. (2004)^c Maternal origin of ovocytes affects in utero developmental capacity and phenotype of bovine nuclear transfer fetuses. *Reprod. Fertil. Dev*, **16**, 142.

HILL JR, ROUSSEL AJ, CIBELLI JB, EDWARDS JF, HOOPER NL, MILLER MW et al. (1999) Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 cases study). *Theriogenology*, **51**, 1451-1465.

HILL JR, LONG CR, LOONEY CR, WINGER QA, SPENCER TE, BAZER FW et al. (2000) Placental abnormalities in first trimester somatic cell cloned fetuses. *Theriogenology*, **53**, 218.

HILL JR, SCHLAFER DH, PATRICIA JF, DAVIES CJ. (2002) Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biol. Reprod.*, **67**, 55-63.

ISSENMANN H. (2003) Etude hématologique, biochimique et clinique comparative de veaux issus de clonage somatique et de veaux témoins. *Thèse Méd. Vét., Alfort n°141* , 100p.

JAIN NC. (1993) *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia : Lea Febiger, 417p.

JEAN-BLAIN C. (1995) Adaptation ou défaillance hépatique au cours du cycle de reproduction chez les ruminants. *Point Vét.*, **27** (numéro spécial) 689-696.

JUILLIEN C. (2003) Intérêt diagnostique et pronostique de l'échographie foetale chez les bovins clonés. *Thèse Méd. Vét., Alfort n°* , 192p.

JONGH O. (1993) Les variations quantitatives de la population leucocytaire sanguine. *Le Point Vétérinaire*, **25**(154), 277-284.

JURIE C, PICARD B, HEYMAN Y, CHAVATTE-PALMER P et HOCQUETTE J-F. (2006) Caractéristiques contractiles et métaboliques du muscle de génisses Holstein issues de clonage somatique, comparaison avec des animaux témoins issus d'insémination artificielle. *Rencontres recherches Ruminants 2006. En cours de publication.*

KAUFMANN W et HAGEMEISTER H. (1987) Composition of milk. *Dairy Cattle Production*. H.O. gravert, ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 107-172.

KATO Y, TANI T, SOTOMARU Y, KUROKAWA K, KATO JY, DOGUCHI H *et al.* (1998) Eight calves cloned from somatic cells of single adult. *Science*, **282**, 2095-2098.

KATO Y, TANI T, TSUNODA Y. (2000) Cloning of calves from various somatic cell types of ale and female ault, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil.*, **120**, 231-237.

KRAMER JW. (2000) Normal hematology of cattle, sheep and goats. *In : Schalm's Veterinary Hematology*, Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds. 5th ed. Philadelphia, PA : Lippincott Wiliams and Wilkins, 1075-1084.

KRUIP TAM, DEN DAAS JHG. (1997) In vitro produced and cloned embryos : effects on pregnancy, parurition and offspring. *Theriogenology*, **278**, 2130-2133.

KUBOTA C, YAMAKUCHI H, TODOROKI J, MIZOSHITA K, TABARA N, BARBER M *et al.* (2000) Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 990-995.

LAMBOY O. (1997) L'industrie de la biotechnologie mise sur le clonage et la transgénèse. *La Dépêche vétérinaire*, **527**, 10.

LANZA RP, CIBELLI JB, BLACKWELL C, CRISTOFALO VJ, FRANCIS MK, BAERLOCHER GM *et al.* (2000) Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, **288**, 665-669.

LANZA RP, CIBELLI JB, FABER D, SWEENEY RW, HENDERSON B, NEVALA W et al. (2001) Cloned cattle can be healthy and normal. *Science-Washington*, **294**, 1893-1894.

LE BOURHIS D, VIGNON X, CHESNE P, HEYMAN Y, RENARD JP. (1998) Clonage somatique chez les bovins : premiers résultats. *Elevage et insémination*, **287**, 3-9.

LEE RSF, PETERSON AJ, DONNISON MJ, RAVELICH S, LEDGARD AM, LI N, et al. (2004) Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. *Biol. Reprod.*, **70**, 1-11.

LITTEL RC, HENRY PR, AMMERMAN CB. (1998) Statistical Analysis of repeated measures using SAS procedures. *Journal of Animal Science*, **76**, 1216-1231.

Mc SHERRY BJ, HORNEY FD, DE GROOT JJ. (1970) Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **34**, 191-197.

MIYASHITA N, SHIGA K, YONAI M, KANEYAMA K, KOBAYASHI S, KOJIMA T, et al. (2002) Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol. Reprod.*, **66**, 1649-1655.

MAURICE-ESTEPA L., VASSAULT A. (2003) (mise à jour le 05/01/03). Protéines. In : *Biologie clinique hospitalière* [en ligne]. Paris (Fr) : Assistance Publique Hopitaux de Paris [<http://bioch.ap-hop-paris.fr/analyses/Bioforma/PROTEIN.htm>] (consultée le 17 Janvier 2007).

NORMAN HD, WALSH MK. (2004) Performance of dairy cattle clones and evaluation of their milk composition. *Cloning and Stem Cells*, **6**, 157-163.

NUMABE T, OIKAWA T, KIKUCHI T, HORIUCHI. (2000) Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, **64**, 13-20.

OUEDRAOGO A. (2004) Public perceptions of reproductive biotechnologies : the case of farm animal breeding and reproduction in France and the United Kingdom. *Cloning and Stem Cells*. **6**, 182-189.

PACE MM, AUGENSTEIN ML, BETTHAUSER JM, CHILDS LA, EILERTSEN KJ, ENOS JM, et al. (2002) Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol. Reprod.*, **67**, 334-339.

PICARD B, JURIE C, LAIGRE P, HEYMAN Y, VIGNON X, CASSAR-MALEK I et al. (2006) Etude du développement musculaire chez les foetus bovins issus de clonage somatique. *Journées d'animation scientifique, département PHASE, INRA, septembre 2006*.

PRATHER RS, BARNES F, SIMMS MM et al. (1987) Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, **37**, 859-866.

PRATHER RS. (1990) Nuclear transplantation as a method for cloning embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **195**, 7-12.

RENARD JP, CHASTANT S, CHESNE P, RICHARD, MARCHAL J, CORDONNIER N et al. (1999)^a Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *The Lancet*, **353**, 1489-1491.

RENARD JP, LEGOUY E, CHASTANT S, HEYMAN Y, VIGNON X. (1999)^b Cloning : present and perspectives. *Contracept. Fertil. Sex.*, **27**, 405-411.

RHIND MS, HARKNESS LM, BELLAMY C, WALLACE W, DESOUSA P et al. (2003) Cloned lambs – lessons from pathology. *Nature biotech.*, **21**, 744-745.

RICHARD C, VIGNON X, LE BOURHIS D, RENARD JP, HEYMAN Y. (2006) Puberty and fertility of somatic cloned heifers compared to controled AI females. *In : 22nd Annual Scientific Meeting of AETE*. Zug (Suisse), 8-9 septembre 2006, abstr.

ROBINSON J.S., KINGDTONE E.J., JONES C.T., et THORBURN G.D. (1979) Studies on experimental growth retardation in sheep : the effect of removal of endometrial caruncles on fetal size and metabolism. *J. Dev. Physiol.*, **1**, 379-398.

ROBL JM, STICE SL. (1989) Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. *Theriogenology*, **31**, 75-84.

SANTOS F, DEAN W. (2004) Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*, **127**, 643-651.

SHIELS PG, KIND AJ, CAMPBELL KHS, WADDINGTON D, WILMUT I, COLMAN A et al. (1999) Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*, 399, 316-317.

SHIGA K, UMEKI H, SHIMURA H, FUJITA T, WATANABE S, NAGAI T. (2005) Growth and fertility of bulls cloned from the somatic cells of an aged and infertile bull. *Theriogenology*, **64**, 334-343.

SINCLAIR KD, MAXFIELD EK, ROBINSON JJ, MALTIN CA, McEVOY TG, DUNNE LD et al. (1997) Culture of sheep zygotes can alter fetal growth and development. *Theriogenology*, 47, 380 (abstr).

SINCLAIR KD, DUNNE LD, MAXFIELD EK, MALTIN CA, YOUNG LE, WILMUT I et al. (1998) Fetal growth and development following temporary exposure of Day 3 ovine embryos to an advanced uterine environment. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10, 263-269.

SMITH BP. (1996) *Large Animal Internal Medicine*. 2nd ed. Saint-Louis : Mosby-Year Book, 2040p.

SMITH LC, BORDIGNON V, GARCIA JM, MEIRELLES FV. (2000) Mitochondrial genotype segregation and effects during mammalian development: applications to biotechnology. *Theriogenology*, **53**, 35-46.

SMITH LC, MURPHY BD. (2004) Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals. *Cloning and Stem Cells*, **6**, 126-132.

STICE SL, ROBL JM, PONCE DE LEON FA, JERRY J, GOLUEKE PG, CIBELLI JB et al. (1998) Cloning : new breakthrough leading to commercial opportunities. *Theriogenology*, **49**, 129-138.

SUTTON RH, HOBMAN B. (1975) The value of plasma fibrinogen estimations in cattle : a comparison with total leukocyte and neutrophil counts. *New Zealand Veterinary Journal*, **23**, 21-27.

TAKAHASHI S, ITO Y. (2004) Evaluation of meat products from cloned cattle : biological and biochemical properties. *Cloning and Stem Cells*, **6**, 165-171.

TENNANT B, HARROLD D, REINA-GUERRA M, KENDRICK JW, LABEN RC. (1974) Hematology of the neonatal calf : erythrocyte and leukocyte values of normal calves. *Cornell Veterinarian*, **64**, 516-532.

TENNANT B, HARROLD D, REINA-GUERRA M, KANEKO JJ. (1975). Hematology of the neonatal calf : frequency of congenital iron deficiency anemia. *Cornell Veterinarian*, **65**, 543-556.

THRALL MA. (2004) *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Williams and Wilkins, Philadelphia.

TIAN XC, XU J, YANG X. (2000) Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nature genetics*, **26**, 272-273.

TIAN XC, KUBOTA C, SAKASHITA K, IZAIKE Y, OKANO R, TABARA N et al. (2005) Meat and milk composition of bovine clones. *PNAS*, **102**, 6261-6266.

TOME D, DUBARRY M, FROMENTIN G. (2004) Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning and Stem Cells*, **6**, 172-177.

TREMBLAY A. (2000) Profil métabolique en production animale et interprétation des données. 19 Octobre 2000. *Formation continue faculté de médecine vétérinaire – Université de Montréal*.

VAN WAGTENDONK DE LEEUW AM, MULLAART E, DE ROOS APW, MERTON JS, DEN DAAS JHG, KEMP B et al. (2000) Effects of different reproduction techniques : AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, **53**, 575-597.

VERRIELE M, BEDOUET J. (1999) Les examens sanguins chez les bovins : I- Des clés pour utiliser la biochimie clinique. *Point Vét.*, **30**, 545-549.

VIGNON X, CHESNE P, LE BOURHIS D, FLECHON JE, HEYMAN Y, RENARD JP. (1998)^a Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C.R. Acad.Sci.Paris*, **321**, 735-745.

VIGNON X, CHESNE P, LEBOURHIS D, HEYMAN Y, RENARD JP. (1998)^b Developmental potential of bovine embryos reconstructed with somatic nuclei from cultured skin and muscle fetal cells. *Theriogenology*, **49**, 392.

VIGNON X, LEBOURHIS D, ADENOT P, MARCHAL J, LAVERGNE Y, LALOI E. (2000) Production of bovine embryos by nuclear transfer of adult skin fibroblast : the effect of serum starvation. *Theriogenology*, **53**, 245.

WAKAYAMA T, PERRY ACF, ZUCCOTTI M, JOHNSON KR, YANAGIMACHI R. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, **394**, 369-374.

WALKER SK, HARTWICH KM, SEAMARK RF. (1996) The production of unusually large offspring following embryo manipulation concepts and challenges. *Theriogenology*, **45**, 111-120.

WALSH MK, LUCEY JA, GOVINDASAMY-LUCEY S, GOVINDASAMY-LUCEY S, PACE MM, BISHOP MD. (2003) Comparison of milk produced by cows cloned by nuclear transfer with milk from non-cloned cows. *Cloning and Stem Cells*, **5**, 213-219.

WELLS DN, MISICA PM, MCMILLAN WH, TERVIT HR. (1998) Production of cloned bovine fetuses following nuclear transfer using cells from a fetal fibroblast cell line. *Theriogenology*, **49**, 330.

WELLS DN, MISICA PM, TERVIT HR. (1999)^a Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction*, **60**, 996-1005.

WELLS DN, MISICA PM, FORSYTH JT, BERG MC, LANGE JM, TERVIT HR et al. (1999)^b The use of adult somatic cell nuclear transfer to preserve the last surviving cow of the enderby island cattle breed. *Theriogenology*, **51**, 217.

WELLS DN. (2003) Cloning technology and health of cloned cattle and their offspring. *In : Workshop OECD/INRA*. Jouy en Josas, November 20-21, 8-10.

WELLS DN, FORSYTH JT, MC MILLAN V, OBACK B. (2004) The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning and Stem Cells*, **6**, 1001-1010.

WILLADSEN SM. (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, **320**, 63-65.

WILMUT I, SCHNIEKE AE, MC WHIR J, KIND AJ. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, **385**, 810-813.

WILSON JM, WILLIAMS JD, BONDIOLI KR, LOONEY CR, WESTHUSIN ME, MC CALLA DF. (1995) Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Animal Reproduction Science*, **38**, 73-83.

YANG L, CHAVATTE-PALMER P, KUBOTA C, O'NEILL M, HOAGLAND T, RENARD JP, et al. (2005) Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Molecular Reproduction and Development*, **71**, 431-438.

YONAI M, KANEYAMA K, MIYASHITA N, KOBAYASHI S, GOTO Y, BETTPTU T et al. (2005) Growth, reproduction, and lactation in somatic cell cloned cows with short telomeres. *J. Dairy. Sci.*, **88**, 4097-4110.

YOUNG LE, SINCLAIR KD, WILMUT I. (1998) Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, **3**, 155-163.

YOUNG LE, FAIRBURN HR. (2000) Improving the safety of embryo technologies : possible role of genomic imprinting. *Theriogenology*, **53**, 627-648.

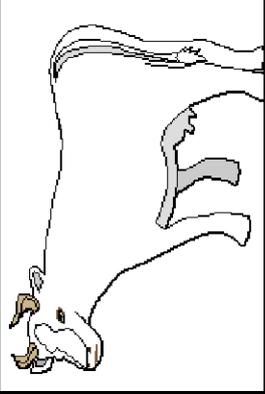
YOUNG LE, FERNANDES K, MC EVOY TG, BUTTERWITH SC, GUTIERREZ CG, CAROLAN C et al. (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics*, **27**, 153-154.

ANNEXES

Annexe 1 : Inventaire des veaux de l'étude

Numéro	Génotype	Date de naissance	Catégorie
233	5538	03/07/2002	clone
234	5538	03/07/2002	clone
239	5538	01/08/2002	clone
244	5538	06/09/2002	clone
245	5538	06/09/2002	clone
247	5538	19/09/2002	clone
248	5538	19/09/2002	clone
249	249	19/10/2002	témoin
250	250	23/10/2002	témoin
301	301	22/01/2003	témoin
302	302	30/01/2003	témoin
303	303	31/01/2003	témoin
304	304	04/02/2003	témoin
305	305	21/02/2003	témoin
308	308	26/03/2003	témoin
309	29	26/03/2003	clone
357	2251	29/12/2003	clone
400	400	22/01/2004	témoin
401	2251	22/01/2004	clone
402	2251	22/01/2004	clone
403	403	22/01/2004	témoin
404	404	22/01/2004	témoin
2251	2251	25/10/2002	témoin
2252	2252	26/10/2002	témoin
2254	2254	24/11/2002	témoin
2255	2255	27/11/2002	témoin
2256	5538	28/11/2002	clone
2258	5538	05/12/2002	clone
2259	5538	04/12/2002	clone
2261	2261	12/12/2002	témoin
2262	5538	19/12/2002	clone
2264	2264	16/12/2002	témoin
2265	2265	18/12/2002	témoin

Annexe 2 : Feuille d'examen clinique

<p>ANIMAL-Numéro : _____</p> <p>Date de l'examen clinique : _____</p> <p>POIDS : _____</p> <p style="text-align: center;">CLONE <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;">TEMOIN <input type="checkbox"/></p> <p>APPAREIL. CARDIOVASCULAIRE :</p> <p>Aspects des muqueuses _____</p> <p>Buccales : N congestion anémie _____</p> <p>Vulvaires : N congestion anémie _____</p> <p>Fréquence cardiaque : _____ /mn (1 mn, 3 fois à 10 minutes d'intervalle)</p> <p>Premier contrôle = _____ /mn</p> <p>Deuxième contrôle = _____ /mn</p> <p>Troisième contrôle = _____ /mn</p> <p style="text-align: center;">moyenne = _____ /mn</p> <p>APPAREIL LOCOMOTEUR :</p> <p>Ataxie : NON si OUI : _____</p> <p>Articulations des membres : N</p>	<p style="text-align: center;">OBSERVATIONS DIVERSES</p> <p>Température : _____</p> <p style="text-align: center;">PEAU</p> <p>Dépilations = Dep</p> <p>Décoloration = Dec</p> <p>Plaie = P</p>
<p>APPAREIL . RESPIRATOIRE :</p> <p>Fréquence respiratoire (1 mn, 3 fois à 10 minutes d'intervalle)</p> <p>Premier contrôle = _____ /mn</p> <p>Deuxième contrôle = _____ /mn</p> <p>Troisième contrôle = _____ /mn</p> <p style="text-align: center;">moyenne = _____ /mn</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div>

Annexe 3 : Fiches techniques des kits de dosages biochimiques

61 975

02811 C - FR - 06/2001

Urée cinétique UV 800

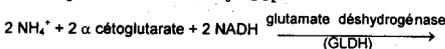
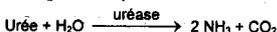
Pour diagnostic in vitro

Détermination enzymatique de l'urée (URÉASE - GLDH)

Réf. 61 975	Coffret pour 800 déterminations
	R1 = 10 x 80 ml
	R2 = 10 flacons (lyophilisé)
	10 bouchons adaptateurs

Principe

Dosage cinétique de l'urée selon la réaction :



Valeurs usuelles :

Sérum ou plasma : 2,5 à 7,5 mmol/l (0,15 à 0,45 g/l).
Urine : 338 à 538 mmol/24 h (20 à 35 g/24 h).

Bibliographie :

- HALLETT C.J., COOK J.G.H. - Clin. Chim. Acta, 1971, 35, 33.
- GUTMAN L., BERGMEYER H.U., In Methods of Enzymatic Analysis New-York, Academic Press, 1974, 2nd ed., Vol. IV, p 1794.

REACTIFS

Concentration dans le test :

Réactif 1 tampon	tampon tris pH 8 α céto glutarate	50 mmol/l 4 mmol/l
Réactif 2 enzymes	NADH GLDH uréase ADP	0,29 mmol/l $\geq 1\ 000$ U/l $\geq 5\ 000$ U/l 0,4 mmol/l

Stabilité :

La stabilité des réactifs à 2-8°C est indiquée sur chaque conditionnement.

ETALONS

Calibrateur multiparamétrique pour automates :
Calimat Réf. 62 321

ECHANTILLONS

Sérum ou plasma recueilli sur héparine, EDTA, fluorure ou héparine-iodoacétate.
Urine diluée au 1/100 dans l'eau distillée (tenir compte de la dilution pour le calcul).

MATERIEL

Pour l'addition de l'échantillon, l'utilisation d'une pipette de type SMI® est conseillée.

MODE OPERATOIRE

Solution de travail :

Visser à fond le bouchon adaptateur sur le col du flacon de Réactif 1. Introduire le col du flacon de Réactif 2 sur l'autre extrémité du bouchon adaptateur.
Mélanger par retournements et conserver la solution de travail dans le flacon de Réactif 1. Laisser 15 min à température ambiante.

Stabilité :

- 4 semaines à 2-8°C,
- 8 jours à 20-25°C.

Longueur d'onde : 340 nm (Fig 334)

Température : 25 ou 30°C

Cuve : trajet optique de 1cm

Zéro de l'appareil : air ou eau distillée

	Étalon	Dosage
Solution de travail	1 ml	1 ml
Placer à 25 ou 30°C, pour équilibrer.		
Étalon	10 μ l	-
Echantillon	-	10 μ l
Mélanger.		
Mesurer la diminution de DO entre : t = 20 secondes et t = 80 secondes.		

Linéarité : 50 mmol/l (3 g/l)

Calcul : $\frac{\Delta \text{DO dosage}}{\Delta \text{DO étalon}} \times n$

n : valeur de l'étalon en mmol/l (ou en g/l).

NOTES

- Adaptations sur appareils automatiques disponibles sur demande.
- Éviter toute contamination extérieure par les ions ammonium : éliminer toute solution de travail dont la DO est inférieure à 1,2.
- Veiller à ce que la température de réaction soit constante.

CONTROLE DE QUALITE

Exactitude et reproductibilité :

Lyotrol « N », Lyotrol « P », Unitrol, Monotrol.

Produit enregistré à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

Fabricant : bioMérieux sa



bioMérieux sa
au capital de 11 833 310 €
673 620 399 RCS LYON

69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00 / Fax 33 (0)4 78 87 20 90
http://www.biomerieux.com Imprimé en France

Créatinine cinétique*Pour diagnostic in vitro*

Détermination cinétique de la créatinine

Coffret pour 100 à 160 déterminations

R1 = 1 x 8 ml
R2 = 1 x 80 ml
R3 = 1 x 80 ml**PRINCIPE**

Dosage cinétique de la créatinine, sans déprotéinisation : mesure pendant une minute du composé formé par la créatinine et l'acide picrique en milieu alcalin.

VALEURS USUELLES :Sérum ou plasma

Hommes :

62 - 120 µmol/l (7 - 13,6 mg/l ; 0,7 - 1,36 mg/100 ml)

Femmes :

53 - 100 µmol/l (6 - 11,3 mg/l ; 0,6 - 1,13 mg/100 ml)

Urine

8,8 - 17,5 mmol/24 h (1 - 2 g/24 h)

BIBLIOGRAPHIEHOUGHTON O. - Interpretation of Clinical Laboratory Tests. 1985, 220 - 234.
Edited by Siest G., Henry J., Schiele F., Young D. S. Biomedical Publications.**REACTIFS**

Réactif 1 étalon	créatinine	132,6 µmol/l (15 mg/l - 1,5 mg/100 ml)
Réactif 2 réactif de coloration	acide picrique	8,8 mmol/l
Réactif 3 réactif alcalin	soude phosphate de sodium	0,4 mol/l 50 mmol/l

REACTIF IRRITANT :
R 36/38 : Irritant pour les yeux et la peau.
S 26 : en cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

STABILITE

Conservation à 15-25°C. La date limite d'utilisation est indiquée sur chaque conditionnement.

ECHANTILLONSSérum ou plasma recueilli sur héparine ou EDTA.
Urine diluée au 1/100 dans l'eau distillée. Effectuer le dosage sur cette dilution comme pour le sérum.**MODE OPERATOIRE****Solution de travail :**

Réactif 2 _____ 1 volume

Réactif 3 _____ 1 volume

Stabilité : 1 mois à 20-25°C, à l'abri de la lumière.

Longueur d'onde : _____ 492 nm (Hg 492)

Température : _____ 25, 30 ou 37° C

Cuve : _____ trajet optique 1 cm

Zéro de l'appareil : _____ air ou eau distillée

Solution de travail	1 ml
Placer à 25, 30 ou 37°C.	
Réactif 1 ou échantillon	100 µl
Mélanger. Lire l'absorbance entre t = 20 sec. et t = 80 sec.	

Linéarité : 1000 µmol/l (113 mg/l - 11,3 mg/100 ml)

Calcul : $\frac{\Delta DO \text{ dosage}}{\Delta DO \text{ étalon}} \times n$

µmol/l : n = 132,6

mg/l : n = 15

mg/100 ml : n = 1,5

Pour les urines, multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

NOTES :

- Veiller à ce que la température de réaction soit constante.
- Une concentration en bilirubine de 25 mg/l (42 µmol/l) entraîne une baisse du taux de créatinine d'environ 10 µmol/l.
- Un fort taux de triglycérides peut conduire à une surestimation du taux de créatinine dans les premières heures suivant le prélèvement. Il est conseillé de retester, dans ce cas, ce même échantillon après 24 heures.

AUTOMATISATION

Protocoles disponibles sur demande.

CONTROLE DE QUALITE**Exactitude et reproductibilité :**

Lytrol P, Unitrol.

Produit enregistré à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

Fabricant : bioMérieux sa



bioMérieux sa
au capital de 77 421 420 F
673 620 399 RCS LYON

69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00 / Fax 33 (0)4 78 87 20 90
http://www.biomerieux.com Imprimé en France

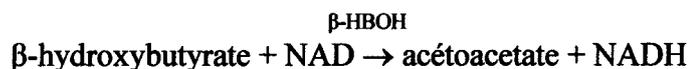
Réf :
Version : 1
Date : 13/12/06
Page :

1. **Documents de référence** : Barnouin et al (1986)

Annales de Recherche Vétérinaire, 17 : 129-139

2. **Hygiène et sécurité** : L'utilisation d'azide de sodium dans les préparations nécessite le port de gants.

3. **Principe de la méthode** : L'oxydation du D- β -OH en acétate est catalysée par la D- β -hydroxybutyrate déshydrogénase.



L'augmentation de l'absorbance à 340 nm est proportionnelle à la concentration de D- β -hydroxybutyrate déshydrogénase (DO= Σ .C.L) Loi de Beer-Lambert

4. **Matériels nécessaires** :

Matériels	appareillage
Automate	COBAS MIRA de Roche Diagnostics
Eau distillée	
Godets échantillons	
Cuves réactionnelles	

5. **Réactifs (chimiques et biologiques)**

Solutions stock	Conditions et lieux de stockage
Solution étalon à 1g/L	Porte du réfrigérateur salle 13
R1	Porte du réfrigérateur salle 13
R2	Porte du réfrigérateur salle 13

6. **Contraintes de la méthode** : solutions à préparer In Situ et sont à conserver en flacon brun au réfrigérateur.

Détermination des protéines totales

Réf. 61 602 Coffret pour 200 à 1 000 déterminations
 R1 = 1 x 8 ml
 R2 = 4 x 245 ml
 R3 = 1 x 25 ml

Dosage colorimétrique des protéines sériques selon une réaction du type Biuret (sels de cuivre en milieu alcalin).

Valeurs usuelles dans le sérum :

62 - 80 g/l

Bibliographie :

1. WEICHELBAUM P.E. - Am. J. Clin. Path. 1946, 16, 40.
2. GORNALL A. et al. - J. Biol. Chem. 1949, 177, 751.
3. PETERS T. - Clin. Chem. 1968, 14, 1147.
4. HENRY R. - Clin. Chem. Principles and technics 1964. Harper-Row, N.-York, p. 182.

REACTIFS

Réactif 1 étalon	albumine bovine	100 g/l
Réactif 2 réactif alcalin	tartrate de sodium et de potassium hydroxyde de sodium iodure de potassium	9 g/l 0,2 mol/l 5 g/l
Réactif 3 réactif de coloration	sulfate de cuivre	150 g/l

Stabilité :

La stabilité des réactifs à 2-8°C est indiquée sur chaque conditionnement.

ECHANTILLONS

Sérum ou plasma hépariné.

MODE OPERATOIRE

Solution de travail :

Ajouter 5 ml de Réactif 3 à 1 flacon de Réactif 2.

Stabilité : 6 mois à 2-8°C.

Longueur d'onde : _____

Zéro de l'appareil : _____ blanc réactif

	Blanc réactif	Etalon	Dosage
Sérum	—	—	0,1 ml
Réactif 1 (étalon)	—	0,1 ml	—
Solution de travail	5 ml	5 ml	5 ml

Mélanger. Attendre 5 min. Photométrer.

Stabilité de la coloration : _____ 30 min.

Linéarité : _____ 150 g/l

$$\text{Calcul : g/l} = \frac{\text{DO dosage}}{\text{DO étalon}} \times 100$$

NOTES

1. Dans le cas d'échantillons :
 - pigmentés (sérum icterique ou hémolysé),
 - opaiescents (sérum hyperlipémique ou sérum de contrôle non délipidé),

il est recommandé de réaliser un « blanc sérum » de la manière suivante :

- Echantillon : 0,1 ml
- Réactif 2 : 5 ml

Le calcul devient :

$$\text{g/l} = \frac{\text{DO dosage} - \text{DO blanc sérum}}{\text{DO étalon}} \times 100$$

2. Adaptations sur appareils automatiques disponibles sur demande.

CONTROLE DE QUALITE

Exactitude et reproductibilité :

Lytrol « N », Lytrol « P », Unitrol, Monotrol.

Produit enregistré à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

Fabricant : bioMérieux sa



bioMérieux sa
 au capital de 11 833 310 €
 673 620 399 RCS LYON

69280 Marcy-l'Étoile / France
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00 / Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com> imprimé en France

Enzyline γ GT 6 SPour diagnostic *in vitro***Enzyline γ GT 10 S****Enzyline γ GT 20 S**Détermination cinétique de l'activité γ glutamyl transférase**PRESENTATION**

Réf. 63 262	Enzyline γ GT 6 S Coffret pour 72 déterminations R1 = 1 x 80 ml R2 = 12 x 6 ml (poudre)
Réf. 63 711	Enzyline γ GT 10 S Coffret pour 160 déterminations R1 = 2 x 90 ml R2 = 16 x 10 ml (poudre)
Réf. 63 712	Enzyline γ GT 20 S Coffret pour 200 déterminations R1 = 4 x 65 ml R2 = 10 x 20 ml (poudre)

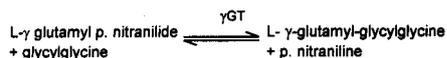
INTRODUCTION

La γ -Glutamyl Transférase (γ GT) est une enzyme présente principalement dans le foie, les reins et le pancréas. Son augmentation dans le sang reflète une nécrose de ces organes.

Elle est élevée au cours de la plupart des maladies du foie et notamment dans les désordres hépatobiliaires d'origine alcoolotoxiques.

PRINCIPE

Détermination cinétique de l'activité γ glutamyl transférase selon la réaction :

**VALEURS USUELLES DANS LE SERUM**

	25° C	30° C	37° C
Hommes	6-24 U/l	8-33 U/l	11-43 U/l
Femmes	5-21 U/l	7-29 U/l	9-37 U/l

REACTIFS

Concentration dans le test

Réactif 1	tampon tris pH 8,2	185 mmol/l
Tampon		
Réactif 2	L- γ glutamyl p. nitrilide	3,4 mmol/l
Substrat	glycylglycine	85 mmol/l

Stabilité avant reconstitution :

La stabilité des réactifs à 2-8° C est indiquée sur chaque conditionnement.

ECHANTILLONS

- Sérum ou plasma recueilli sur héparine ou EDTA.
- Interférences : Il n'a pas été observé d'influence significative :
 - de l'hémolyse jusqu'à 210 μ mol/l d'hémoglobine
 - de la bilirubine jusqu'à 800 μ mol/l
 - de la turbidité après surcharge d'échantillons par de l'intralipide jusqu'à 7 mmol/l d'équivalent triglycérides.

PRECAUTIONS D'UTILISATION

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.

MODE OPERATOIRE**Préparation du réactif :**

Ramener les réactifs à température ambiante avant la reconstitution.

Reprendre un flacon de Réactif 2 par le Réactif 1 :

Enzyline γ GT 6 S _____ 6 ml

Enzyline γ GT 10 S _____ 10 ml

Enzyline γ GT 20 S _____ 20 ml

Agiter immédiatement.

Stabilité après reconstitution :

- 5 jours à 20-25° C
- 3 semaines à 2-8° C

Longueur d'onde _____ 405 nm

Température _____ 30° C (25 ou 37° C)

Cuve _____ trajet optique 1 cm

Zéro de l'appareil _____ air ou eau distillée

Introduire dans un tube ou une cuve de mesure thermostaté à 25° C, 30° C ou 37° C :

Réactif 2 repris	1 ml
Echantillon	100 μ l

Mélanger. Attendre 1 min.

Mesurer l'augmentation moyenne de DO par min (n) pendant 1 à 3 min.

Pour une variation moyenne de DO par min \geq 0,18 (soit 200 U/l) refaire la détermination en diluant le sérum au 1/5 dans une solution de NaCl 9 g/l.

Calcul :

U/l = n x 1 111

AUTOMATISATION

Protocoles disponibles sur demande.

CONTROLE DE QUALITE

Zymotrol (Réf. 62 952).

PERFORMANCES

La linéarité est déterminée en méthode manuelle, les autres performances sur l'automate MIRA.

Limite de détection :

La limite de détection déterminée selon le protocole recommandé par Vassault et al. est égale à 5,60 U/l.

Linéarité :

Le réactif est linéaire jusqu'à 200 U/l.

Précision :

Trois échantillons ont été dosés en triple dans 15 séries différentes (3 séries par jour) sur un même automate. La répétabilité (précision intra-série) et la reproductibilité (précision inter-série) ont été calculées selon les recommandations du document NCCLS EP5-T2, volume 12 number 4.

Echantillons	Intra-série		
	N	Moyenne (U/l)	CV (%)
Niveau 1	45	19	2,10
Niveau 2	45	74	0,67
Niveau 3	45	212	0,50

Echantillons	Inter-série		
	N	Moyenne (U/l)	CV (%)
Niveau 1	45	19	2,90
Niveau 2	45	74	1,51
Niveau 3	45	212	1,39

Corrélation :

50 échantillons de patients ont été dosés comparativement à un réactif commercialisé utilisant le même principe technique que le réactif bioMérieux.

L'équation de la droite d'allométrie est :

$Y = 1,02 X - 4,24$ avec un coefficient de corrélation de 0,996.

BIBLIOGRAPHIE

1. MAYR K. - Die Bedeutung der γ -glutamyl transpeptidase-aktivität in der klinischen diagnostik - Das Medizinische Laboratorium 1973, 26, 6, 125-132.
2. PERSIJN J.P. VAN DER SLIK X., SWART W.A. - Colorimetric assay for γ -glutamyl transpeptidase. - Clin. Chim. Acta 1971, 36, 1, 239-240.
3. SZASZ G. - A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. - Clin. Chem. 1969, 15, 2, 124-136
4. SHARPE PC., Mc BRIDE R., ARCHBOLD GP. - Biochemical markers of alcohol abuse. - QJM, 1996, 89, 2, 137-44.
5. VASSAULT A., GRAFMEYER D., NAUDIN C. et al. - Protocole de validation de techniques (document B) - Ann. Biol. Clin. 1986, 44, 686-745.

Produits enregistrés à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

Fabricant : bioMérieux sa



bioMérieux sa
au capital de 77 421 420 F
673 620 399 RCS LYON

69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00 / Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com> Imprimé en France

Annexe 4 : Paramètres cliniques des bovins de l'étude

(Numéro = numéro de l'animal ; Groupe 1 = clone ; Groupe 2 = Témoin ; Température en °C ; FC = Fréquence Cardiaque en bpm ; FR = Fréquence Respiratoire en mpm)

Numéro	Groupe	Age	Température	FC	FR
233	1	4	.	92	37
233	1	6	.	100	35
233	1	8	38.3	75	33
233	1	10	38.6	79	21
233	1	12	38.7	64	37
233	1	14	38.7	75	26
233	1	16	37.7	77	28
233	1	18	38.5	87	27
233	1	24	38	61	24
234	1	4	.	99	37
234	1	6	.	98	39
234	1	8	38.7	79	29
234	1	10	38.9	78	18
234	1	12	38.8	67	39
234	1	14	38.9	75	23
234	1	16	38.2	71	22
234	1	18	38.8	82	23
234	1	24	38.6	59	22
239	1	4	.	100	33
239	1	6	.	100	32
239	1	8	39.5	85	21
239	1	10	39.3	71	27
239	1	12	39.1	70	28
239	1	14	38.5	99	30
239	1	16	37.9	68	18
239	1	18	38.2	82	16
239	1	24	38.3	65	25
244	1	4	.	99	33
244	1	6	38.9	97	35
244	1	8	39.1	78	22
244	1	10	39.2	73	46
244	1	12	39	81	26
244	1	14	39.3	73	34
244	1	16	38.4	86	28
244	1	18	38.5	83	29

Numéro	Groupe	Age	Température	FC	FR
244	1	24	.	.	.
245	1	4	.	104	38
245	1	6	39.1	105	46
245	1	8	39.2	87	24
245	1	10	39.2	66	37
245	1	12	38.8	90	24
245	1	14	38.4	80	32
245	1	16	38.3	92	24
245	1	18	38.5	86	26
245	1	24	38.2	67	28
247	1	4	.	94	29
247	1	6	39.2	97	39
247	1	8	39	85	27
247	1	10	39.4	65	47
247	1	12	38.8	84	24
247	1	14	38.7	69	31
247	1	16	38.6	84	22
247	1	18		84	22
247	1	24	38.6	67	29
248	1	4	.	97	37
248	1	10	39.5	70	55
248	1	12	39	89	40
248	1	16	39	77	31
248	1	18	38.8	93	26
248	1	24	39.4	75	37
249	2	4	.	86	32
249	2	6	38.7	94	56
249	2	8	38.8	83	34
249	2	10	38.9	91	49
249	2	12	.	.	.
249	2	14	38.1	83	21
249	2	16	38.5	96	20
249	2	18	37.5	85	24
249	2	24	38.1	64	23
250	2	4	.	109	36
250	2	6	39.1	90	48
250	2	8	39	75	35
250	2	10	38.7	72	40
250	2	12	.	.	.
250	2	14	38	81	25

Numéro	Groupe	Age	Température	FC	FR
250	2	16	38.4	83	18
250	2	18	37.8	87	34
250	2	20	38.4	66	31
250	2	22	38.1	82	35
250	2	24	38.3	69	24
250	2	30	38.6	104	35
301	2	4	38.7	98	46
301	2	6	40.8	83	80
301	2	8	39.1	79	34
301	2	10	38.6	75	36
301	2	12	38.7	105	25
301	2	14	38.3	81	25
301	2	16	38.2	74	19
301	2	18	38.1	65	23
301	2	24	.	.	.
302	2	4	39.3	94	44
302	2	6	39.9	105	82
302	2	8	39.4	89	35
302	2	10	38.8	79	31
302	2	12	38.6	104	25
302	2	14	38.3	83	23
302	2	16	38.3	82	29
302	2	18	38.1	57	20
302	2	24	38.3	70	28
303	2	4	39.3	98	32
303	2	6	39.4	103	56
303	2	8	39.1	82	30
303	2	10	38.1	77	29
303	2	12	38.6	101	23
303	2	14	38.2	88	24
303	2	16	38.4	83	22
303	2	18	.	.	.
303	2	24	38.2	72	19
304	2	4	39	103	44
304	2	6	38.9	57	42
304	2	8	.	.	.
304	2	10	38.2	81	24
304	2	12	38.2	87	19
304	2	14	37.6	91	28
304	2	16	38.4	70	32

Numéro	Groupe	Age	Température	FC	FR
304	2	18	38.6	67	45
304	2	24	38.4	68	21
305	2	4	40	108	46
305	2	6	39.1	99	68
305	2	8	.	.	.
305	2	10	39.2	77	34
305	2	12	38.8	92	24
305	2	14	37.9	97	40
305	2	16	38.5	75	32
305	2	18	38.4	81	44
305	2	24	38.1	75	18
308	2	4	.	.	.
308	2	6	.	.	.
308	2	8	38.8	61	27
308	2	10	38.8	89	21
308	2	12	38.4	100	32
308	2	14	38.5	71	41
308	2	16	38.6	96	40
308	2	18	38.7	64	24
308	2	24	.	.	.
309	1	4	.	.	.
309	1	6	.	.	.
309	1	8	38.8	88	26
309	1	10	39.1	92	22
309	1	12	.	.	.
309	1	14	38.8	97	29
309	1	16	38.6	74	31
309	1	18	38.2	95	34
309	1	24	.	.	.
357	1	4	38.6	84	38
357	1	6	39.2	93	41
357	1	8	38.7	81	37
357	1	10	39.1	85	27
357	1	12	38.1	90	23
357	1	14	38.1	85	19
357	1	16	38.1	69	29
357	1	18	39.2	58	52
401	1	4	.	74	29
401	1	6	38.5	84	26
401	1	8	38.2	89	30

Numéro	Groupe	Age	Température	FC	FR
401	1	10	38.6	85	21
401	1	12	38.5	85	22
401	1	14	.	.	.
401	1	16	38.3	63	28
401	1	18	39.1	73	31
401	1	24	.	.	.
402	1	4	38.7	70	34
402	1	6	38.6	72	28
402	1	8	37.8	88	23
402	1	10	38.7	91	24
402	1	12	38.3	81	21
402	1	14	.	.	.
402	1	16	37.7	66	22
402	1	18	38.7	65	59
402	1	24	.	.	.
403	2	4	39.1	98	53
403	2	6	39.2	104	42
403	2	8	38.8	84	30
403	2	10	38.8	94	25
403	2	12	38.9	92	24
403	2	14	.	.	.
403	2	16	38.3	64	21
403	2	18	38.5	82	47
403	2	24	.	.	.
404	2	4	39.2	107	51
404	2	6	38.9	104	37
404	2	8	.	.	.
404	2	10	38.4	93	24
404	2	12	38.6	84	25
404	2	14	.	.	.
404	2	16	38.1	78	27
404	2	18	.	71	43
404	2	24	.	.	.
2251	2	4	.	90	41
2251	2	6	39.6	90	47
2251	2	8	39.3	76	35
2251	2	10	38.1	65	38
2251	2	12	38.6	81	26
2251	2	14	38	75	20
2251	2	16	38.5	87	21

Numéro	Groupe	Age	Température	FC	FR
2251	2	18	37.9	85	16
2251	2	24	38.3	65	21
2252	2	4	.	112	37
2252	2	6	39.6	97	45
2252	2	8	39.2	79	35
2252	2	10	39.4	71	40
2252	2	12	38.9	81	42
2252	2	14	38.9	82	18
2252	2	16	37.8	89	20
2252	2	18	37.8	82	
2252	2	24	38.3	69	24
2254	2	4	38.7	110	55
2254	2	6	39.3	84	31
2254	2	8	38.8	63	49
2254	2	10	38.7	83	31
2254	2	12	38.6	89	37
2254	2	14	38.6	97	36
2254	2	16	38.2	87	37
2254	2	18	38.2	70	23
2254	2	24	38	63	28
2255	2	4	39	108	35
2255	2	6	39.3	83	26
2255	2	8	39.2	77	52
2255	2	10	39.1	86	26
2255	2	12	38.5	69	27
2255	2	14	38.7	100	27
2255	2	16	38.4	83	29
2255	2	18	38.3	64	20
2255	2	24	38.3	64	20
2256	1	4	39.7	97	45
2256	1	6	39.6	77	28
2256	1	8	39	63	39
2256	1	10	.	.	.
2256	1	12	38.7	86	20
2256	1	14	38.6	78	22
2256	1	16	38.6	86	28
2256	1	18	38.4	74	28
2256	1	24	37.8	65	20
2258	1	4	39.2	96	48
2258	1	6	39.1	72	40

Numéro	Groupe	Age	Température	FC	FR
2258	1	8	38.1	69	31
2258	1	10	.	.	.
2258	1	12	38.6	73	21
2258	1	14	38	86	25
2258	1	16	38.1	87	31
2258	1	18	38.4	67	26
2258	1	24	38.8	67	15
2259	1	4	39.1	97	46
2259	1	6	39.6	69	37
2259	1	8	38.9	67	34
2259	1	10	.	.	.
2259	1	12	38.4	71	36
2259	1	14	38.7	87	19
2259	1	16	38.5	81	23
2259	1	18	38.5	64	27
2259	1	24	.	.	.
2261	2	4	39.1	87	50
2261	2	6	39.1	73	30
2261	2	8	39.1	76	40
2261	2	10	.	.	.
2261	2	12	38.6	82	17
2261	2	14	38.8	90	23
2261	2	16	38.2	81	29
2261	2	18	38.3	65	37
2261	2	24	38.1	80	25
2262	1	4	39.4	92	52
2262	1	6	39.1	64	35
2262	1	8	39.2	67	40
2262	1	10	.	.	.
2262	1	12	38.7	76	20
2262	1	14	38.2	83	24
2262	1	16	38.6	91	24
2262	1	18	38.7	66	29
2262	1	24	38.6	57	22
2264	2	4	39.4	109	56
2264	2	6	39.3	85	38
2264	2	8	38.9	74	52
2264	2	10	38.4	85	32
2264	2	12	38.4	89	28
2264	2	14	38.7	85	28

Numéro	Groupe	Age	Température	FC	FR
2264	2	16	38.1	87	32
2264	2	18	38.6	71	38
2264	2	24	38.8	96	23
2265	2	4	38.9	85	48
2265	2	6	39.1	73	51
2265	2	8	39.4	86	60
2265	2	10	.	.	.
2265	2	12	38.3	57	27
2265	2	14	38.4	90	22
2265	2	16	38.2	88	26
2265	2	18	38,6	72	26
2265	2	24	38.7	78	22

Annexe 5 : Paramètres hématologiques des bovins de l'étude pour la lignée rouge

(Num = numéro de l'animal ; Groupe 1 = clone ; Groupe 2 = Témoin ; NG=Numération globulaire $10^6 / \mu\text{L}$; Hb = hémoglobine en g/dL ; Ht = hématocrite en % ; VGM = Volume Globulaire Moyen en μm^3 ; TGMH = teneur Globulaire Moyenne en Hémoglobine, en pg ; CCMH = Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine, en g/dL ; Plaq = numération plaquettaire $/\text{mm}^3$).

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
233	1	4	9.4	9.9	36.7	39.04	10.53	26.98	416000
233	1	6		11.8	
233	1	8	9.69	11.1	39.3	40.56	11.46	28.24	670000
233	1	10	8.96	10.4	36.3	40.51	11.61	28.65	739000
233	1	12	7.52	9.1	30.8	40.96	12.1	29.55	544000
233	1	14	8.49	10.3	34.8	40.99	12.13	29.6	528000
233	1	16	7.37	9.8	31.6	42.88	13.3	31.01	444000
233	1	18	7.22	9.8	31.3	43.35	13.57	31.31	384000
233	1	24	8.24	11.9	37.1	45.02	14.44	32.08	382000
234	1	4	9.4
234	1	6		10
234	1	8		10.2
234	1	10	3.66	9.1	15.2	41.53	24.86	59.87	.
234	1	12	7.4	8.3	29	39.19	11.22	28.62	749000
234	1	14	8.03	9.2	32.2	40.1	11.46	28.57	596000
234	1	16	8.18	10	34.1	41.69	12.22	29.33	551000
234	1	18	8.06	10.3	34.2	42.43	12.78	30.12	426000
234	1	24	7.57	10.4	33.3	43.99	13.74	31.23	375000
239	1	4	9.84	10.2	38.6	39.23	10.37	26.42	696000
239	1	6	9.7	11.3	772000
239	1	8		11.6

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
239	1	10	3.99	9.3	16.8	42.11	23.31	55.36	.
239	1	12	7.35	8.4	29.3	39.86	11.43	28.67	697000
239	1	14	7.69	9	31	40.31	11.7	29.03	250000
239	1	16	7.96	9.8	32.9	41.33	12.31	29.79	656000
239	1	18	8.43	11.1	36.3	43.06	13.17	30.58	405000
239	1	24	8.21	11.2	36	43.85	13.64	31.11	420000
244	1	4		10.7
244	1	6		11.1	496000
244	1	8		10.9
244	1	10	7.28	8.3	28.7	39.42	11.4	28.92	708000
244	1	12	8.64	10	35.1	40.63	11.57	28.49	598000
244	1	14	9.42	11.3	39.2	41.61	12	28.83	466000
244	1	16	7.74	9.9	32.9	42.51	12.79	30.09	400000
244	1	18	7.73	10.01	33.2	42.95	13.07	30.42	313000
244	1	24	
245	1	4		10.4
245	1	6		10	846000
245	1	8		11.1
245	1	10	3.46	8	14.2	41.04	23.12	56.34	614000
245	1	12	10.26	11.4	39.8	38.79	11.11	28.64	747000
245	1	14	8.95	10.5	36.8	41.12	11.73	28.53	530000
245	1	16	7.66	9.7	32.2	42.04	12.66	30.12	482000
245	1	18	7.4	9.4	31.2	42.16	12.7	30.13	416000
245	1	24	7.16	10	31.2	43.58	13.97	32.05	360000
247	1	4		10.5
247	1	6		10.5	861000
247	1	8		10.7
247	1	10	3.51	8.2	14.4	41.03	23.36	56.94	.
247	1	12	8.73	10	35.2	40.32	11.45	28.41	761000
247	1	14	8.83	10.6	36.4	41.22	12	29.12	431000

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
247	1	16	7.51	9.4	31.6	42.08	12.52	29.75	422000
247	1	18	7.43	9.5	31.6	42.53	12.79	30.06	371000
247	1	24	7.42	10.5	33	44.47	14.15	31.82	442000
248	1	4		11.9	22.7	.	.	52.42	780000
248	1	6		10.5
248	1	8		10.1
248	1	12	3.64	9.3	15.1	41.48	25.55	61.59	.
248	1	14	4.27	10.3	18	42.15	24.12	57.22	.
248	1	16	8.02	9.3	32.2	40.15	11.6	28.88	574000
248	1	18	7.66	9	30.7	40.08	11.75	29.32	629000
248	1	24	7.41	10.3	32.4	43.72	13.9	31.79	329000
249	2	4	8.96	10.8	36.6	40.85	12.05	29.51	552000
249	2	6	8.56	10.7	35.6	41.59	12.5	30.06	499000
249	2	8	7.65	10.6	33.4	43.66	13.86	31.74	362000
249	2	10	6.37	8.6	27.4	43.01	13.5	31.39	564000
249	2	12	6.64	9.5	29.5	44.43	14.31	32.2	466000
249	2	14	7.1	10.3	31.6	44.51	14.51	32.59	431000
249	2	16	6.67	10.2	31	46.48	15.29	32.9	330000
249	2	18	6.05	9.5	29	47.93	15.7	32.76	347000
249	2	24	6.37	11.3	33.7	52.9	17.74	33.53	235000
250	2	4	8.89	10.5	36.4	40.94	11.81	28.85	500000
250	2	6	9.63	11.7	39.9	41.43	12.15	29.32	478000
250	2	8	8.05	10.1	33.7	41.86	12.55	29.97	466000
250	2	10	6.65	8.3	27.6	41.5	12.48	30.07	440000
250	2	12	8.15	10.1	33.8	41.47	12.39	29.88	478000
250	2	14	8.54	10.6	35.8	41.92	12.41	29.61	533000
250	2	16	7.44	10.2	32.9	44.22	13.71	31	438000
250	2	18	7.18	10.1	32	44.57	14.07	31.56	479000
250	2	24	6.53	10.7	32.5	49.77	16.39	32.92	172000
301	2	4	8.76	10	35	39.95	11.42	28.57	676000

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
301	2	6	9.71	11.3	39.5	40.68	11.64	28.61	815000
301	2	8	7.69	8.8	30.6	39.79	11.44	28.76	663000
301	2	10	7.49	9.1	30.7	40.99	12.15	29.64	567000
301	2	12	7.34	9.4	30.7	41.83	12.81	30.62	532000
301	2	14	7.65	9.9	32.2	42.09	12.94	30.75	446000
301	2	16	7.2	9.5	30.7	42.64	13.19	30.94	396000
301	2	18	8.14	11.2	35.9	44.1	13.76	31.2	466000
301	2	24							
302	2	4	10.5	13	40	38.1	12.38	32.5	513000
302	2	6	11.18	13.6	45.4	40.61	12.16	29.96	618000
302	2	8	9.54	11.6	39.1	40.99	12.16	29.67	405000
302	2	10	9.24	11.6	38.4	41.56	12.55	30.21	249000
302	2	12	7.59	10.2	32.6	42.95	13.44	31.29	518000
302	2	14	8.65	11.5	36.9	42.66	13.29	31.17	491000
302	2	16	8.81	12	38.3	43.47	13.62	31.33	392000
302	2	18	9.71	14.1	44	45.31	14.52	32.05	413000
302	2	24	8.55	14.1	41.8	48.89	16.49	33.73	246000
303	2	4	8.6	10.4	35.2	41.16	12.09	29.38	443000
303	2	6	7.92	10	33.2	41.92	12.63	30.12	437000
303	2	8	7.57	10.3	32.5	42.93	13.61	31.69	459000
303	2	10	6.81	9.2	29.1	42.73	13.51	31.62	411000
303	2	12	6.28	9.2	28.1	44.75	14.65	32.74	508000
303	2	14	7.51	10.9	34	45.27	14.51	32.06	398000
303	2	16	6.53	10	30.4	46.55	15.31	32.89	296000
303	2	18	6.29	10.3	30.7	48.81	16.38	33.55	106000
303	2	24	6.67	11.6	34.7	52.02	17.39	33.43	302000
304	2	4	8.64	11	36.3	42.01	12.73	30.3	381000
304	2	6	8.3	10.7	35.3	42.53	12.89	30.31	328000
304	2	8	7.22	9.3	30.6	42.38	12.88	30.39	234000
304	2	10	6.76	9.7	30.2	44.67	14.35	32.12	473000

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
304	2	12	7.46	11.4	34.8	46.65	15.28	32.76	302000
304	2	14	6.48	9.9	30.4	46.91	15.28	32.57	339000
304	2	16	5.87	9.6	28.8	49.06	16.35	33.33	293000
304	2	18	6.54	11.2	33.2	50.76	17.13	33.73	203000
304	2	24	6.26	11.6	34.5	55.11	18.53	33.62	191000
305	2	4	8.13	10.7	34.5	42.44	13.16	31.01	380000
305	2	6	7.99	10.7	34.9	43.68	13.39	30.66	431000
305	2	8	7.59	10.1	32.6	42.95	13.31	30.98	340000
305	2	10	7.68	10.7	34	44.27	13.93	31.47	506000
305	2	12	7.63	11.4	34.9	45.74	14.94	32.66	455000
305	2	14	7.43	11.1	34.3	46.16	14.94	32.36	179000
305	2	16	7.01	11.4	33.9	48.36	16.26	33.63	305000
305	2	18	6.76	11.8	34.3	50.74	17.46	34.4	191000
305	2	24	7.41	13.7	40.1	54.12	18.49	34.16	184000
308	2	4							
308	2	6	8.47	10.8	35.6	42.03	12.75	30.34	512000
308	2	8	7.92	9.9	32.7	41.29	12.5	30.28	741000
308	2	10	7.02	9.9	30.6	43.59	14.1	32.35	325000
308	2	12	7.2	10.1	31.6	43.89	14.03	31.96	514000
308	2	14	6.74	9.9	30.4	45.1	14.69	32.57	442000
308	2	16	5.67	9.1	27.1	47.8	16.05	33.58	65000
308	2	18	6.62	10.8	31.9	48.19	16.31	33.86	371000
308	2	24	7	12.3	35.7	51	17.57	34.45	255000
309	1	4							
309	1	6	8.75	10.1	35.5	40.57	11.54	28.45	260000
309	1	8	8.45	10	34.3	40.59	11.83	29.15	984000
309	1	10	7.01	9.5	29.8	42.51	13.55	31.88	509000
309	1	12	7.24	9.8	30.8	42.54	13.54	31.82	453000
309	1	14	6.94	9.6	30.2	43.52	13.83	31.79	344000
309	1	18	6.9	10.4	31.8	46.09	15.07	32.7	322000

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
309	1	24	6.69	11.7	33.4	49.93	17.49	35.03	113000
357	1	4	8.92	11.1	37.3	41.82	12.44	29.76	571000
357	1	6	
357	1	8	8.26	10.8	35.6	43.1	13.08	30.34	576000
357	1	10	7.04	9.6	30.2	42.9	13.64	31.79	59000
357	1	12	7.83	11.2	34.7	44.32	14.3	32.28	496000
357	1	14	7.97	11.8	35.9	45.04	14.81	32.87	366000
357	1	16	7.76	11.5	35	45.1	14.82	32.86	355000
357	1	18	6.65	10.3	31.1	46.77	15.49	33.12	350000
357	1	24	
400	2	4	11.66	12	44	37.74	10.29	27.27	824000
400	2	6	9.42	10.2	37.5	39.81	10.83	27.2	743000
400	2	8	8.76	9.9	34.7	39.61	11.3	28.53	583000
400	2	10	
400	2	12	
400	2	14	
400	2	16	
400	2	18	
400	2	24	
401	1	4	9.3	11.9	39.3	42.26	12.8	30.28	480000
401	1	6	9.43	12.1	40.2	42.63	12.83	30.1	375000
401	1	8	6.82	8.7	28.7	42.08	12.76	30.31	476000
401	1	10	6.55	9	28.1	42.9	13.74	32.03	542000
401	1	12	7.78	10.6	33.5	43.06	13.62	31.64	361000
401	1	14	
401	1	16	7.84	11.5	35.1	44.77	14.67	32.76	276000
401	1	18	7.35	10.9	33.7	45.85	14.83	32.34	406000
401	1	24	
402	1	4	
402	1	6	8.12	7.8	34.7	42.73	9.61	22.48	124000

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
402	1	8	6.63	8.7	28.1	42.38	13.12	30.96	704000
402	1	10	6.4	8.7	27.3	42.66	13.59	31.87	228000
402	1	12	7.78	10.7	33.7	43.32	13.75	31.75	372000
402	1	14	7.54	11.2	33.6	44.56	14.85	33.33	453000
402	1	16	8.08	11.7	36.1	44.68	14.48	32.41	362000
402	1	18	7.45	11	33.5	44.97	14.77	32.84	433000
402	1	24
403	2	4	8.39	10.8	35.9	42.79	12.87	30.08	391000
403	2	6	8.39	11.5	37.5	44.7	13.71	30.67	386000
403	2	8	8.09	12.2	38.1	47.1	15.08	32.02	262000
403	2	10	6.69	9.8	30.4	45.44	14.65	32.24	783000
403	2	12	7.56	11.4	34.6	45.77	15.08	32.95	409000
403	2	14	7.89	12.2	36.7	46.51	15.46	33.24	388000
403	2	16	8.4	12.9	39.5	47.02	15.36	32.66	273000
403	2	18	7.73	12.2	37.2	48.12	15.78	32.8	362000
403	2	24
404	2	4	12.4	12.8	48.8	39.35	10.32	26.23	647000
404	2	6	8.98	10.5	36.7	40.87	11.69	28.61	520000
404	2	8	8.91	10.3	36.4	40.85	11.56	28.3	555000
404	2	10	9.14	11.8	38.4	42.01	12.91	30.73	428000
404	2	12	8.29	10.8	34.9	42.1	13.03	30.95	163000
404	2	14	8.31	11.5	36.2	43.56	13.84	31.77	358000
404	2	16	8.01	11.7	35.6	44.44	14.61	32.87	251000
404	2	18	9.31	13.8	42.2	45.33	14.82	32.7	171000
404	2	24
2251	2	4	8.7	10.7	36	41.38	12.3	29.72	112000
2251	2	6	9.81	12.3	39.3	40.06	12.54	31.73	447000
2251	2	8	8.31	10.6	34.9	42	12.76	30.37	396000
2251	2	10	6.6	8.8	28.2	42.73	13.33	31.21	439000
2251	2	12

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
2251	2	14	6.59	9.5	29.2	44.31	14.42	32.53	406000
2251	2	16	6.44	9.7	29.4	45.65	15.06	32.99	364000
2251	2	18	6.78	10.1	30.9	45.58	14.9	32.69	402000
2251	2	24	6.47	11.1	33	51	17.16	33.64	323000
2252	2	4	8.93	10.2	35.7	39.98	11.42	28.57	378000
2252	2	6	8.96	10.7	36.3	40.51	11.94	29.48	382000
2252	2	8	9.04	11	37.6	41.59	12.17	29.26	403000
2252	2	10	7.34	9.1	30	40.87	12.4	30.33	152000
2252	2	12	7.3	9.1	29.8	40.82	12.47	30.54	441000
2252	2	14	8.22	10.4	34.1	41.48	12.65	30.5	466000
2252	2	16	7.98	10.8	33.9	42.48	13.53	31.86	317000
2252	2	18	7.89	10.6	33.8	42.84	13.43	31.36	203000
2252	2	24	7.8	12	35.9	46.03	15.38	33.43	168000
2254	2	4	10.54	11.7	40.8	38.71	11.1	28.68	689000
2254	2	6	8.82	10.1	35.2	40.02	11.45	28.61	607000
2254	2	8	8.3	9.4	33.1	39.88	11.33	28.4	485000
2254	2	10	7.84	9.3	31.4	40.05	11.86	29.62	637000
2254	2	12	6.9	8.5	28.3	41.01	12.32	30.04	276000
2254	2	14	7.62	9.9	32.4	42.52	12.99	30.56	213000
2254	2	16	7.97	10.3	34.2	42.91	12.92	30.12	391000
2254	2	18	7.37	10.5	33	44.78	14.25	31.82	326000
2254	2	24	6.86	11.2	33.2	48.4	16.33	33.73	206000
2255	2	4	10.24	12.7	41	40.04	12.4	30.98	648000
2255	2	6	8.7	10.8	36	41.38	12.41	30	314000
2255	2	8	7.46	9.7	31.6	42.36	13	30.7	509000
2255	2	10	7.48	10.5	32.7	43.72	14.04	32.11	536000
2255	2	12	6.81	10.1	30.9	45.37	14.83	32.69	514000
2255	2	14	6.93	10.7	31.7	45.74	15.44	33.75	528000
2255	2	16	6.74	10.3	31.3	46.44	15.28	32.91	525000
2255	2	18	6.73	10.8	31.9	47.4	16.05	33.86	494000

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
2255	2	24	6.28	10.8	31.8	50.64	17.2	33.96	479000
2256	1	4	10.3	10	35	33.98	9.71	28.57	840000
2256	1	6	3.29	9.2	13.4	40.73	27.96	68.66	.
2256	1	8	2.89	8.1	11.8	40.83	28.03	68.64	.
2256	1	10	3.39	7.9	14	41.3	23.3	56.43	.
2256	1	12	8.3	9.5	33.3	40.12	11.45	28.53	760000
2256	1	14	7.68	9.2	31.2	40.63	11.98	29.49	532000
2256	1	16	8.19	9.9	33.8	41.27	12.09	29.29	521000
2256	1	18	7.74	9.6	32.4	41.86	12.4	29.63	398000
2256	1	24	7.61	10.2	32.6	42.84	13.4	31.29	266000
2258	1	4	11	11	38	34.55	10	28.95	870000
2258	1	6	3.94	10.1	16.3	41.37	25.63	61.96	.
2258	1	8	3.32	9.1	13.7	41.27	27.41	66.42	.
2258	1	10	7.4	8.3	29.3	39.59	11.22	28.33	493000
2258	1	12	8.01	9.3	32.3	40.32	11.61	28.79	677000
2258	1	14	7.73	9.4	31.7	40.01	12.16	29.65	256000
2258	1	16	7.91	9.8	33.1	41.85	12.39	29.61	495000
2258	1	18	7.29	9.7	31.2	42.8	13.31	31.09	477000
2258	1	24	7.84	11.2	34.6	44.13	14.29	32.37	167000
2259	1	4		11.1
2259	1	6	4.3	11.2	17.9	41.63	26.05	62.57	.
2259	1	8	2.7	8	11	40.74	29.63	72.73	.
2259	1	10	3.18	7.7	13.1	41.19	24.21	58.78	.
2259	1	12	8.1	9.3	32.3	39.88	11.48	28.79	643000
2259	1	14	7.83	9.1	31.7	40.49	11.62	28.71	491000
2259	1	16	7.92	9.4	32.2	40.66	11.87	29.19	551000
2259	1	18	7.3	9.2	30.5	41.78	12.6	30.16	434000
2259	1	24	8.1	11	34.7	42.84	13.58	31.7	.
2261	2	4	8.39	9.6	33.4	39.81	11.44	28.74	538000
2261	2	6	9.07	10.7	36.8	40.57	11.8	29.08	525000

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
2261	2	8	8.76	10.5	35.9	40.98	11.99	29.25	540000
2261	2	10	7.57	9.5	31.5	41.61	12.55	30.16	485000
2261	2	12	8.83	11.6	37.5	42.47	13.14	30.93	558000
2261	2	14	8.04	10.7	34.5	42.91	13.31	31.01	169000
2261	2	16	7.83	10.5	34.3	43.81	13.41	30.61	138000
2261	2	18	7.08	10.4	32	45.2	14.69	32.5	95000
2261	2	24	8.69	13.7	41.4	47.64	15.77	33.09	90000
2262	1	4	10	10	34	34	10	29.41	830000
2262	1	6	3.4	9	13.9	40.88	26.47	64.75	.
2262	1	8	3.16	8.9	13.1	41.46	28.16	67.94	.
2262	1	10	3.21	8	13.3	41.43	24.92	60.15	.
2262	1	12	8.27	9.4	33.3	40.27	11.37	28.23	520000
2262	1	14	8.47	9.8	34.3	40.5	11.57	28.57	620000
2262	1	16	7.86	9.5	32.1	40.84	12.09	29.6	539000
2262	1	18	7.52	9.3	31.5	41.89	12.37	29.52	538000
2262	1	24	7.51	10	32	42.61	13.32	31.25	274000
2264	2	4	7.53	9.1	30.7	40.77	12.08	29.64	630000
2264	2	6	8.28	10.2	34.2	41.3	12.32	29.82	504000
2264	2	8	7.12	8.9	29.6	41.57	12.5	30.07	220000
2264	2	10	7.02	9.2	30	42.74	13.11	30.67	284000
2264	2	12	6.99	9.4	30	42.92	13.45	31.33	626000
2264	2	14	7.21	10.3	31.8	44.11	14.29	32.39	316000
2264	2	16	7.37	10.4	32.8	44.5	14.11	31.71	391000
2264	2	18	7.3	10.6	32.6	44.66	14.52	32.52	429000
2264	2	24	7.11	11.7	34.7	48.8	16.46	33.72	393000
2265	2	4	7.53	9.1	30.7	40.77	12.08	29.64	630000
2265	2	6	8.1	10.2	33.7	41.6	12.59	30.27	611000
2265	2	8	6.46	8.1	26.6	41.18	12.54	30.45	548000
2265	2	10	6.44	8.7	27.8	43.17	13.51	31.29	353000
2265	2	12	7.31	10.3	32.4	44.32	14.09	31.79	615000

Num	Groupe	Age	NG	Hb	Ht	VGM	TGMH	CCMH	Plaq
2265	2	14	6.75	9.8	30.6	45.33	14.52	32.03	410000
2265	2	16	6.75	9.9	30.6	45.33	14.67	32.35	561000
2265	2	18	7.05	10.7	32.9	46.67	15.18	32.52	353000
2265	2	24	6.59	11.3	33.7	51.14	17.15	33.53	322000

Annexe 6 : Paramètres hématologiques des bovins de l'étude pour la lignée blanche

(Num = numéro de l'animal ; Groupe 1 = clone ; Groupe 2 = témoin ; Neutro, Eo, Baso, Lymph, Mono = respectivement nombre de neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes et monocytes par mm³)

Num	Groupe	Age	Neutro	Eo	Baso	Lymph	Mono
233	1	4	5508	0	0	5184	108
233	1	6	6916	0	0	5985	399
233	1	8	6027	123	0	5535	615
233	1	10	3021	0	0	2173	106
233	1	12	2013	0	0	3599	488
233	1	14	3256	74	0	3996	74
233	1	16	2346	69	0	3657	828
233	1	18	5264	224	0	4480	1232
233	1	24	3492	679	0	4559	970
234	1	4	3243	69	0	2277	1311
234	1	6	5450	327	0	4905	218
234	1	8	4410	105	0	5250	735
234	1	10	1140	0	0	4800	60
234	1	12	2760	0	0	3795	345
234	1	14	3432	78	78	3198	1014
234	1	16	2840	213	0	3195	852
234	1	18	4343	202	0	4141	1414
234	1	24	4326	515	0	4429	1030
239	1	4	3400	0	0	5100	0
239	1	6	3286	0	0	6784	530
239	1	8	7150	0	0	6864	286
239	1	10	5814	228	0	5130	228
239	1	12	5940	0	0	3850	1210
239	1	14	3916	0	0	3827	1157
239	1	16	2052	76	0	4028	1444
239	1	18	3034	656	0	3526	984
239	1	24	3115	623	89	4272	801
244	1	4	3500	100	0	4400	2000
244	1	6	5640	0	0	6240	120
244	1	8	3220	0	0	5612	368
244	1	10	1488	0	0	4278	434
244	1	12	4312	88	0	3344	1056
244	1	14	2618	154	0	4158	770

Num	Groupe	Age	Neutro	Eo	Baso	Lymph	Mono
244	1	16	5472	456	114	4104	1254
244	1	18	6720	120	0	4080	1080
244	1	24
245	1	4	7506	0	0	6255	139
245	1	6	5304	0	0	4284	612
245	1	8	4620	0	0	5670	210
245	1	10	1625	0	0	3900	975
245	1	12	4067	83	0	3154	996
245	1	14	4094	89	0	3827	890
245	1	16	5355	1190	0	4284	71
245	1	18	3588	368	92	4140	1012
245	1	24	3154	249	0	4150	747
247	1	4	4558	0	0	5830	212
247	1	6	5152	0	0	5040	1008
247	1	8	2292	0	0	5632	176
247	1	10	1260	0	0	4140	600
247	1	12	5115	93	0	3069	1023
247	1	14	4539	0	89	3382	890
247	1	16	6215	113	0	3616	1356
247	1	18	3485	255	85	3825	850
247	1	24	4794	102	0	4794	510
248	1	4	3920	0	0	2380	700
248	1	6	3400	0	0	3400	1700
248	1	8	6600	0	0	4752	1848
248	1	12	1650	0	0	3100	250
248	1	14	4300	172	0	2838	1290
248	1	16	2479	67	67	3283	804
248	1	18	4888	208	0	3952	1352
248	1	24	5520	345	0	4715	920
249	2	4	3784	344	0	4386	86
249	2	6	3103	0	0	5640	658
249	2	8	3290	0	0	3640	70
249	2	10	2982	0	0	3266	852
249	2	12	2940	0	140	2870	1050
249	2	14	1860	0	60	3180	900
249	2	16	3330	0	74	2886	1110
249	2	18	2320	116	0	2610	754
249	2	24	3948	756	0	2940	756
250	2	4	2310	70	0	4130	490
250	2	6	1776	0	0	5032	592

Num	Groupe	Age	Neutro	Eo	Baso	Lymph	Mono
250	2	8	2368	0	0	3968	64
250	2	10	1440	72	0	1836	252
250	2	12	1953	63	0	3591	693
250	2	14	880	88	44	2904	484
250	2	16	2294	186	0	3038	682
250	2	18	2600	0	0	3315	585
250	2	24	2205	252	0	3276	567
301	2	4	3535	0	0	5959	606
301	2	6	3850	0	0	3388	462
301	2	8	2754	0	0	4212	1134
301	2	10	2511	81	0	4779	729
301	2	12	3434	0	0	5353	1313
301	2	14	3200	100	0	5300	1400
301	2	16	2635	0	0	5185	680
301	2	18	4141	0	0	5151	808
301	2	24
302	2	4	3510	0	0	7254	936
302	2	6	5916	0	0	4080	204
302	2	8	3649	0	0	4361	890
302	2	10	4300	0	0	4500	1200
302	2	12	4859	0	0	5198	1243
302	2	14	6384	0	0	6916	0
302	2	16	3850	0	110	5940	1100
302	2	18	4410	0	0	5145	945
302	2	24	3420	0	0	4680	900
303	2	4	3956	0	0	4128	516
303	2	6	3735	0	0	4316	249
303	2	8	3567	0	0	5133	0
303	2	10	2320	80	80	4800	720
303	2	12	2958	87	0	4698	957
303	2	14	5151	101	101	3838	909
303	2	16	2400	0	0	4720	880
303	2	18	2916	162	81	4212	729
303	2	24	2310	0	70	3920	700
304	2	4	4704	896	0	5600	0
304	2	6	4464	0	0	3720	1116
304	2	8	1206	0	67	4154	1273
304	2	10	1633	142	0	4402	923
304	2	12	3705	285	95	4655	760
304	2	14	4444	202	0	4747	707

Num	Groupe	Age	Neutro	Eo	Baso	Lymph	Mono
304	2	16	40.28	636	0	5088	848
304	2	18	3325	475	0	5130	570
304	2	24	3007	970	0	5044	679
305	2	4	2812	0	0	4712	76
305	2	6	1825	0	0	4380	1095
305	2	8	2470	0	95	6080	855
305	2	10	2068	94	94	6016	1128
305	2	12	2800	100	0	6100	1000
305	2	14	2378	82	82	4838	820
305	2	16	4240	212	0	5300	848
305	2	18	2781	103	0	6695	721
305	2	24	2387	77	0	4697	539
308	2	4
308	2	6	5635	0	115	4830	920
308	2	8	2660	0	0	3952	988
308	2	10	5336	184	0	2392	1288
308	2	12	5565	0	0	4935	0
308	2	14	5800	100	0	3400	700
308	2	16	3285	146	0	3650	219
308	2	18	3690	246	0	3526	738
308	2	24	3285	0	0	3358	657
309	1	4
309	1	6	2448	0	72	4032	648
309	1	8	1150	0	50	2950	850
309	1	10	2666	0	62	2790	682
309	1	12	2640	0	0	4720	640
309	1	14	2639	0	0	5915	546
309	1	18	2088	0	0	4608	504
309	1	24	2124	0	0	3304	472
357	1	4	2948	0	0	2881	871
357	1	6
357	1	8	3224	0	0	6968	208
357	1	10	3240	0	0	4950	810
357	1	12	2958	87	0	4959	696
357	1	14	3168	88	88	4840	616
357	1	16	3120	0	0	4880	0
357	1	18	3034	0	0	3848	518
357	1	24
400	2	4	2300	0	0	5704	1196
400	2	6	3520	0	0	7480	0

Num	Groupe	Age	Neutro	Eo	Baso	Lymph	Mono
400	2	8	2666	0	0	5246	688
400	2	10
400	2	12
400	2	14
400	2	16
400	2	18
400	2	24
401	1	4	2772	0	0	2835	693
401	1	6	3120	0	0	4446	234
401	1	8	2304	0	0	3456	640
401	1	10	5170	0	0	4730	1100
401	1	12	2940	0	0	4872	588
401	1	14
401	1	16	2376	0	0	4248	576
401	1	18	1920	0	0	3540	540
401	1	24
402	1	4
402	1	6	3698	0	0	4730	172
402	1	8	2842	0	0	6272	686
402	1	10	3825	0	0	3000	675
402	1	12	3026	0	0	5251	623
402	1	14	3024	0	0	3672	504
402	1	16	2673	0	0	4941	486
402	1	18	3360	0	0	4160	480
402	1	24
403	2	4	2494	0	0	6020	86
403	2	6	2670	0	0	6230	0
403	2	8	1680	0	0	4690	630
403	2	10	2952	82	0	4592	574
403	2	12	1485	198	0	7227	990
403	2	14	2430	270	0	5580	720
403	2	16	2400	672	0	5952	576
403	2	18	1936	704	0	5632	528
403	2	24
404	2	4	3666	0	0	5734	0
404	2	6	2516	0	74	4070	740
404	2	8	2590	0	0	3640	770
404	2	10	3160	0	0	4108	632
404	2	12	2295	0	0	5610	595
404	2	14	2280	0	0	4712	608

Num	Groupe	Age	Neutro	Eo	Baso	Lymph	Mono
404	2	16	2142	0	0	3591	567
404	2	18	3312	552	0	4968	368
404	2	24
2251	2	4	2047	267	0	6586	0
2251	2	6	5764	0	0	6026	1310
2251	2	8	3042	0	0	4758	0
2251	2	10	2310	0	0	3894	396
2251	2	12
2251	2	14	2550	0	85	5270	595
2251	2	16	3042	0	0	4290	468
2251	2	18	3528	0	0	5782	490
2251	2	24	2835	0	0	3087	378
2252	2	4	1230	82	0	6314	574
2252	2	6	1278	0	0	5396	426
2252	2	8	2178	0	0	4356	66
2252	2	10	2686	0	0	4582	632
2252	2	12	4256	112	112	5600	1120
2252	2	14	5772	111	0	4551	666
2252	2	16	2688	252	84	4536	840
2252	2	18	2300	200	0	6800	700
2252	2	24	3483	0	0	3888	729
2254	2	4	2726	0	0	5828	846
2254	2	6	1798	0	0	3770	232
2254	2	8	564	0	0	3854	282
2254	2	10	2187	324	81	4698	810
2254	2	12	1829	177	0	3835	59
2254	2	14	2464	231	0	4158	847
2254	2	16	2250	180	0	5760	810
2254	2	18	2088	216	0	4176	720
2254	2	24	1470	70	0	4760	700
2255	2	4	2407	83	0	5063	747
2255	2	6	1848	252	0	6132	168
2255	2	8	784	0	0	4760	56
2255	2	10	2460	82	82	4838	738
2255	2	12	2425	194	97	6305	679
2255	2	14	3638	321	0	5778	963
2255	2	16	3108	0	0	7104	888
2255	2	18	2475	198	99	6435	693
2255	2	24	2923	474	79	3713	711
2256	1	4	4738	0	0	4944	618

Num	Groupe	Age	Neutro	Eo	Baso	Lymph	Mono
2256	1	6	7448	133	0	5320	399
2256	1	8	4800	0	0	2560	640
2256	1	10	4185	0	0	3999	1116
2256	1	12	3042	78	156	3276	1248
2256	1	14	3268	228	76	3040	988
2256	1	16	3600	240	0	3440	720
2256	1	18	3636	202	0	5454	808
2256	1	24	3690	180	0	4320	810
2258	1	4	5265	0	0	5850	585
2258	1	6	5712	0	0	6069	0
2258	1	8	5340	0	0	3471	89
2258	1	10	3876	0	76	2812	836
2258	1	12	2442	66	66	2904	1122
2258	1	14	3450	207	0	2346	897
2258	1	16	3071	249	0	3984	996
2258	1	18	4136	188	94	4136	846
2258	1	24	5508	216	0	4104	972
2259	1	4	7344	0	0	5576	680
2259	1	6	5300	106	0	4876	318
2259	1	8	4872	0	0	2856	672
2259	1	10	4368	91	91	3458	1092
2259	1	12	2244	68	136	3536	816
2259	1	14	2840	213	0	3976	71
2259	1	16	4004	182	0	4914	0
2259	1	18	3780	270	90	3960	900
2259	1	24	3827	445	0	3649	979
2261	2	4	2745	0	0	4536	810
2261	2	6	2916	405	0	4779	0
2261	2	8	3519	0	0	2553	828
2261	2	10	3034	164	82	3854	1066
2261	2	12	1988	71	0	3905	1136
2261	2	14	3649	267	0	4094	890
2261	2	16	3813	279	0	4371	837
2261	2	18	3528	420	84	3528	840
2261	2	24	2960	296	0	3478	666
2262	1	4	3956	92	0	4784	368
2262	1	6	4140	276	0	4784	0
2262	1	8	5060	0	0	3588	552
2262	1	10	5085	0	113	4972	1130
2262	1	12	2916	0	81	3888	1215

Num	Groupe	Age	Neutro	Eo	Baso	Lymph	Mono
2262	1	14	4059	198	0	4257	1386
2262	1	16	3060	170	0	4080	1190
2262	1	18	3813	93	0	4371	1023
2262	1	24	4085	380	0	3990	1045
2264	2	4	4300	86	0	3526	688
2264	2	6	2752	384	0	3200	64
2264	2	8	2080	0	0	3068	52
2264	2	10	1887	102	51	2448	612
2264	2	12	1170	39	39	2106	546
2264	2	14	5568	0	96	2496	1440
2264	2	16	2898	0	63	2457	882
2264	2	18	1950	130	65	3770	585
2264	2	24	2491	53	53	2014	689
2265	2	4	4300	86	0	3526	688
2265	2	6	6776	0	0	4840	484
2265	2	8	3392	64	0	2368	576
2265	2	10	3360	0	0	2040	600
2265	2	12	4576	0	88	3256	880
2265	2	14	4104	0	0	2508	988
2265	2	16	2812	228	0	3724	836
2265	2	18	5412	328	0	2132	328
2265	2	24	2982	639	0	2698	781

Annexe 7 : Paramètres biochimiques des bovins de l'étude

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
233	1	4	3.23	86.33	1.03	68.36	33.97	26.14	72.38
233	1	6	3.74	78.57	1.62	70.68	36.12	17.43	72.38
233	1	8	3.74	90.21	1.62	71.89	37.84	22.55	66.74
233	1	10	2.5	88.27	1.28	72.91	38.27	24.60	71.44
233	1	12	2.93	85.36	1.69	58.73	32.25	21.01	66.27
233	1	14	4.17	87.3	1.65	63.15	32.25	27.16	87.42
233	1	16	3.31	87.3	1.09	59.15	30.10	23.58	71.91
233	1	18	3.28	107.19	1.92	66.87	35.69	22.55	68.62
233	1	24	3.92	101.37	1.13	73.80	36.55	19.48	63.45
234	1	4	2.98	76.86	1.56	68.16	37.67	19.78	54.15
234	1	6	2.1	70.22	1.31	69.48	39.99	17.52	53.69
234	1	8	4.72	74.96	1.63	66.40	38.13	21.47	64.61
234	1	10	2.1	76.38	0.9	69.04	39.06	29.38	54.15
234	1	12	3.43	69.27	1.72	69.58	38.13	23.73	68.25
234	1	14	2.96	84.92	1.63	65.61	37.67	31.08	61.43
234	1	16	2.57	90.14	1.43	66.05	37.67	22.60	73.26
234	1	18	2.55	95.83	2.44	74.33	41.39	23.17	73.71
234	1	24	2.89	111.02	0.99	73.65	41.39	22.04	50.96
239	1	4	3.69	74.5	1.69	65.15	34.40	23.46	67.08
239	1	6	3.2	75	1.54	78.44	35.69	24.48	73.10
239	1	8	3.99	86.5	1.75	76.23	35.69	27.03	68.37
239	1	10	2.95	96.5	1.09	77.02	34.40	32.64	65.79
239	1	12	2.78	118.5	0.96	84.32	32.68	15.81	46.87
239	1	14	8.14	91	1.59	74.24	32.68	27.03	66.22
239	1	16	1.57	84.5	1.82	83.95	35.69	23.46	56.33
239	1	18	4.05	94	1.31	69.83	33.54	18.87	52.46
239	1	24	2.9	95.5	1.01	74.97	33.97	19.38	47.30

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
244	1	4	3.39	65.28	1.52	62.12	35.35	22.77	64.02
244	1	6	4.1	57.6	1.54	62.02	34.85	17.82	66.45
244	1	8	2.73	88.32	0.97	63.80	33.84	22.28	64.02
244	1	10	4.23	69.12	1.31	60.64	32.32	24.26	78.57
244	1	12	4.67	79.68	1.57	63.04	32.83	29.21	73.24
244	1	14	2.86	91.2	1.72	64.87	34.85	24.26	71.78
244	1	16	3.79	79.2	2.15	65.48	34.85	19.80	69.36
244	1	18	4.88	78.72	2.48	68.80	37.37	18.32	65.48
244	1	24
245	1	4	2.78	72.94	1.99	61.53	40.56	23.06	73.76
245	1	6	3.47	69.41	1.07	68.41	42.64	20.50	68.81
245	1	8	1.99	92.55	0.74	64.55	37.96	23.58	62.37
245	1	10	2.63	71.93	1.43	57.87	35.36	24.09	72.77
245	1	12	2.99	87.52	1.44	69.00	41.08	31.78	77.22
245	1	14	2.02	99.09	1.5	67.12	38.48	23.06	70.79
245	1	16	2.8	88.53	2.01	68.06	38.48	23.06	71.28
245	1	18	3.02	90.54	1.15	66.13	38.48	16.91	60.39
245	1	24	2.83	106.13	0.99	67.86	41.60	19.48	73.76
247	1	4	1.83	80.98	1.19	50.43	34.16	20.02	76.74
247	1	6	2.3	72.43	1.28	66.79	47.03	22.30	101.46
247	1	8	1.15	96.07	0.23	51.70	32.67	16.84	68.50
247	1	10	2.3	85.51	0.78	54.90	32.18	18.20	76.74
247	1	12	1.86	91.04	0.81	56.82	34.16	25.03	75.71
247	1	14	2.32	109.15	1.61	60.49	37.62	20.93	76.74
247	1	16	1.97	82.49	2.35	60.25	35.64	17.29	58.71
247	1	18	1.8	95.07	1.48	54.24	33.66	15.93	57.17
247	1	24	2.45	116.19	1.18	60.58	37.13	19.11	66.95
248	1	4
248	1	6

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
248	1	8
248	1	10	1.79	67.2	0.76	53.67	32.67	20.02	78.80
248	1	12	3.78	72.96	1.58	54.99	33.17	26.85	81.37
248	1	14	1.85	92.16	0.9	50.38	32.18	19.57	65.92
248	1	16	2.65	76.8	1.5	57.62	35.15	17.29	70.04
248	1	18
248	1	24	2.57	91.2	1.34	56.82	37.13	15.93	65.92
249	2	4	2.97	72.48	1.83	52.78	33.66	12.29	68.50
249	2	6	2.55	81.6	2.67	56.87	34.16	13.20	60.77
249	2	8	2.93	78.24	2.61	60.58	36.63	17.29	63.35
249	2	10	1.6	80.16	1.56	70.59	39.60	20.48	63.86
249	2	12	6.14	78.24	2.71	58.33	33.17	12.74	58.20
249	2	14	1.89	74.4	1.93	57.53	32.18	18.66	48.93
249	2	16	5.62	77.28	2.52	64.44	39.60	15.02	58.20
249	2	18	3.61	84.48	1.05	56.54	32.18	13.20	48.41
249	2	24	4.55	109.44	1.68	63.45	38.61	14.11	53.05
250	2	4	2.78	79.47	1.88	64.31	39.14	21.29	78.28
250	2	6	2.66	87.02	2.21	70.02	44.29	23.27	73.13
250	2	8	2.69	83	1.67	75.68	40.17	23.76	64.38
250	2	10	2.02	95.57	1.3	71.96	38.63	30.20	59.74
250	2	12	6.2	89.03	2.17	71.25	38.63	29.70	54.59
250	2	14	2.24	95.07	1.02	73.75	40.17	29.21	56.14
250	2	16	3.71	83	2.66	66.30	37.60	22.28	53.56
250	2	18	3.58	81.49	2.11	70.84	39.66	23.76	52.02
250	2	24	3.77	103.62	2.45	67.68	40.69	22.77	54.08
301	2	4	5	81.31	1.27	62.87	38.12	20.17	65.00
301	2	6	2.9	91.41	1.08	72.72	39.11	21.80	62.50
301	2	8	3.56	91.91	1.79	65.27	29.70	21.80	71.00
301	2	10	2.62	107.06	1.42	65.51	34.16	23.98	66.50

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
301	2	12	2.8	94.94	2.04	78.69	42.08	24.53	70.00
301	2	14	2.99	103.53	2.1	63.70	35.15	17.99	56.00
301	2	16	1.67	101	1.29	59.88	32.18	18.53	54.00
301	2	18	3.52	102.52	1.31	71.64	20.30	20.71	62.00
301	2	24
302	2	4	3.72	111.61	1.48	65.42	37.73	15.36	61.05
302	2	6	3.42	96.46	1.41	68.06	43.12	16.80	62.16
302	2	8	3.89	103.02	2.08	63.46	38.71	15.84	71.60
302	2	10	2.06	101.51	1.11	65.66	38.22	19.20	57.72
302	2	12	1.84	78.78	2.05	69.29	35.77	19.20	58.28
302	2	14	2.69	92.42	2.21	68.45	38.22	18.72	72.15
302	2	16	1.43	122.72	1.82	66.05	36.26	16.80	61.05
302	2	18	2.41	97.47	1.05	78.11	42.63	17.76	63.83
302	2	24	2.5	135.85	1.32	70.12	42.14	16.32	64.94
303	2	4	2.76	89.78	1.09	74.53	46.06	17.28	84.36
303	2	6	5	83.6	1.42	66.44	40.67	14.40	94.91
303	2	8	4.56	100.7	2.02	71.69	40.18	16.32	67.71
303	2	10	2.76	100.23	1.14	70.90	33.81	16.80	65.49
303	2	12	2.49	95.95	1.77	61.69	31.36	12.00	48.29
303	2	14	3.14	92.15	2.37	75.80	44.10	18.24	83.25
303	2	16	2.05	105.45	1.62	59.19	36.75	14.40	62.16
303	2	18	3.84	102.13	1.38	60.42	36.75	15.36	59.39
303	2	24	2.88	100.23	1.28	77.96	42.63	20.16	73.82
304	2	4	3.2	80.5	1.69	66.54	41.58	20.17	78.50
304	2	6	2.44	94	0.8	69.78	43.56	27.25	198.00
304	2	8	4.58	75.5	2.22	62.23	36.14	11.99	56.50
304	2	10	2.13	97	0.84	70.17	37.13	17.44	48.50
304	2	12	3.63	84	2.47	66.54	36.63	14.72	69.00
304	2	14	3.01	80.5	1.77	66.20	37.13	20.17	62.00

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
304	2	16	3.12	107	1.48	66.00	39.11	16.35	63.00
304	2	18	2.56	86.5	0.99	68.06	41.58	19.62	74.00
304	2	24	2.47	106.5	1.15	79.14	52.47	20.71	83.50
305	2	4	3.35	92.15	1.68	67.38	36.55	12.81	63.45
305	2	6	2.17	84.08	1.83	74.03	38.27	12.81	52.64
305	2	8	5.01	87.88	2.07	65.75	36.12	6.15	50.76
305	2	10	2.23	75.53	1.1	.	39.99	13.84	55.93
305	2	12	3.47	85.03	2.43	72.12	33.11	11.79	52.64
305	2	14	2.95	85.98	1.93	.	36.98	12.30	57.34
305	2	16	3.32	97.85	2.86	.	38.27	13.84	64.86
305	2	18	2.56	101.65	1.19	.	39.56	14.35	76.61
305	2	24
308	2	4
308	2	6	6.54	94.56	1.75	66.30	40.80	21.60	68.88
308	2	8	2.1	84.96	0.86	61.20	31.68	24.96	40.85
308	2	10	3.9	89.76	1.9	55.47	29.76	17.76	48.45
308	2	12	3.48	84.48	1.7	62.48	31.20	22.08	46.08
308	2	14	4.32	90.24	1.41	61.84	32.64	20.16	47.98
308	2	16	2.84	82.08	1.62	58.31	31.20	21.60	43.70
308	2	18	3.86	94.08	1.47	69.29	36.00	22.08	48.45
308	2	24	2.88	109.25	0.89	71.25	38.88	21.60	47.50
309	1	4
309	1	6	.	.	.	63.00	34.79	21.84	50.50
309	1	8	.	.	.	66.20	32.83	28.21	75.00
309	1	10	.	.	.	68.00	36.75	18.66	65.50
309	1	12	.	.	.	64.41	36.26	19.11	60.50
309	1	14	.	.	.	57.47	34.79	16.84	59.00
309	1	16	.	.	.	57.38	34.79	13.20	61.00
309	1	18

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
309	1	24	.	.	.	69.60	39.20	13.20	59.50
357	1	4	2.91	72	2.1	57.77	37.44	20.64	54.63
357	1	6	4.94	80.16	2.1	61.20	38.88	16.80	54.15
357	1	8	2.76	80.64	0.89	65.22	37.44	19.68	51.30
357	1	10	3.72	91.2	1.46	53.31	31.68	18.24	51.30
357	1	12	2.67	97.92	1.02	65.95	35.52	18.72	57.95
357	1	14	4.44	94.39	1.45	79.92	43.20	23.52	69.83
357	1	16	2.28	105.32	1.12	70.95	36.48	20.64	59.38
357	1	18
357	1	24
400	2	4	2.43	86.24	1.17	62.73	34.83	14.86	60.63
400	2	6	3.75	79.38	1.87	59.94	32.68	9.23	52.17
400	2	8	2.51	92.61	1.34	61.89	31.82	10.25	47.94
400	2	10
400	2	12
400	2	14
400	2	16
400	2	18
400	2	24
401	1	4	2.81	69.09	2.38	64.63	35.26	16.32	43.00
401	1	6	.	78.89	1.63	68.78	36.12	15.81	48.16
401	1	8	2.93	88.2	1.06	70.40	32.68	17.34	44.72
401	1	10	2.85	78.89	1.93	69.56	32.68	21.42	46.44
401	1	12	3.22	93.1	1.16	77.12	38.70	22.44	58.48
401	1	14	3.29	99.36	1.13	76.81	35.26	21.42	57.62
401	1	16	2.56	115	1.24	80.69	37.41	22.44	56.33
401	1	18	2.58	122.36	1.2	77.86	33.97	20.40	60.63
401	1	24
402	1	4	3.82	87.22	1.72	51.06	42.12	19.08	56.86

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
402	1	6	3.75	81.83	1.85	66.14	43.20	14.72	50.00
402	1	8	.	84.28	0.87	68.95	39.42	19.62	56.37
402	1	10	.	86.73	1.8	73.94	41.04	20.17	42.16
402	1	12	.	95.55	1.63	69.26	42.12	19.62	57.35
402	1	14	2.67	102.58	0.92	69.73	40.50	21.26	54.41
402	1	16	2.96	123.28	1.34	82.42	48.60	24.53	74.51
402	1	18	2.24	107.64	1.01	76.34	44.82	24.53	59.80
402	1	24
403	2	4	3.05	101.43	1.41	61.71	36.12	15.89	61.57
403	2	6	1.96	88.69	1.67	59.99	36.55	12.81	57.34
403	2	8	2.44	97.51	1.17	62.17	36.55	13.84	56.40
403	2	10	2.97	73.01	1.5	61.80	30.96	17.43	54.05
403	2	12	3.72	93.1	1.4	65.05	36.55	18.96	61.57
403	2	14	2.83	122.36	1.13	63.52	36.12	12.81	61.10
403	2	16	2.15	145.36	1.27	70.17	39.56	15.38	70.97
403	2	18	1.62	122.82	1.4	65.66	36.98	19.99	59.69
403	2	24
404	2	4	.	82.32	1.79	66.82	44.28	10.36	77.45
404	2	6	2.53	74.48	1.17	66.98	45.36	10.90	65.69
404	2	8	2.32	81.34	1.37	68.69	44.28	11.99	69.12
404	2	10	.	80.85	1.73	72.49	42.12	13.08	51.47
404	2	12	3.31	74.48	1.22	73.06	43.74	14.17	60.78
404	2	14	2.22	83.72	0.84	67.34	40.50	16.90	59.80
404	2	16	2.49	123.74	1.69	79.25	46.44	20.17	83.82
404	2	18	1.89	100.28	1.17	79.20	47.52	18.53	74.02
404	2	24
2251	2	4	3.87	84.48	1.22	68.44	51.06	20.64	62.00
2251	2	6	2.92	82.08	1.66	72.05	50.37	20.64	60.50
2251	2	8	3.56	100.8	1.82	70.97	48.30	23.04	67.00

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
2251	2	10	2.79	102.24	1.16	72.56	47.61	17.28	64.50
2251	2	12	6.03	82.56	1.16	66.85	46.23	21.60	57.50
2251	2	14	2.16	101.76	0.62	67.93	45.54	20.64	40.00
2251	2	16	4.06	96	1.06	69.22	48.30	19.68	57.50
2251	2	18	3.08	96.48	0.33	70.81	48.99	22.08	58.50
2251	2	24	3.83	117.6	1.46	68.55	46.23	22.08	57.50
2252	2	4	2.89	108.15	1.2	64.94	51.75	13.92	53.50
2252	2	6	2.73	105.13	1.88	66.85	51.75	13.44	44.00
2252	2	8	2.41	110.66	2.25	68.65	51.06	16.32	51.00
2252	2	10	1.54	110.16	1.47	64.74	48.99	19.20	53.00
2252	2	12	3.83	85.51	1.35	65.20	47.61	18.72	43.00
2252	2	14	1.47	101.1	1.28	72.77	50.37	15.36	57.50
2252	2	16	2.95	93.56	2.04	71.17	48.99	21.12	57.00
2252	2	18	3.58	81.49	2.11	71.74	47.61	16.32	50.00
2252	2	24	3.22	123.74	1.63	67.47	53.82	13.92	47.50
2254	2	4	2.72	71.89	0.66	59.07	39.05	11.88	57.25
2254	2	6	5.23	74.17	1.43	64.74	41.25	11.88	64.20
2254	2	8	2.76	83.27	1.11	57.04	33.00	10.89	77.58
2254	2	10	3.54	85.54	2.16	56.98	33.00	19.80	67.95
2254	2	12	2.78	91	1.4	60.78	34.65	18.32	57.25
2254	2	14	2.75	83.72	2.54	65.56	37.95	13.86	57.25
2254	2	16	4.13	99.65	3.09	70.62	41.25	7.92	67.95
2254	2	18	1.79	84.63	1.39	64.19	37.95	12.87	62.60
2254	2	24	2.82	115.12	1.66	66.55	39.05	11.88	47.08
2255	2	4	2.15	163.68	1.25	61.10	38.88	16.83	74.37
2255	2	6	5.05	156.24	1.28	50.30	39.84	17.33	88.80
2255	2	8	2.49	161.82	1.76	61.70	35.04	16.83	77.70
2255	2	10	2.48	161.82	1.87	61.55	35.04	21.29	76.59
2255	2	12	1.72	192.51	1.16	60.90	35.52	18.81	62.72

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
2255	2	14	2.65	179.49	2.48	69.15	39.36	16.34	72.71
2255	2	16	3.38	174.84	2.45	64.15	38.40	15.84	59.94
2255	2	18	1.06	190.65	2.07	63.50	41.28	16.34	62.72
2255	2	24	2.61	213.9	1.41	75.10	38.88	16.83	61.05
2256	1	4	2.44	84.65	1.21	61.15	37.92	22.77	74.37
2256	1	6	2.28	104.45	1.17	63.40	39.36	24.26	78.81
2256	1	8	2.5	108.41	0.87	56.80	31.68	21.29	82.14
2256	1	10	6.38	83.66	2.08	60.35	34.08	23.76	67.71
2256	1	12	2.05	82.17	0.89	72.35	37.92	24.26	78.26
2256	1	14	3.43	84.65	2.22	58.95	33.60	16.83	63.27
2256	1	16	2.05	94.55	1.53	63.60	36.00	18.32	62.72
2256	1	18	3.03	104.94	1.78	59.55	33.60	16.34	60.50
2256	1	24	2.57	110.88	0.99	58.50	31.68	18.32	65.49
2258	1	4	2.29	81.6	1.45	69.74	40.38	25.97	66.83
2258	1	6	1.22	81.6	1.42	72.51	40.38	18.02	55.94
2258	1	8	1.41	75.36	0.98	70.57	39.43	21.73	72.77
2258	1	10	6.42	83.04	1.96	60.53	36.58	21.73	78.71
2258	1	12	1.6	80.64	1.02	61.11	32.78	21.73	68.81
2258	1	14	2.83	97.44	2.38	63.20	35.63	12.72	62.37
2258	1	16	2.92	84.96	1.48	65.81	38.95	18.02	56.43
2258	1	18	2.73	69.6	1.59	76.63	43.23	21.73	77.22
2258	1	24	2.53	107.04	1.1	67.85	38.95	20.67	86.63
2259	1	4	2.84	69.16	1.48	66.72	40.70	19.80	72.76
2259	1	6	1.27	71.44	1.31	61.38	38.50	15.84	65.81
2259	1	8	1.68	75.99	0.91	62.43	34.10	20.30	76.51
2259	1	10	7.12	73.71	1.38	69.03	40.15	24.26	87.21
2259	1	12	1.92	76.44	1.07	66.55	39.05	21.29	101.65
2259	1	14	3.63	77.81	2.01	60.67	34.65	16.83	65.81
2259	1	16	2.71	84.18	1.62	65.67	37.40	19.31	65.27

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
2259	1	18	3.87	93.73	1.75	63.75	36.85	16.83	73.83
2259	1	24
2261	2	4	2.93	90.16	1.3	57.38	34.79	13.20	61.00
2261	2	6	3.51	103.39	2.07	65.38	36.75	18.66	71.00
2261	2	8	2.7	109.76	1.08	57.23	31.85	18.20	55.50
2261	2	10	6.18	91.14	1.08	68.82	38.22	21.39	68.00
2261	2	12	2.31	99.96	0.99	64.94	33.32	18.66	59.00
2261	2	14	5.02	105.35	2.69	62.61	35.28	15.93	70.00
2261	2	16	3.06	104.86	2.25	59.66	38.71	22.75	47.00
2261	2	18	3.92	119.56	1.99	60.29	35.77	20.48	51.00
2261	2	24
2262	1	4	2.77	87.84	1.03	66.66	40.50	20.21	77.58
2262	1	6	1.59	90.72	1.19	63.48	38.34	25.38	81.32
2262	1	8	2.49	107.04	0.83	62.17	30.78	20.68	74.90
2262	1	10	6.77	83.52	1.89	62.52	37.80	25.38	79.18
2262	1	12	1.78	102.72	0.9	63.63	37.26	23.97	86.67
2262	1	14	3.33	93.6	1.76	46.56	37.80	20.68	74.37
2262	1	16	3.01	102.24	1.37	64.84	37.80	20.21	74.90
2262	1	18	2.82	104.64	2.05	60.50	35.64	15.98	68.48
2262	1	24	2.85	113.76	0.95	71.21	39.42	18.80	75.44
2264	2	4	2.21	97.47	1.36	58.20	34.68	19.08	58.41
2264	2	6	1.95	104.54	1.76	51.46	28.98	14.84	38.12
2264	2	8	1.96	114.64	1.46	53.79	28.98	19.61	46.53
2264	2	10	4.13	104.03	1.79	58.49	32.30	20.14	49.01
2264	2	12	1.07	92.92	1.42	68.53	32.78	21.20	50.00
2264	2	14	3.19	107.06	2.47	65.86	37.53	17.49	47.03
2264	2	16	2.87	102.52	2.74	54.32	29.93	16.96	34.65
2264	2	18	3.26	116.15	2.25	59.46	34.68	20.67	54.95
2264	2	24	2.21	133.32	1.6	65.04	32.78	19.61	41.09

Num	Groupe	Age	UREE	CREA	BOH	PROT	ALB	GGT	ASAT
2265	2	4	1.82	69.6	1.32	61.16	39.42	19.27	87.21
2265	2	6	1.9	78.72	1.63	60.90	37.80	19.74	78.11
2265	2	8	3.1	89.28	1.21	66.31	43.20	24.44	83.46
2265	2	10	5.72	87.84	2.38	63.68	37.26	26.32	87.21
2265	2	12	1.67	87.36	0.96	70.70	38.88	26.79	83.46
2265	2	14	3.52	77.76	2.39	62.82	37.26	19.74	70.62
2265	2	16	2.73	86.88	1.96	66.51	39.42	24.44	77.04
2265	2	18	4.38	84.48	1.44	71.61	39.96	22.56	72.23
2265	2	24	2.55	93.12	1.5	73.58	39.96	23.50	86.67