



HAL
open science

Etude hématologique, biochimique et clinique comparative de veaux issus de clonage somatique et de veaux témoins

Hedwige Issenmann

► **To cite this version:**

Hedwige Issenmann. Etude hématologique, biochimique et clinique comparative de veaux issus de clonage somatique et de veaux témoins. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 2003. Français. NNT: . tel-02830570

HAL Id: tel-02830570

<https://hal.inrae.fr/tel-02830570>

Submitted on 7 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 2003



**ETUDE HEMATOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET
CLINIQUE COMPARATIVE DE VEAUX ISSUS DE
CLONAGE SOMATIQUE ET DE VEAUX TEMOINS**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le.....

par

Hedwige ISSENMANN

Née le 27 novembre 1978 à Senlis (Oise)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : M. REMY

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

Assesseur : M. MILLEMANN

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

Invitée : Mme CHAVATTE-PALMER

Docteur vétérinaire à l'INRA

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur

Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury,

Hommage respectueux.

A Monsieur le Docteur Rémy, notre directeur de thèse,

Pour son intérêt pour notre travail,

Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Millemann, notre assesseur,

Pour ses commentaires judicieux sur notre travail,

Sincères remerciements.

A Madame Pascale Chavatte-Palmer,

Pour m'avoir fait découvrir la recherche et ses côtés passionnants, pour sa collaboration et son aide précieuse à la réalisation de cette étude,

Sincères remerciements.

REMERCIEMENTS

A Mademoiselle Fabienne Constant,

Qui a pris beaucoup de temps pour m'aider à la réalisation de l'étude statistique, mes plus sincères remerciements.

A Madame le Professeur Bénédicte Grimard,

Merci de m'avoir éclairé les statistiques, merci pour l'aide précieuse apportée.

A Monsieur Andrew Ponter,

Merci pour votre aide dans la rédaction du programme SASclone.

A Monsieur le Professeur Mialot,

Pour m'avoir aidée à trouver ce sujet de thèse, pour m'avoir encadrée dans les premiers temps, pour les encouragements apportés, mes plus sincères remerciements.

REMERCIEMENTS

A mes parents,

En témoignage de mon affection et en remerciement de l'immense soutien qu'ils m'ont toujours apporté.

A Cédric,

Qui est toujours présent à mes côtés, en témoignage de mon amour.

A Solveig et Raphaëlle,

Pour notre complicité de chaque instant, pour tous les bons moments passés ensemble et pour ceux à venir, pour le lien très fort qui nous unit.

A Gonzague, Marie, Benjamin, Gabriel et Timothée

L'irremplaçable LPFI !

A Sandrine, Laetitia et Elsa,

Amies toujours fidèles et à l'écoute

A tous mes amis d'Alfort,

Pour tout ce que nous avons partagé pendant cinq ans, merci Sophie, Dorothee, Aurélie, Ricky, Etienne, Babette, Julio, Chouchou, Julien, Nicolas, Mathieu, Eric, Brice, Gilles, Julien, Baptiste, Ludovic, Magalie, Sylve, David, Gamète, Ginou.

A mes amis de la SHEVA,

Pour leur soutien et leur amitié, pour les soirées du mercredi et toutes les autres, merci Olivier, Elisabeth, Anne-Gaëlle, Frédéric, Eliza, Charles-Félix, Muriel, Virginie, Aude, Vanessa, Diana, Anaïs.

A tous les autres que je n'ai pas pu citer, mais qui se reconnaîtront, je ne les oublie pas...

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux.....	7
Liste des figures.....	9
Liste des annexes.....	10
Liste des abréviations.....	11
Introduction.....	13
<u>Première partie : Etude bibliographique du clonage : procédés, anomalies observées et perspectives</u>	15
<u>I. Les techniques de clonage et les résultats obtenus</u>	15
<u>II. Clonage et anomalies de la gestation</u>	16
A. Pertes précoces ou tardives et anomalies placentaires.....	16
B. Durée de gestation.....	20
C. Cas particulier du syndrome du gros veau ou LOS (large offspring syndrome).....	22
<u>III. Pertes périnatales et caractéristiques cliniques des veaux obtenus</u>	22
A. Poids de naissance.....	22
B. Température rectale.....	23
C. Anomalies et problèmes observés.....	23
<u>IV. Clonage et caractéristiques hématologiques et hormonales des veaux obtenus</u>	28
A. Paramètres hématologiques.....	28
B. Paramètres hormonaux.....	28
1. Hormone de croissance et IGF (insulin-like growth factor).....	28
2. Hormones thyroïdiennes.....	30
3. Leptine.....	31
4. Cortisol.....	31
5. Insuline et glucose.....	33

<u>V. Caractéristiques de la reproduction des génisses clonées</u>	33
<u>VI. Causes potentielles des anomalies observées</u>	34
A. Procédés de culture.....	34
B. Environnement utérin altéré.....	35
C. Empreinte parentale.....	35
<u>VII. Perspectives</u>	36
A. Dissémination d'une supériorité génétique.....	36
B. Animaux en voie de disparition.....	37
C. Production d'animaux transgéniques.....	37
<u>Deuxième partie : Etude bibliographique de l'hématologie et de la biochimie du veau et évolution de ces différents paramètres avec l'âge</u>	39
<u>I. Paramètres hématologiques</u>	39
A. Lignée rouge : paramètres et variations.....	41
1. Erythrocytes.....	41
• définition et rôles.....	41
• valeurs normales chez le veau et variations avec l'âge.....	42
2. Hématocrite.....	43
• définition.....	43
• valeurs normales.....	43
3. Taux d'hémoglobine.....	43
4. Volume globulaire moyen.....	44
• définition.....	44
• valeurs normales chez le veau et variations avec l'âge.....	44
5. Thrombocytes.....	45
B. Lignée blanche : paramètres et variations.....	45
1. Les différentes cellules.....	45

• Lymphocytes.....	45
• granulocytes neutrophiles.....	46
• autres catégories cellulaires.....	46
➤ granulocytes éosinophiles	
➤ granulocytes basophiles	
➤ monocytes	
1. Numération et formule leucocytaire : variation au moment du part et avec l'âge.....	47
<u>II. Paramètres biochimiques</u>	49
A. Glycémie.....	49
B. Créatininémie.....	49
C. Urémie.....	49
D.	
Fibrinogène.....	50
<u>Troisième partie : Etude expérimentale</u>	52
<u>I. Animaux, matériels et méthodes</u>	52
A. Animaux.....	52
1. Veaux clonés.....	54
2. Veaux témoins.....	55
3. Conditions de traitement.....	55
B. Matériels et méthodes.....	55
1. Echantillons sanguins et méthodes d'analyses.....	55
2. Prises de sang.....	56
3. Analyses statistiques.....	56
<u>II. Résultats</u>	57
A. Etude clinique.....	57
1. Taux de survie.....	57
2. Poids de naissance.....	60
3. Caractéristiques cliniques des veaux obtenus.....	61
B. Etude hématologique et biochimique.....	61
1. Résultats hématologiques.....	62
a. Lignée rouge.....	62

• Hémoglobine.....	62
➤ Témoins	
➤ Clones	
➤ Comparaison clones/témoins	
• Hématocrite.....	64
➤ Témoins	
➤ Clones	
➤ Comparaison clones/témoins	
• Volume globulaire moyen.....	66
➤ Témoins	
➤ Clones	
➤ Comparaison clones/témoins	
b. Lignée blanche.....	68
• Numération lymphocytaire.....	68
➤ Témoins	
➤ Clones	
➤ Comparaison clones/témoins	
• Pourcentage de lymphocytes dans la numération leucocytaire.....	70
➤ Témoins	
➤ Clones	
➤ Comparaison clones/témoins	
• Numération des neutrophiles.....	72
➤ Témoins	
➤ Clones	
➤ Comparaison clones/témoins	
• Pourcentage de neutrophiles dans la numération leucocytaire.....	74
➤ Témoins	
➤ Clones	
➤ Comparaison clones/témoins	
• Numération monocyttaire.....	76
➤ Témoins	
➤ Clones	
➤ Comparaison clones/témoins	
• Pourcentage de monocytes dans la numération leucocytaire.....	78
➤ Témoins	
➤ Clones	
➤ Comparaison clones/témoins	
2. Résultats biochimiques.....	80
a.	
Glycémie.....	80
➤ Témoins	
➤ Clones	

➤ Comparaison clones/témoins	
b. Taux de fibrinogène.....	82
➤ Témoins	
➤ Clones	
➤ Comparaison clones/témoins	
c. Urée.....	84
d. Créatinine.....	84

III. Discussion.....86

A. La lignée rouge : interprétation des résultats.....86

1. Taux d'hémoglobine et hématocrite.....86

 ➤ Témoins

 ➤ Clones

2. Volume globulaire moyen.....88

B. La lignée blanche.....89

C. Paramètres biochimiques.....89

1. Urée et créatinine.....89

2. Glycémie.....90

3. Fibrinogène.....90

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> :	Développement in vivo après transfert d'embryons clonés à partir de cellules somatiques (d'après CHAVATTE-PALMER <i>et al.</i> , 2000 ; résultats de HEYMAN <i>et al.</i> , 1999).....	17
<u>Tableau 2</u> :	Développement in vivo après transfert d'embryons bovins clonés (d'après HEYMAN <i>et al.</i> , 2000).....	19
<u>Tableau 3</u> :	Anomalies placentaires observées au cours des gestations de clones par divers auteurs.....	20
<u>Tableau 4</u> :	Durée de gestation et poids de naissance d'embryons clonés, issus de FIV et d'IA nés dans la ferme expérimentale de l'INRA (d'après CHAVATTE-PALMER <i>et al.</i> , 2000).....	21
<u>Tableau 5</u> :	Caractéristiques cliniques observées chez des veaux clonés dans divers études	27
<u>Tableau 6</u> :	Veau : valeurs normales d'hématologie (référence interne INRA).....	39
<u>Tableau 7</u> :	Valeurs hématologiques normales des bovins adultes (d'après JAIN, 1993)...	40
<u>Tableau 8</u> :	Formule leucocytaire chez le veau (d'après MORNET et ESPINASSE, 1977)	48
<u>Tableau 9</u> :	Répartition des veaux de cette étude selon leur catégorie et leur survie à un an	53
<u>Tableau 10</u> :	Origine des embryons clonés ayant donné les veaux de cette étude.....	54
<u>Tableau 11</u> :	Taux de survie des clones nés en 2001 et 2002.....	57
<u>Tableau 12</u> :	Anomalies cliniques et résultats d'autopsie des clones morts en 2001 et 2002	59
<u>Tableau 13</u> :	Poids de naissance moyen et erreur standard chez 35 clones et 15 témoins	61
<u>Tableau 14</u> :	Taux d'hémoglobine moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	63
<u>Tableau 15</u> :	Hématocrite moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	65
<u>Tableau 16</u> :	Volume Globulaire Moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	67

<u>Tableau 17</u> :	Numération lymphocytaire moyenne et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	69
<u>Tableau 18</u> :	Pourcentage de lymphocytes moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	71
<u>Tableau 19</u> :	Numération moyenne des neutrophiles et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	73
<u>Tableau 20</u> :	Pourcentage moyen des neutrophiles et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	75
<u>Tableau 21</u> :	Numération monocyttaire moyenne et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	77
<u>Tableau 22</u> :	Pourcentage moyen de monocytes et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	79
<u>Tableau 23</u> :	Glycémie moyenne et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	81
<u>Tableau 24</u> :	Taux de fibrinogène moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	83
<u>Tableau 25</u> :	Taux d'urée moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins à J1.....	84
<u>Tableau 26</u> :	Taux de créatinine moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins à J1.....	84
<u>Tableau 27</u> :	Moyenne et erreur standard pour différents paramètres chez 23 clones et 12 témoins.....	85

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> :	Taux de survie des clones nés en 2001 et 2002.....	58
<u>Figure 2</u> :	Répartition du poids de naissance de 35 clones et 15 témoins.....	60
<u>Figure 3</u> :	Taux d'hémoglobine moyen chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps	63
<u>Figure 4</u> :	Hématocrite moyen chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	65
<u>Figure 5</u> :	Volume Globulaire Moyen chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps	67
<u>Figure 6</u> :	Numération lymphocytaire moyenne chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	69
<u>Figure 7</u> :	Pourcentage de lymphocytes moyen chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	71
<u>Figure 8</u> :	Numération moyenne des neutrophiles chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	73
<u>Figure 9</u> :	Pourcentage moyen de neutrophiles chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	75
<u>Figure 10</u> :	Numération monocyttaire moyenne chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	77
<u>Figure 11</u> :	Pourcentage moyen de monocytes chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	79
<u>Figure 12</u> :	Glycémie moyenne chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps.....	81
<u>Figure 13</u> :	Taux de fibrinogène moyen chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps	83

LISTE DES ANNEXES

<u>Annexe 1 :</u>	Inventaire des veaux de l'étude.....	103
<u>Annexe 2 :</u>	Poids de naissance des veaux de l'étude.....	105
<u>Annexe 3 :</u>	Paramètres hématologiques des veaux de l'étude pour la lignée rouge.....	107
<u>Annexe 4 :</u>	Paramètres hématologiques des veaux de l'étude pour la lignée blanche.....	115
<u>Annexe 5 :</u>	Paramètres biochimiques des veaux de l'étude.....	123

Liste des abréviations

ACTH = Adreno Cortico Tropic Hormone
ADN = Acide désoxyribonucléique
ALT = Alanine aminotransférase
ARN = Acide ribonucléique
AST = Aspartate aminotransférase
CFU-E = Colony Forming Unit-Erythroïde
CFU-S = Colony Forming Unit-Spleen
CIF = Colony Inhibitory Factor
EDTA = EthylèneDiamineTétraAcétate
FIV = Fécondation In Vitro
FSH = Follicular Stimulating Hormone
GH = Growth Hormone
GHRH = Growth Hormone Releasing Hormone
Ht = Hématocrite
IA = Insémination Artificielle
Ig = Immunoglobuline
IGF = Insulin-Like Growth Factor
IGFBP = Insulin-Like Growth Factor Binding Protein
INRA = Institut National de Recherche Agronomique
J = Jours
LH = Luteinizing Hormone
LOS = Large Offspring Syndrome
MS = Matière Sèche
NG = Numération Globulaire
SAS = Statistic Analysis System
SRIF = Somatotropin Release-Inhibiting Factor
T3 = Triiodothyronine
T4 = Thyroxine
TSH = Thyroid Stimulating Hormone
vs = versus

INTRODUCTION

Depuis le début du vingtième siècle, de grands progrès ont été faits dans le domaine de la reproduction assistée pour les différentes espèces animales. Pour le bétail, cela a commencé avec les premiers veaux nés après insémination artificielle au début du siècle. L'étape suivante a été la superovulation et le transfert embryonnaire au début des années 70, suivis par la culture et la fécondation *in vitro* en 1987. La naissance du premier clone somatique dans l'espèce ovine a eu un retentissement considérable : Dolly est née en 1997, clonée à partir d'une cellule de glande mammaire (WILMUT *et al.*, 1997).

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 nucléaire. Il s'agit de fusionner le noyau d'une cellule donneuse avec un ovocyte receveur énucléé. Cette cellule donneuse peut être une cellule embryonnaire ou une cellule somatique, fœtale ou adulte, comme dans le cas de Dolly.

Depuis Dolly, de nombreux clones ont été produits dans différentes espèces et à partir de cellules différentes. Cependant, une caractéristique frappante du transfert nucléaire est la forte fréquence de mortalité embryonnaire au cours de la gestation, conduisant à des taux d'avortement élevés. Ceci empêche le clonage d'être compétitif à l'heure actuelle avec les autres méthodes de reproduction assistée. De plus, de nombreuses anomalies congénitales frappent les clones et sont responsables d'une mortalité néonatale importante. De nombreux auteurs ont tenté de comprendre l'origine de ces problèmes et ont étudié le déroulement des gestations de clones, ainsi que les individus clonés obtenus, sur le plan clinique, hormonal ou biochimique.

Dans la première partie de cette étude, nous ferons un bilan de ce qui a été décrit dans la littérature chez les clones pour les problèmes de gestation et d'avortement, les anomalies cliniques et congénitales, la mortalité néonatale, ainsi que les dosages sanguins (hormones, biochimie) déjà réalisés chez les clones pour tenter de trouver une explication. Dans la seconde partie, nous rappellerons quelles sont les valeurs publiées dans la littérature pour l'hématologie et la biochimie du veau, ainsi que leur évolution avec l'âge. Ensuite, nous présenterons nos propres résultats.

Ce travail a été réalisé à partir de 50 animaux dans la ferme expérimentale de l'Institut National de Recherche Agronomique, à Bressonvilliers, dans l'Essonne, dans le but d'avoir une estimation de la normalité des animaux obtenus par clonage. C'est une étude rétrospective qui porte sur des données recueillies sur une période de trois années (2001, 2002, 2003).

Il se propose tout d'abord de préciser la numération et la formule sanguine, ainsi que les valeurs de différents paramètres biochimiques chez des veaux issus d'insémination artificielle. Ensuite, l'étude se porte sur des veaux obtenus par clonage somatique (fœtal ou adulte). Nous comparons les résultats collectés chez les veaux issus d'IA à ceux obtenus chez

les clones, dans le but de déterminer s'il existe des différences entre les 2 groupes. Nous nous limitons à une période de 63 jours après la naissance, car c'est la période où le risque d'anomalies est maximal. Une étude clinique compare également les 2 groupes pour le taux de mortalité, le poids de naissance et les caractéristiques cliniques et anomalies rencontrées.

Les paramètres hématologiques considérés sont, pour la lignée rouge, le taux d'hémoglobine, l'hématocrite et le volume globulaire moyen, et pour la lignée blanche, le nombre de lymphocytes, le nombre de neutrophiles et le nombre de monocytes, ainsi que leur pourcentage respectif dans la formule leucocytaire. Les paramètres biochimiques considérés sont la glycémie, l'urémie, la créatininémie et le taux de fibrinogène.

Enfin, nous discutons les résultats obtenus et leur intérêt au regard de ce qui a déjà été écrit sur le sujet.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DU CLONAGE : PROCEDES, ANOMALIES OBSERVEES ET PERSPECTIVES

I. Les techniques de clonage et les résultats obtenus

L'objectif du clonage est d'obtenir des animaux génétiquement identiques. Pour ce faire, la technique de transfert nucléaire est la plus utilisée. Il s'agit de fusionner une cellule embryonnaire ou somatique (fœtale ou adulte) avec un ovocyte receveur énucléé.

La réalisation du clonage est délicate, car elle implique la succession d'une série de manipulations dont la réussite permet le succès final (ECTORS *et al.*, 1997). Les différentes manipulations comprennent successivement : la maturation de l'ovocyte, son énucléation, l'injection du blastomère de l'embryon donneur (clonage embryonnaire) ou de la cellule différenciée donneuse (clonage somatique) dans l'espace périvitellin suivie de son incorporation dans le cytoplasme ovocytaire, l'activation de ce dernier et enfin la coculture des embryons reconstitués.

Il faut ensuite transférer les embryons dans des vaches receveuses indemnes de toute maladie infectieuse. Les receveuses qui sont synchronisées à 24 heures près avec l'âge de l'embryon et qui possèdent un corps jaune palpable sont sélectionnées.

Les ovocytes immatures utilisés sont obtenus par ponction d'ovaires récoltés en général aux abattoirs.

Les cellules donneuses de noyau peuvent être aussi diverses que des cellules embryonnaires, des cellules fœtales ou adultes de cumulus, d'oviducte, d'utérus, de testicules, de peau, d'oreille, de foie... (KATO *et al.*, 2000)

Cependant, les taux de réussite du clonage semblent varier selon le type de cellules utilisées. Ainsi, les cellules du cumulus ou de l'oviducte sont celles qui donnent les meilleurs résultats (KATO *et al.*, 1998 et 2000).

FORSBERG *et al.* (2002) ont obtenu des taux de gestation de 62% et des taux de vêlage de 15% en utilisant des cellules adultes du cumulus, ce qui est bien supérieur aux taux obtenus avec des cellules adultes d'oreille (34% de gestation et 5% de vêlages) ou même des cellules fœtales (48% de gestation et 9% de vêlages) (FORSBERG *et al.*, 2002).

WELLS *et al.* (1999) ont utilisé des cellules murales de la granulosa. L'avantage de ces cellules est qu'elles sont moins différenciées que les cellules de peau et donc qu'elles fonctionnent mieux. De plus, elles peuvent être récoltées par des méthodes non invasives - ovum pick-up - contrairement aux cellules de peau, qui nécessitent des biopsies. Enfin, ces dernières sont soumises aux radiations ultra-violettes, ce qui peut causer des dommages à l'ADN.

La réussite du clonage dépend, entre autres, du choix de la cellule donneuse. Ainsi, le transfert nucléaire bovin utilisant des cellules donneuses différenciées (clonage somatique) entraîne plus de pertes fœtales que le clonage embryonnaire (cellules donneuses provenant d'un embryon). De même, les pertes sont plus importantes avec le clonage somatique à partir de cellules adultes que lorsqu'on utilise des cellules fœtales.

Dans une étude de HEYMAN *et al.* (1999), la proportion de pertes fœtales après 35 jours de gestation était de 43% (3 sur 7) et de 78,5% (22 sur 28) chez les clones respectivement d'origine fœtale et adulte, alors qu'elle n'était que de 36,4% pour le clonage embryonnaire.

II. Clonage et anomalies de la gestation

Le clonage est associé à de nombreuses pertes au cours de la gestation. On parle de pertes précoces pour des avortements ayant lieu au cours des trois premiers mois de gestation, et de pertes tardives pour des pertes survenant après 90 jours. Dans la littérature, des gestations pathologiques de clones sont décrites depuis le début des techniques de transfert nucléaire jusqu'à aujourd'hui encore.

Les avortements sont souvent dus à des anomalies placentaires, avec présence d'enveloppes oedémateuses.

A. Pertes précoces ou tardives et anomalies placentaires

Dès 1997, KRUIP et DEN DAAS ont remarqué des anomalies au cours des gestations de clones. Dans leur étude, ils ont noté une fréquence plus élevée d'hydroallantoïdes chez les veaux obtenus par fécondation *in vitro* comme chez ceux obtenus par transfert nucléaire, entraînant une augmentation du nombre d'avortements et de pertes périnatales.

En 1998, CIBELLI *et al.* ont rencontré d'autres anomalies en produisant des veaux à partir de fibroblastes fœtaux. Vingt huit blastocystes ont été transférés à 11 receveuses; 6 vaches ont été diagnostiquées pleines par échographie à J40 (55%), 5 à J60 (45%) et une a avorté à J249. Au final, 4 gestations ont été menées à terme et ont donné 4 veaux, dont un est mort à 5 jours d'hypertension pulmonaire. Le fœtus avorté à J249 était de grande taille (54 kg à huit mois de gestation), possédait des vaisseaux ombilicaux deux fois plus gros que la normale, des poumons oedémateux et un ventricule cardiaque droit augmenté de taille; le placenta était oedémateux avec de gros placentomes et un hydroallantoïde.

HEYMAN *et al.* (1999) ont également étudié les anomalies de la gestation associées au clonage. Chez la vache, la majorité des pertes sont observées pendant le premier tiers de gestation. A 90 jours, les pertes pour des embryons clonés à partir de cellules somatiques fœtales étaient de 80,7 % (pertes totales: 87,1 %), et celles pour des embryons clonés à partir de cellules somatiques adultes de 85,9 % (pertes totales: 92,9 %). Pour le groupe témoin obtenu par FIV, les pertes à 90 jours étaient de 56,4 % (tableau 1).

De plus, on note que les pertes sont plus importantes en utilisant des cellules donneuses adultes par rapport au clonage de cellules fœtales.

Une hypothèse pour expliquer ces pertes précoces serait une vascularisation placentaire anormale, avec peu ou pas de placentomes. Ceci entraînerait un développement fœtal anormal à l'origine de la mort du fœtus. L'expression et la régulation des gènes contrôlant le développement des vaisseaux placentaires restent à étudier.

TABLEAU 1 : Développement *in vivo* après transfert d'embryons clonés à partir de cellules somatiques, d'après CHAVATTE-PALMER *et al.* (2000), résultats de HEYMAN *et al.* (1999)

	Embryons clonés : origine des cellules donneuses			Groupe contrôle (FIV)
	<i>foetale</i>	<i>adulte</i>	<i>total</i>	
Nombre de receveuses	31	85	116	39
Dosage de progestérone à J21	17 (54.8%)	42 (49.4%)	59 (50.8%)	24 (61.5%)
Diagnostic de gestation à J35	7 (22.6%)	28 (32.9%)	35 (30.2%)	20 (51.3%)
à J50	6 (19.3%)	24 (28.2%)	30 (25.8%)	18 (46.1%)
à J70	6 (19.3%)	14 (16.5%)	20 (17.2%)	17 (43.6%)
à J90	6 (19.3%)	12 (14.1%)	18 (15.5%)	17 (43.6%)
Avortement tardif	2	3	5	-
Abattage après détection d'une anomalie de développement	-	3	3	-
Naissance	4 (12.9%)	6 (7.1%)	10 (8.6%)	17 (43.6%)

DE SOUSA *et al.* (2000) ont comparé la morphologie de fœtus ovins issus d'insémination artificielle (n=9), de FIV (n=17) ou de clonage (n=7 et n=8 car deux lignées de fibroblastes ont été utilisées), à 35 jours de gestation. Tous les fœtus obtenus par IA étaient normaux, 15 des 17 fœtus issus de FIV étaient normaux, tandis que seulement 3 sur 7 et 2 sur 8 des fœtus clonés étaient normaux, les autres ayant un développement retardé. De nombreux clones avaient une hypoplasie des enveloppes fœtales. Ainsi, selon les auteurs, il y a eu une grande incidence de retard de développement chez les fœtus clonés et une déficience de placentation.

HILL *et al.* (2000) ont également rapporté l'existence d'anomalies placentaires chez les fœtus clonés à partir de cellules somatiques. Ces anomalies seraient responsables de pertes importantes, majoritairement pendant le premier tiers de gestation. Presque 50% des fœtus clonés ont été perdus entre 30 et 90 jours de gestation, contre 2 à 4% pour une gestation normale.

Pour prouver cela, les auteurs ont étudié par échographie le taux de survie de 40 fœtus clonés. A J40, 40% des fœtus étaient morts et à J60, seulement 28% des 40 fœtus étaient encore vivants.

Deux vaches receveuses ont été abattues en vue de récupérer le placenta. Les placentomes étaient petits et sous-développés, la vascularisation du placenta était réduite. De même, l'épaisseur de l'épithélium chorio-allantoïdien était diminuée, ainsi que sa cellularité et le nombre de capillaires.

Des veaux clonés obtenus à partir de cellules somatiques de bovins adultes, nouveau-nés ou de fœtus ont été étudiés par KATO *et al.* (2000). Ils ont utilisé des cellules d'oviducte, de cumulus ou d'utérus, des cellules de testicules et des cellules de peau, d'oreille ou de foie, mâles ou femelles. Cent soixante douze blastomères ont été transférés dans 134 receveuses. 50 vaches ont été diagnostiquées pleines, puis le pourcentage d'avortement était de 30% à J100, 42% à J150 et 54% à J250. Le pourcentage de veaux obtenus était de 48% si on se base sur le nombre de vaches qui ont été diagnostiquées pleines, il n'était que de 14 % si on se base sur le nombre d'embryons transférés.

De même, PACE *et al.* (2002) ont transféré 2170 embryons provenant de clonage somatique fœtal ou adulte à des génisses Holstein. Le taux d'avortement était de 75,1%. A 90 jours, ce taux était déjà de 69,5 %; la majorité des pertes ont eu lieu au cours du premier tiers de gestation. On note que la croissance fœtale était la même qu'il y ait avortement ou non; il n'y a pas eu de baisse progressive de la croissance, mais arrêt brutal et avortement.

Les auteurs ont estimé que les pertes fœtales pour les embryons clonés semblaient être 3 à 12 fois plus importantes que pour des fœtus non clonés.

CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002) ont également observé des gestations pathologiques : hydroallantoïde, cotylédons oedémateux, placentomes moins nombreux mais plus lourds que la normale, ascite et oedème à des degrés divers, accumulation de gras autour des organes abdominaux. Ils ont aussi observé deux clones avec des reins anormaux et un avec un gros foie stéatosé.

Les avortements peuvent également survenir plus tard qu'au premier trimestre de gestation, ce qui est rare habituellement dans des conditions naturelles de reproduction. HEYMAN *et al.* (2002) se sont intéressés à ces pertes tardives, qui ont un impact économique encore plus grand.

Ainsi, les pertes survenant entre J90 et le vêlage étaient de 43,7% pour des embryons obtenus par clonage somatique adulte (n=133, groupe 1), 33,3% pour des clones somatiques fœtaux (n=40, groupe 2), 4,3% pour des clones obtenus à partir de cellules embryonnaires (n=67, groupe 3), et 0% pour des embryons issus de fécondation *in vitro* (n=51, groupe 4). Pour ces 4 groupes, les taux initiaux de gestation étaient dans les mêmes valeurs (55,6-62,7%), mais leur évolution a été bien différente. A J35, les taux de gestation étaient significativement plus bas dans les groupes 1 et 2 que dans le groupe 4. Et à J50 et J90, les taux de gestation étaient significativement plus bas dans les groupes 1 et 2 que dans les groupes 3 et 4 (tableau 2).

Sur 21 vaches receveuses de clones somatiques, 5 cas de gestation anormale tardive ont été détectés par échographie. Après abattage, l'autopsie a révélé des hydroallantoïdes sévères avec des placentomes plus lourds que la normale. De plus, sur 5 cas, 3 fœtus présentaient le syndrome du gros veau (excès de taille par rapport au stade de gestation) et un était complètement hydropique.

TABLEAU 2 : Développement *in vivo* après transfert d'embryons bovins clonés, d'après HEYMAN *et al.* (2002)

	groupe 1 : somatique adulte	groupe 2 : somatique fœtal	groupe 3 : embryonnaire	groupe 4 : témoins FIV
Nombre de receveuses	133	40	67	51
Supposées pleines à J21	74/133 55.6%	23/40 57.5%	42/67 62.6%	32/51 62.7%
Confirmées pleines à J35	45/133 33.8%	11/40 27.5%	33/67 49.2%	27/51 52.9%
Pleines à J50	36/133 27.1%	9/40 22.5%	28/67 41.8%	26/51 50.9%
Pleines à J70	19/133 14.3%	9/40 22.5%	25/67 37.3%	25/51 49.0%
Pleines à J90	16/133 12.0%	9/40 22.5%	23/67 34.3%	24/51 47.0%
Nombres de veaux nés	9/133 6.8%	6/40 15.0%	23/67 34.3%	25/51 49.0%

Une étude récente de LEE *et al.* (2003) s'intéressait aux anomalies placentaires des gestations de clones. Les auteurs ont étudié le développement fœtal et placentaire à J50, quand le placenta est en formation, à J100, quand la placentation est complète, et à J150, quand le syndrome d'hydropisie des enveloppes fœtales commence fréquemment à se développer, chez des veaux clonés, des veaux produits par FIV et des veaux issus d'IA. Ils ont noté que le nombre de placentomes étaient significativement plus faibles chez les clones. A J150, seuls les clones avec un nombre normal de placentomes avaient survécu. Le poids du placenta était plus élevé chez les clones, indiquant que cet excès de poids était dû à une croissance excessive des tissus utérins.

A J100, les fœtus clonés montraient des signes de dérégulation de croissance, et à J150, ils étaient plus lourds que les témoins. Un excès de poids du placenta, du foie et des reins accompagnait le syndrome d'hydropisie des enveloppes à J150.

Le tableau 3 résume les principales anomalies placentaires rencontrées par divers auteurs au cours des gestations de clones.

TABLEAU 3 : Anomalies placentaires observées au cours des gestations de clones par divers auteurs.

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), 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> (2000), 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)

B. Durée de gestation

KRUIP et DEN DAAS (1997) ont observé que les veaux produits par FIV ou par transfert nucléaire avaient une durée de gestation significativement plus longue que les témoins, avec des poids de naissance plus élevés et une plus grande incidence de dystocies et de pertes périnatales.

CHAVATTE-PALMER *et al.* (2000) n'ont pas trouvé les mêmes résultats en comparant la durée de gestation de veaux issus de clonage somatique (groupe 1), de clonage embryonnaire (groupe 2), de FIV (groupe 3) ou d'IA (groupe 4). La durée de gestation n'était

pas statistiquement différente entre les quatre groupes. Sa moyenne était de 277,1 jours pour le groupe 1, 281,9 jours pour le groupe 2, 285,8 jours pour le groupe 3 et 279,8 jours pour le groupe 4 (tableau 4).

TABLEAU 4 : Durée de gestation et poids de naissance d'embryons clonés, issus de FIV et d'IA nés dans la ferme expérimentale de l'INRA, d'après CHAVATTE-PALMER *et al.* (2000)

Groupe	Nombre de vêlages	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane	Ecart-type	Erreur standard
A. Durée de gestation (jours)							
Clonage somatique	12	265	283	277.1	279	5.71	1.65
Clonage embryonnaire	32	266	292	281.9	281	4.84	0.85
FIV	16	276	295	285.8	285	4.73	1.18
IA	72	255	289	279.8	280	5.11	0.60
B. Poids de naissance (kg)							
Clonage somatique	12	37	61	51.5	51.8	6.58	1.90
Clonage embryonnaire	32	33	65	44.4	42.5	7.70	1.36
FIV	16	39	60	47.0	44.5	6.17	1.54
IA	72	31	55	41.0	40.0	4.90	0.57

Cependant, ces données n'ont qu'une valeur limitée pour les clones somatiques car la mise-bas est artificiellement contrôlée (césariennes à terme après maturation fœtale par injection de dexaméthasone). En effet, les dystocies dues principalement à un excès de taille sont une caractéristique générale des gestations de clones. Cela peut être en partie évité par l'induction du vêlage à terme ou par la pratique de césariennes de convenance.

Pour les gestations de clones, les signaux de préparation au vêlage et le développement de la mamelle étaient à peine visibles (HILL *et al.*, 1999 ; WELLS *et al.*, 1999 ; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002).

C. Cas particulier du syndrome du gros veau ou LOS (large offspring syndrome)

En fin de gestation, un syndrome distinct, appelé le syndrome du gros veau ou large offspring syndrome (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 fécondation in vitro.

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 syndrome du gros veau 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 les reins et le cœur et plus petit pour les poumons et la rate. On avait donc une croissance asynchrone des organes.

HEYMAN *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 en 1997 : 14,4% des veaux produits par FIV pesaient 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.

III. Pertes périnatales et caractéristiques cliniques des veaux obtenus

A. Poids de naissance

Le poids moyen des fœtus et des veaux issus de clonage somatique est statistiquement supérieur à celui des clones dérivés de cellules embryonnaires et des veaux issus de FIV et d'insémination artificielle. Il n'existe pas de différence significative entre ces trois derniers groupes. (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2000) (tableau 4).

CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002) ont également étudié le poids de naissance de clones somatiques : il était significativement plus grand pour les clones que pour les veaux issus d'IA ou de FIV (pas de différence entre ces deux groupes).

Presque toutes les publications faites jusque là sur la production de veaux issus de transfert nucléaire ont rapporté des poids de naissance supérieurs à la normale pour la race (WILSON *et al.*, 1995 ; GARRY *et al.*, 1996 et 1998 ; KRUIP et DEN DAAS, 1997 ;

YOUNG *et al.*, 1998 ; WELLS *et al.*, 1999 ; KATO *et al.*, 2000 ; KUBOTA *et al.*, 2000 ; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2000 et 2002 ; HEYMAN *et al.*, 2002 ; PACE *et al.*, 2002).

B. Température rectale

Dans une étude de GARRY *et al.* (1996), sur 40 veaux obtenus par clonage embryonnaire, 15 présentaient une hypothermie à la naissance malgré un réchauffement à l'aide de serviettes chaudes. Les mêmes auteurs en 1998 ont aussi obtenu des veaux qui étaient en hypothermie.

Dans une étude de CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002), la température rectale de 10 clones somatiques et de 10 témoins a été prise régulièrement. La température moyenne des clones était significativement plus haute que celle des témoins, pendant la première semaine après la naissance et jusqu'à 50 jours. Des pics d'hyperthermie atteignant 41°C étaient fréquents chez les clones, et sans relation avec la température extérieure. Ils ne s'accompagnaient d'aucun signe clinique et ne répondaient pas aux traitements anti-inflammatoires. Par contre, les veaux étaient souvent en hypothermie à la naissance, comme cela a déjà été décrit dans des études précédentes (GARRY *et al.*, 1996 et 1998).

Cependant, WELLS *et al.* (1999) et de nombreuses autres publications n'ont pas mentionné d'anomalies de la température rectale des clones.

C. Anomalies et problèmes observés

De nombreuses anomalies sont décrites chez les veaux obtenus par transfert nucléaire. Certaines d'entre elles sont la cause d'une mortalité néonatale importante. Nous décrirons les anomalies les plus souvent rencontrées, observées par différents auteurs depuis 1996.

GARRY *et al.* (1996) ont étudié les caractéristiques postnatales de 40 veaux Brangus produits par clonage embryonnaire. Dans l'ensemble, les veaux n'ont pas présenté un comportement normal, mais étaient mous et faibles. De nombreux veaux ont mis du temps à se lever. La plupart n'avait pas un réflexe de succion normal : 9 veaux ont dû être intubés pour boire le colostrum, puis 3 groupes se sont constitués : 6 veaux ont tété sans hésiter, 24 veaux avaient un réflexe de succion faible au départ mais ont tété normalement au bout de 12 heures après assistance, 10 veaux sont restés anorexiques et ont été sondés pendant 12 à 72 heures.

De plus, 7 veaux ont présenté des anomalies des membres, ce qui n'est pas rare lorsque les fœtus sont gros. Cependant, un seul veau a dû être traité pour pouvoir se déplacer normalement.

Trente quatre veaux sur 40 ont reçu un traitement médical allant de la simple antibiothérapie à la réanimation. 12 veaux de 4 jours à 6 semaines ont présenté une ou plusieurs des maladies suivantes : infection ombilicale (n=5), diarrhée (n=4), pneumonie (n=5), déformation des membres (n=1), septicémie (n=2). Comme nous l'avons signalé précédemment, ces affections existent aussi chez des veaux non clonés, mais semblent être plus fréquentes chez les clones.

Huit veaux sont morts, dont un seul dans la période postnatale immédiate (à 29 heures). Sur les huit, six sont morts ou ont dû être euthanasiés à cause de processus infectieux, mais aucune anomalie congénitale n'a été trouvée à l'autopsie.

Une étude publiée par HILL *et al.* (1999) donne des détails minutieux sur l'évolution clinique de huit veaux vivants issus de clonage somatique fœtal.

Le veau 1 présentait un syndrome sévère de détresse respiratoire avec déficience de surfactant, hypertension pulmonaire et cardiopathie droite avec dilatation ventriculaire. Il est mort au bout de 4 jours malgré des soins intensifs : intubation et ventilation à l'oxygène, administration de surfactant.

Les 7 veaux suivants ont donc été traités agressivement dès la naissance, pour minimiser les effets d'une possible hypertension pulmonaire : assistance respiratoire, suivi des gaz du sang.

Quatre veaux ont été considérés comme normaux 2 heures après la naissance, tandis que les trois autres ont nécessité un traitement plus poussé.

L'un d'eux a été traité pour une « pneumonie » et une laxité des tendons fléchisseurs. Un autre a nécessité une assistance respiratoire pendant 24 heures et l'administration de surfactant, pour corriger une hypoxie et une hypercapnie. Le dernier, enfin, a été ventilé comme les autres et traité pour une « pneumonie »; il est mort à 6 semaines avec des signes de détresse respiratoire. L'autopsie a suggéré une cardiomyopathie dilatée, bien que les échantillons fournis pour l'examen aient été insuffisants pour établir un diagnostic de certitude.

Dans cette étude, les 2 veaux qui sont morts avaient un placenta oedémateux. De même, sur les 5 fœtus également étudiés ici, 4 avaient un placenta anormal.

La présence de vaisseaux ombilicaux hypertrophiés nécessitant la résection chirurgicale de l'ombilic pour prévenir les risques d'infection et de hernie était également fréquente, et associée aux anomalies placentaires (ici 2 veaux sur 8).

Au bilan, les veaux et les fœtus présentaient fréquemment des anomalies placentaires et des maladies cardiovasculaires avec hypertension pulmonaire. Plusieurs explications sont possibles. L'œdème du placenta souvent décrit pourrait inhiber les échanges d'oxygène avec la mère et causer une hypoxie chez le fœtus. Une hypertension placentaire pourrait être à l'origine d'une hypertrophie du cœur droit ou gauche du fœtus. Le schéma inverse est possible : un dysfonctionnement cardiaque chez le fœtus pourrait entraîner une élévation de la pression veineuse systémique qui provoquerait, par congestion passive, un œdème du placenta.

Les anomalies congénitales prédominent dans cette étude ; ceci est donc bien différent des résultats de GARRY *et al.* (1996), où les clones souffraient plutôt de processus infectieux, mais où aucune anomalie congénitale n'a été décelée à l'autopsie. Cependant, l'étude porte ici sur des clones somatiques fœtaux, tandis que GARRY *et al.* (1996) s'intéressaient à des clones embryonnaires, ce qui peut expliquer certaines différences. En effet, nous avons vu (cf A.) que le clonage somatique était plus délicat. D'après CHAVATTE-PALMER *et al.* (2000), le clonage somatique entraîne plus d'anomalies que le clonage embryonnaire.

Plusieurs veaux clonés ont montré un profil pathologique similaire à celui décrit par HILL *et al.* (1999) : hyperventilation, tachycardie, placenta anormal...(CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2000).

Cependant, il faut noter que les problèmes de détresse respiratoire à la naissance liés à l'anoxie ne sont pas l'apanage des veaux clonés, mais existent aussi chez des veaux "normaux" obtenus par insémination artificielle.

Lors de césarienne, l'anoxie est plus fréquente que lors de vêlage naturel, car le veau attend plus longtemps en général avant sa sortie; de plus, la pression sur la cage thoracique est moins importante que lors de vêlage naturel par le vagin, or cette pression stimule le déclenchement des mouvements respiratoires et facilite l'élimination des liquides fœtaux des voies aériennes. Les veaux clonés naissent presque tous par césarienne, comme nous l'avons signalé; cela pourrait entraîner chez eux plus de problèmes d'anoxie. Dans l'étude de HILL *et al.* (1999), 2 veaux sur 8 sont nés par les voies naturelles; ces 2 veaux font partie des veaux "normaux", qui n'ont pas présenté de pathologie particulière.

De même, des anomalies telles qu'une laxité des tendons existent chez d'autres veaux dans les conditions naturelles.

Par contre, les problèmes d'anomalies placentaires sont beaucoup plus fréquents chez les veaux clonés, et reviennent régulièrement dans les différentes études.

Un grand éventail d'autres anomalies a été décrit chez les clones.

Le cas particulier d'une aplasie thymique diagnostiquée chez un clone somatique a été détaillé par RENARD *et al.* (1999). Ce veau a d'abord eu une croissance normale, mais il est mort à 7 semaines d'une anémie sévère.

L'autopsie n'a révélé aucune malformation ou anomalie, si ce n'est une atrophie thymique marquée. L'examen histologique a mis en évidence une aplasie lymphoïde; le thymus, la rate et les nœuds lymphatiques étaient hypoplasiques.

L'anomalie était directement liée à la procédure de clonage, puisque les clones embryonnaires identiques du veau, cultivés dans les mêmes conditions et dont l'un a donné la cellule donneuse pour le premier, étaient normaux.

KATO *et al.* (2000) ont obtenu 24 veaux vivants après clonage somatique. L'un est mort à 19 jours de septicémie colibacillaire. Six veaux sont morts à la naissance ou quelques jours après à cause d'anomalies du rein, des membres ou du cou. Deux autres veaux ont également montré des déformations : membres tordus, face déformée. Cependant, dans ces deux derniers cas, des anticorps contre le virus Akabane ont été retrouvés dans le sérum des veaux. Ce virus est connu pour entraîner des anomalies telles que l'arthrogrypose, et c'est probablement lui le responsable ici.

PACE *et al.* (2002) ont obtenu 106 veaux vivants à partir du clonage de cellules somatiques adultes ou fœtales. Vingt-quatre de ces veaux sont morts ou ont été euthanasiés entre 1 et 328 jours après la naissance. Les maladies mises en cause étaient très variées : diarrhée (n=1), intussusception intestinale (n=1), anomalie cardiaque congénitale (n=1), hydrocéphalie (n=1), anomalies des membres (n=2), anomalies placentaires (n=5), pneumonie (n=2), poumons immatures (n=2), infection clostridienne (n=1), ulcères de caillette (n=2), traumatisme musculo-squelettique (n=1), pyélonéphrite (n=1), dysfonctionnement multiple (n=3)...

Malgré de nombreux cas d'anomalies cliniques, des clones normaux ont déjà été obtenus dans différents laboratoires. D'après divers auteurs, les clones qui ne présentent pas d'anomalies ou de problèmes à la naissance sont ensuite normaux et grandissent normalement (PACE *et al.*, 2002).

LANZA *et al.* (2001) ont obtenu des veaux par clonage. Le taux d'avortement était de 73%, et 30 clones sont nés. Six sont morts juste après la naissance de problèmes cardio-pulmonaires dus à des déficiences de placentation. Vingt-quatre ont survécu et se sont révélés normaux sur les plans clinique, hématologique et immunologique, par rapport aux normes de l'espèce. D'après les auteurs, les veaux clonés peuvent donc être tout à fait normaux et en bonne santé.

Le tableau 5 résume les caractéristiques cliniques et les anomalies observées chez des veaux clonés par divers auteurs. Les anomalies placentaires ne sont pas prises en compte ; elles sont déjà résumées dans le tableau 3 (voir supra).

TABLEAU 5 : Caractéristiques cliniques observées chez des veaux clonés dans diverses études.

Caractéristiques cliniques rencontrées et anomalies chez les clones	Nombre de veaux clonés de l'étude	Références
veaux mous, réflexe de succion diminué voire absent, hypothermie, déformation des membres, infection ombilicale, diarrhée, "pneumonie", septicémie	40	GARRY (1996)
anomalies cardiaques, anomalies des membres et des tendons, dysplasie cérébrale, organes de grande taille	2 études : n=126 et n=45	KRUIP et DEN DAAS (1997)
acidose respiratoire et métabolique, hypoxémie, hypothermie, absence de réflexe de tétée, difficultés à se lever après la naissance	4	GARRY <i>et al.</i> (1998)
hypoxie, hypercapnie, acidose, déficience en surfactant, hypertension pulmonaire, pression veineuse élevée, vaisseaux ombilicaux hypertrophiés, "pneumonie", hyperthermie, laxité des tendons	8	HILL <i>et al.</i> (1999)
hypoplasie lymphoïde	1	RENARD <i>et al.</i> (1999)
septicémie colibacillaire, anomalies morphologiques du cou ou des membres, malformation rénale	24	KATO <i>et al.</i> (2000)
problèmes cardio-pulmonaires sur 6 veaux, qui sont morts dans les premiers jours ; les 24 autres veaux étaient normaux sur les plans clinique, hématologique et immunologique	30	LANZA <i>et al.</i> (2001)
anomalie rénale, stéatose hépatique, accumulation de gras autour des organes abdominaux, ascite, œdèmes	12 fœtus et 5 veaux	CHAVATTE-PALMER <i>et al.</i> (2002)
diarrhée, intussusception intestinale, immaturité des poumons, aspiration du méconium à la naissance, anomalie cardiaque congénitale, hydrocéphalie, anomalies des membres, vaisseaux ombilicaux hypertrophiés, "pneumonie", infection clostridienne, ulcères de l'abomasum, pyélonéphrite, infection ombilicale	106	PACE <i>et al.</i> (2002)
non fermeture des muscles de la paroi ventrale, anomalies des membres et des tendons, anomalies rénales, pulmonaires, cardio-vasculaires et hépatiques	8 agneaux	RHIND <i>et al.</i> (2003)

IV. Clonage et caractéristiques hématologiques et hormonales des veaux obtenus

A. Paramètres hématologiques

Dans une étude de CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002), les paramètres hématologiques de 21 clones somatiques ont été mesurés et comparés à ceux de 8 témoins issus d'insémination artificielle. Le comptage des hématies et des leucocytes, l'hématocrite, le taux d'hémoglobine et certains paramètres biochimiques (urée, créatinine, AST et ALT) étaient dans la normale pour tous les clones, sauf pour un avec aplasie lymphoïde, qui avait des comptages réduits en lymphocytes et hématies (voir ci-dessus). En revanche, le VGM des clones était significativement plus élevé que celui des témoins. Le rapport neutrophiles/lymphocytes, qui reflète l'augmentation de cortisol à la naissance et donc la maturation adrénocorticale, était significativement plus élevé pour les clones que pour les témoins.

B. Paramètres hormonaux

Dans de nombreuses études sur les clones, les auteurs ont mesuré les valeurs de différents paramètres hormonaux et leur évolution au cours du temps, dans le but d'étudier les différences qu'il pouvait y avoir avec des témoins. En effet, des différences au niveau de la valeur de certaines hormones clés ou de leur profil pourraient expliquer certaines particularités des clones : poids de naissance, caractéristiques cliniques... Il s'agit également de voir si le métabolisme et la régulation énergétique des clones sont identiques à ceux des témoins.

1. Hormone de croissance et IGF (insulin-like growth factor)

L'hormone de croissance et les IGF ont été mesurés dans le but de déterminer leur rôle éventuel dans les anomalies de développement et de croissance des fœtus clonés, notamment le syndrome du gros veau.

La GH ou hormone de croissance est sécrétée par l'adénohypophyse après stimulation de celle-ci par la GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone). Elle agit directement sur certaines cellules, en provoquant une augmentation de l'érythropoïèse, de la fabrication par les cellules d'acides aminés, de l'insulinogénèse et de la lipolyse. Mais elle exerce aussi son action par l'intermédiaire de certains facteurs de croissance dits GH-dépendants, dont elle régule la production. L'IGF-I est le plus important de ceux-ci. Elle stimule alors la chondrogenèse, la différenciation et la prolifération cellulaire, la synthèse protéique (TAILLIEU, 1996).

L'IGF-I et l'IGF-II sont deux peptides dont la structure est proche de celle de la proinsuline. On observe de grandes similitudes d'une espèce à l'autre, à tel point que l'IGF-I est identique chez l'Homme, le porc et le bovin (HONEGGER et HUMBEL, 1986). Ils participent à la régulation de la multiplication et de la différenciation de la plupart des cellules de l'organisme, et exercent sur le métabolisme une activité proche de celle de l'insuline. En revanche, contrairement à cette dernière, ils sont produits par la plupart des tissus et se trouvent en quantité importante dans la circulation.

Pendant l'organogenèse et la vie fœtale, l'activité paracrine et autocrine des IGFs est prédominante, et intéresse l'ensemble des tissus fœtaux. Après la naissance, les concentrations sériques en IGF-I augmentent, avec un pic au moment de la puberté, coïncidant avec une forte imprégnation de l'organisme en hormones sexuelles et une augmentation de la concentration sérique en GH. En revanche, la concentration sérique en IGF-II chute après la naissance et reste faible par la suite.

Par la suite, la fraction endocrine de l'IGF-I devient de plus en plus importante par rapport à la fraction paracrine et participe à une croissance harmonieuse de l'organisme et à l'entretien des organes. L'activité endocrine est réglée d'une part par la GH qui stimule la production hépatique de l'IGF-I, et d'autre part par les IGFBPs. Les IGFBPs sont des protéines de transport pour les IGFs, qui circulent dans le sang principalement sous forme liée.

Les récepteurs à l'IGF-I et à l'IGF-II constituent les relais indispensables à la transmission de l'information portée par les IGFs depuis le milieu extracellulaire vers la cellule cible. Le récepteur à l'IGF-I présente des similitudes avec le récepteur à l'insuline. Il montre une affinité marquée pour l'IGF-I, mais peut aussi se lier à l'IGF-II, et à l'insuline lorsque sa concentration est élevée (TAILLIEU, 1996).

En résumé, les IGFs sont des facteurs de croissance, dont l'action dépend de la réceptivité des cellules cibles. Dans un tissu en phase d'hyperplasie, ils auront une activité mitotique et agiront sur la différenciation cellulaire. Si le tissu est mature, l'activité sera plutôt de nature anabolisante, en agissant sur le métabolisme cellulaire, participant ainsi à l'entretien de l'organe.

Pour déterminer si le développement de l'axe somatotrope de clones somatiques était identique à celui de témoins issus d'IA, GOVONI *et al.* (2002) ont collecté des échantillons sanguins sur 4 clones issus d'une vache de 13 ans et sur 4 témoins.

Il n'y avait pas de différence significative pour les concentrations d'hormone de croissance entre les deux groupes. Cependant, pour les témoins, les concentrations en GH diminuaient entre 5 et 14 mois, alors qu'elles ne changeaient pas chez les clones pendant cette même période. Les concentrations en GH étaient plus élevées pour les clones que pour les témoins à 9, 10 et 11 mois.

Pour tenter d'expliquer ces différences, les auteurs ont testé la réponse des clones et des témoins à la GH-releasing hormone (GHRH, qui stimule la sécrétion de GH) et au somatotropin release-inhibiting factor (SRIF, qui inhibe la libération de GH). Ils ont observé que les clones avaient une meilleure réponse à la GHRH que les témoins, et une moins bonne réponse au SRIF. Ceci pourrait expliquer les différences entre clones et témoins en ce qui concerne les concentrations en hormone de croissance. Des différences similaires ont été trouvées chez des animaux de haut niveau génétique. D'après les auteurs, il est donc probable que les différences entre clones et témoins soient en fait dues à la supériorité génétique des clones sur les témoins.

Comme nous l'avons vu, les effets de l'hormone de croissance sont en grande partie médiés par l'IGF-I.

Dans la même étude de GOVONI *et al.* (2002), les concentrations en IGF-I des clones et des témoins suivaient la même évolution au cours du temps (augmentation de 5 à 7 mois, puis plateau de 7 à 11 mois), mais étaient plus faibles pour les clones que pour les témoins.

L'IGFBP3, qui est la principale IGFBP, avait également une concentration plus faible chez les clones que chez les témoins. Aucune différence n'était notée entre les 2 groupes pour l'IGFBP2 (GOVONI *et al.*, 2002).

Ces dernières différences étaient également sans doute dues à la supériorité génétique des clones sur les témoins, d'après les auteurs.

CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002) se sont aussi intéressés à l'endocrinologie des veaux issus de clonage somatique. Leurs résultats ont été similaires à ceux de GOVONI *et al.* (2002) pour ce qui est de l'hormone de croissance. En revanche, ils n'ont pas trouvé de différence significative pour les concentrations en IGF-I et IGFBPs entre les clones (n=7) et les témoins d'IA (n=5). Ceci est en accord avec les résultats de GARRY *et al.* (1996), obtenus à partir de 21 veaux issus de clonage embryonnaire.

2. Hormones thyroïdiennes

Les données peu nombreuses obtenues chez le fœtus bovin montrent que le taux plasmatique de thyroxine augmente avec la durée de la gestation, puis diminue au cours des quatre jours qui précèdent la naissance, tout comme la thyroïdostimulinémie (REINEKE *et al.*, 1971). Par contre, la concentration plasmatique de thyroxine libre reste stable en fin de gestation (NATHANIELSZ, 1975).

Les hormones thyroïdiennes agissent de manière considérable sur le développement fœtal. Chez les ovins, l'ablation de la thyroïde du fœtus, réalisée entre 80 et 96 jours de gestation, entraîne une réduction du poids de naissance de 33%, ainsi qu'un retard marqué du stade osseux (HOPKINS et THORBURN, 1972). Les hormones thyroïdiennes influencent aussi la maturité pulmonaire, la thermorégulation et l'acquisition de l'immunité passive chez le nouveau-né. Chez le veau, les taux plasmatiques de thyroxine et de triiodothyronine augmentent au cours des 4 ou 10 premières heures après la naissance, ce qui témoigne d'une activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien à la naissance. Ces concentrations diminuent ensuite progressivement jusqu'à 7 jours. Les mécanismes de régulation de la fonction thyroïdienne continuent à évoluer après la naissance.

La durée d'absorption intestinale des Ig G et des Ig M chez le veau nouveau-né est d'autant plus courte que le taux plasmatique de thyroxine à la naissance est élevé (CABELLO et LEVIEUX, 1978). Il existe une association entre la pathologie néonatale et la présence de troubles endocriniens ; en particulier, des populations d'animaux à mortalité néonatale élevée sont caractérisées par des anomalies endocriniennes sévères.

GARRY *et al.* (1996) ont noté des taux en hormones thyroïdiennes plus bas chez 21 clones embryonnaires (T4 : $46,8 \pm 3,1$ ng/mL) par rapport à un groupe de référence (T4 : 58 ± 2 ng/mL), 10 minutes après la naissance. Cependant, ces différences pourraient être dues au mode de vêlage des clones, qui naissent presque toujours par césarienne. En effet, MIYAMOTO *et al.* (1991) ont montré chez les Humains que les bébés nés par césarienne avaient des taux en TSH et en T3 plus bas que les bébés nés par les voies naturelles.

Le premier mécanisme de thermogénèse chez le veau nouveau-né est le métabolisme de la graisse brune, dépendant de T3. Ainsi, dans cette étude, les veaux clonés, qui ont des taux en hormones thyroïdiennes plus bas que les témoins, ont une forte tendance à l'hypothermie.

D'après CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002), la concentration en thyroxine (T4) est significativement plus basse pour les clones (n=7) que pour les témoins issus d'IA (n=4)

pendant les 15 premiers jours après la naissance. Les hormones thyroïdiennes sont connues pour jouer un rôle important dans les processus de thermorégulation. Des changements de leur concentration pourrait entraîner des pics d'hyperthermie, comme cela était le cas chez certains clones dans cette étude.

3. Leptine

En 1994, Jeffrey Friedman a identifié le gène *ob*, dont les mutations sont responsables de l'obésité chez l'un des modèles animaux de la maladie : la souris obèse. Ce gène ne s'exprime que dans les adipocytes et code pour une protéine, qui a été baptisée leptine (GUERRE-MILLO, 1998).

La leptine est une hormone produite principalement par le tissu adipeux. Un de ses rôles essentiels est d'informer l'organisme sur le niveau de ses réserves lipidiques. Des mutations dans le gène codant pour la leptine (supprimant la production d'hormone biologiquement active) ou pour ses récepteurs (supprimant son effet sur les cellules cibles) sont associées à des obésités génétiques massives chez les rongeurs et l'Homme. L'adiposité corporelle et le niveau alimentaire ont des effets positifs sur les concentrations en leptine, tandis que l'adrénaline a des effets négatifs. La production de leptine est également stimulée *in vitro* par les glucocorticoïdes et l'insuline, inhibée par l'hormone de croissance (CHILLIARD *et al.*, 1999).

Les concentrations plasmatiques en leptine étaient plus élevées chez 6 clones somatiques que chez 5 témoins (IA), pendant la première semaine après la naissance (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002). Une hypothèse pour expliquer cette différence serait qu'il y a plus de tissu adipeux chez les clones puisque le poids de naissance et le poids du placenta sont généralement augmentés. De plus, dans cette même étude, les clones avaient plus de gras intra-abdominal que les témoins.

Cette différence de concentration plasmatique en leptine pourrait avoir de l'importance. En effet, la leptine serait un régulateur de l'hématopoïèse et de l'angiogenèse durant la gestation. Ces deux phénomènes pourraient être altérés par des modifications des concentrations en leptine au début de la gestation, et ceci conduirait à un échec de la gestation pendant le premier trimestre. De plus, le VGM est plus élevé chez les clones que chez les témoins (voir D.1.); cette augmentation du VGM montre aussi que la maturation hématologique n'est pas complète et cela pourrait être dû à des troubles au niveau des concentrations en leptine.

4. Cortisol

Dans l'étude de GARRY *et al.* (1996), les concentrations plasmatiques en cortisol n'étaient pas significativement différentes entre les clones ($112,6 \pm 5,9$ ng/mL) et les témoins (101 ± 5 ng/mL).

Au contraire, d'après CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002), elles étaient plus basses chez les clones que chez les témoins nés naturellement sans assistance. Cependant, elles étaient identiques pour les clones et pour les témoins nés par césarienne. Il faut rappeler que tous les veaux clonés sont ici nés par césarienne pour éviter les gestations prolongées et les dystocies.

L'augmentation du cortisol plasmatique en réponse à une stimulation par l'ACTH fœtal s'effectuait normalement chez les clones comme chez les témoins.

Ces données confirment que la réponse adrénocorticale à l'ACTH était normale, bien que le niveau basal en cortisol soit inférieur chez les clones et les témoins nés par césarienne. Aussi, ces valeurs faibles en cortisol étaient probablement les conséquences de la césarienne plutôt que celles du clonage.

Dans une étude de MATSUZAKI et SHIGA (2002), les concentrations plasmatiques en cortisol et ACTH de 13 veaux obtenus par clonage somatique ont été comparés à celles de 7 témoins (n=5 IA et n=2 FIV). Cinq clones sont nés par césarienne et huit par les voies naturelles. Tous les témoins sont nés par les voies naturelles.

Les concentrations plasmatiques en cortisol étaient plus basses pour les clones que pour les témoins, tandis qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes pour les concentrations en ACTH. Dans cette étude, le mode de vêlage ne semblait donc pas avoir d'influence.

EDWARDS *et al.* (2002) ont étudié, dans l'espèce ovine, les concentrations plasmatiques en cortisol et en ACTH de 4 clones, 6 témoins produits par saillie naturelle et 4 témoins obtenus par FIV, dans le premier mois après la naissance.

Les concentrations plasmatiques en cortisol étaient significativement plus élevées chez les agneaux clonés et produits par FIV que chez les témoins naturels. Les concentrations plasmatiques en ACTH étaient significativement plus élevées pour les clones que pour les témoins naturels.

Les raisons de cette augmentation du taux de cortisol et d'ACTH chez les clones ne sont pas encore claires, mais il est possible qu'une altération des hormones maternelles ou placentaires soit à l'origine d'une stimulation de la sécrétion d'ACTH, qui à son tour stimulerait la production de cortisol. Le fait que les agneaux produits par FIV aient également une plus grande concentration plasmatique en cortisol montre que cette augmentation ne peut pas être seulement attribuée à la technique de transfert nucléaire, mais plutôt à l'exposition des embryons aux différents facteurs de la culture *in vitro*. (EDWARDS *et al.*, 2002)

Ainsi, les taux plasmatiques en cortisol et en ACTH des clones à la naissance et au cours des premiers jours semblent varier d'une étude à l'autre. Il faut bien noter qu'ils dépendent également d'autres facteurs :

- le mode de vêlage : naturel ou par césarienne
- l'injection de corticoïdes à la mère pour provoquer le vêlage (dans le but d'éviter des gestations prolongées et des excès de poids du veau à la naissance) et induire la maturation fœtale (synthèse du surfactant, adaptation à la vie extra-utérine)
- le stress.

5. Insuline et glucose

Les 21 clones embryonnaires étudiés par GARRY *et al.* (1996) ont présenté des valeurs de glycémie identiques à celles du groupe témoin (67 ± 5 mg/dL), 10 minutes après la naissance. Cependant, les concentrations en insuline étaient nettement plus élevées pour les clones ($13,3 \pm 1,8$ uU /mL) que pour les témoins ($3,2 \pm 0,4$ uU /mL).

Habituellement, à la naissance, après l'arrêt de l'apport de glucose au fœtus par l'intermédiaire du cordon ombilical, les concentrations plasmatiques en glucose et en insuline chutent, tandis que les concentrations en catécholamines et glucagon augmentent. La concentration en insuline continue à décroître, et reste basse jusqu'à ce que la glycémie s'équilibre. Des concentrations élevées en insuline chez les clones à la naissance sont donc frappantes. Il est possible, chez ces clones, que des différences dans la production et l'utilisation de l'énergie *in utero* entraînent des différences en ce qui concerne la croissance fœtale, et prédisposent les clones à des difficultés de régulation et d'adaptation au cours du passage à la vie extra-utérine.

De plus, dans cette étude, les clones avaient un taux en hormones thyroïdiennes plus faible que les témoins. Or, l'hypothyroïdisme réduit le nombre et l'affinité des récepteurs à l'insuline. Une réponse altérée des tissus à l'insuline chez les clones pourrait donc expliquer que les concentrations en insuline soient élevées.

CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002) ont mesuré les concentrations plasmatiques en glucose et en insuline de 6 clones somatiques et de 6 témoins issus d'IA, avant et après la distribution de nourriture. Aucune différence significative entre les 2 groupes n'a été notée, ni pour le glucose, ni pour l'insuline (résultats différents de ceux trouvés par GARRY *et al.* en 1996).

V. Caractéristiques de la reproduction des génisses clonées

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

C'est ce qu'ont étudié ENRIGHT *et al.* (2002). Quatre génisses obtenues par clonage de cellules somatiques adultes d'une vache Prim'Holstein de 13 ans ont été comparées à quatre génisses témoins produites par insémination artificielle.

Les clones atteignaient la puberté plus tardivement que les témoins (314,7 +/-9,6 jours versus 272 +/-4,4 jours) et avec un poids plus élevé que celui des témoins (336,7 +/-13 kg vs. 302,8 +/-4,5 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 clones 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 feed-back fonctionnaient.

Trois génisses clonées sur quatre ont été pleines avec moins de 3 IA.

Les génisses obtenues par clonage sont donc capables de se reproduire normalement et de mener à bout une gestation. Il reste à étudier des échantillons plus grands et avec des clones issus de différents types cellulaires pour voir si ces résultats sont toujours valables.

VI. Causes potentielles des anomalies observées

Plusieurs origines possibles ont été suggérées pour les anomalies observées. La véritable source de problèmes pourrait être une combinaison de celle-ci.

A. Procédés de culture

La culture *in vitro* des cellules donneuses, des ovocytes et des embryons reconstitués pourrait jouer un rôle dans la fréquence des anomalies : en effet, le syndrome du gros veau a été décrit chez les veaux issus de fécondation *in vitro*, mais dans une moindre mesure (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2000). Il a été suggéré que l'utilisation de la coculture et/ou de sérum pendant la culture *in vitro* pourrait expliquer l'augmentation du poids à la naissance et les autres anomalies décrites.

Cependant, les taux de gestation et de développement des embryons jusqu'au stade blastocyste sont diminués sans l'utilisation de sérum et de co-culture (YOUNG *et al.*, 1998). Différents agents présents dans le sérum pourraient interférer avec le développement de l'embryon : facteurs de croissance, radicaux libres, ammoniac... Ces agents pourraient influencer l'embryon à n'importe quel moment avant l'éclosion du blastocyste, ou à un moment spécifique du développement, en particulier au stade 8-16 cellules, lorsque le génome de l'embryon est activé (avant, les cycles sont gouvernés par l'ARN et les protéines de l'ovocyte).

Le milieu de culture est riche en nutriments et facteurs de croissance (produits par les cellules de la co-culture). Ceci pourrait entraîner : des perturbations dans la maturation de l'ovocyte, la régulation et l'expression des gènes, une accélération du développement conduisant à de gros fœtus, des altérations dans le métabolisme énergétique de l'embryon (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW *et al.*, 2000).

L'addition de sérum au milieu de culture entraîne l'accumulation de triglycérides chez l'embryon, qui effectue des échanges avec le milieu. Cette accumulation de triglycérides est à l'origine de synthèses excessives, et pourrait être associée au syndrome du gros veau (FERGUSON et LEESE, 1999).

Des modifications subtiles du milieu de culture pourraient être suffisantes pour altérer la croissance embryonnaire puis fœtale. Ainsi, une modification du pH intracellulaire induit des effets délétères (BAVISTER, 2000).

Il n'est donc pas évident de différencier les anomalies engendrées par le transfert nucléaire et/ou par les conditions de culture.

La fréquence des anomalies augmente selon l'origine de la cellule donneuse : les cellules somatiques adultes entraînent plus d'anomalies que les cellules somatiques fœtales, et beaucoup plus que les cellules embryonnaires. L'augmentation de la fréquence des anomalies avec les clones somatiques pourrait être due à une exposition prolongée au sérum ou à un

milieu suboptimal menant à un développement aberrant et à la mise en route de mécanismes compensatoires (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2000).

B. Environnement utérin altéré

Dans la procédure de clonage, bien que les embryons soient normalement transférés dans des utérus receveurs synchronisés, l'altération de la croissance embryonnaire *in vitro* pourrait induire un asynchronisme entre l'embryon et la receveuse, qui augmenterait le processus de surcroissance. On sait que les embryons FIV se développent plus vite que les embryons produits *in vivo* chez la vache (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW *et al.*, 2000).

Il a été montré que le transfert asynchrone d'embryons dans des receveuses qui étaient en chaleur plus tôt que les donneuses entraînait une croissance anormale de l'embryon chez le mouton (WILMUT et SALES, 1981 ; MAXFIELD *et al.*, 1998). De plus, l'administration de progestérone pendant les premiers jours du cycle chez le mouton et la vache « décale » l'endomètre utérin, allonge la durée du cycle et accélère la croissance fœtale (GARRET *et al.*, 1988 ; GEISERT *et al.*, 1991).

La perturbation de l'environnement utérin affecte très probablement des voies de signalisation et particulièrement 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, 2000 ; BLONDIN *et al.*, 2000).

C. Empreinte parentale

L'empreinte parentale désigne la modification de l'expression d'un des allèles parentaux d'un gène par opposition à l'expression similaire des deux allèles parentaux pour la plupart des gènes. La plupart des gènes soumis à l'empreinte identifiés jusqu'ici jouent un rôle dans la croissance et le développement embryonnaire, fœtal ou placentaire (YOUNG et FAIRBURN, 2000).

L'empreinte est effacée puis rétablie dans la lignée germinale et exprimée dans les gamètes. L'empreinte des gènes dépend de modifications épigénétiques de l'ADN sans modification de la séquence nucléotidique. La méthylation des résidus cytosines de l'ADN impliquée dans le processus d'empreinte se produit pendant la gamétogenèse ou l'embryogenèse et peut varier entre les tissus, les stades de développement et les espèces.

Chez l'Homme, la surexpression d'IGF2 par la perte de l'empreinte entraîne un syndrome d'excès de développement (syndrome de Beckwith-Wiedemann) caractérisé par une grande taille à la naissance, une surcroissance des organes, notamment une macroglossie, et une augmentation de la fréquence de tumeurs pendant l'enfance (YOUNG et FAIRBURN, 2000). Chez le mouton, il a été montré que le syndrome du gros agneau était associé à une augmentation de l'expression dans le foie fœtal et le plasma d'IGFBP2, mais aucune modification de l'expression d'IGF2 n'a été détectée dans le foie ou le cœur des gros fœtus, en dépit d'une augmentation de taille des organes. (YOUNG *et al.*, 1999).

Comme nous l'avons vu, de nombreux auteurs se sont intéressés aux concentrations en hormone de croissance, en IGF1 et IGF2 chez les clones. La poursuite de recherches dans ce domaine permettra de déterminer si des modifications dans l'empreinte des gènes favorisant la croissance sont ou non la cause des anomalies de croissance observées et si les changements observés pour les facteurs de croissance sont un mécanisme compensatoire pour la vascularisation placentaire anormale en début de gestation (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2000).

Ainsi, les anomalies observées au cours de la gestation et du développement embryonnaire et fœtal des clones ont des origines complexes et multiples. Des défaillances dans le procédé de transfert nucléaire peuvent conduire à des reprogrammations incomplètes ou faussées du noyau de la cellule donneuse. L'expression de gènes clés intervenant dans le développement et la croissance peut se trouver modifier et entraîner des pertes au cours de la gestation ou des anomalies chez le veau. Des altérations du milieu de culture peuvent aussi être à l'origine de problèmes.

VII. Perspectives

Lorsque les procédés de clonage seront tout à fait au point, de nombreuses applications seront possibles.

A. Dissémination d'une supériorité génétique

Le clonage à partir de cellules adultes provenant d'animaux de haut niveau génétique pourrait être intéressant dans le cadre des programmes d'amélioration génétique. En effet, la dissémination de la supériorité génétique de ces animaux serait facilitée par la production de nombreuses copies génétiquement identiques. De plus, l'intervalle entre les générations serait plus court.

Cependant, des progrès sont encore nécessaires pour améliorer les taux de gestation et diminuer les taux d'avortement qui restent très élevés. De plus, un inconvénient de cette technique de reproduction est le problème de consanguinité qu'elle entraînerait à long terme.

Les taux de développement jusqu'au stade blastocyste varient de 12 à 70 %, et les taux de naissance de 1 à 83 % selon les espèces et les laboratoires (SMITH *et al.*, 2000). L'efficacité du transfert nucléaire à produire des embryons et des veaux vivants varie considérablement selon les différents laboratoires, le type de cellule donneuse de noyau, les conditions de manipulations des embryons...

B. Animaux en voie de disparition

Le clonage peut être utilisé pour préserver des animaux en voie de disparition, dont l'espèce est menacée d'extinction. Dans l'étude de WELLS *et al.* (1998), le transfert nucléaire

à partir de cellules somatiques adultes a été utilisé pour préserver la dernière vache de la race de l'île Enderby. Soixante quatorze embryons ont été transférés dans des vaches receveuses, et deux veaux vivants ont été obtenus, dont un seul a survécu. D'autres gestations ont été menées à terme depuis (pas de données chiffrées).

Pour éviter la disparition de certaines espèces ou de certains pools génétiques, des programmes de prévention pourraient être instaurés : collecte d'échantillon de tissus somatiques de différents individus, congélation et stockage. En cas de nécessité, ces cellules pourraient être utilisées pour produire de nouveaux individus de la race menacée.

C. Production d'animaux transgéniques

La transgénèse consiste à ajouter, remplacer ou inactiver un gène particulier dans un génome. De nombreuses techniques ont été imaginées pour introduire un gène au sein du génome d'un mammifère. Les trois principales sont la microinjection au stade 2 pronoyaux, le clonage (transfert nucléaire) de cellules transgéniques et la création de chimères par addition de cellules transgéniques à un embryon normal. Lors de microinjection ou de formation de chimères, les individus obtenus sont le plus souvent des mosaïques, et on ne maîtrise donc pas les organes d'expression du transgène. Lors de clonage de cellules transgéniques, à l'inverse, toutes les cellules de l'individu obtenu expriment le transgène, ce qui fait de l'association clonage/transgénèse une technique très puissante.

Cependant, les cellules transfectées sont à l'origine de taux de gestation et de naissance plus faibles que les cellules non transgéniques (FORSBERG *et al.*, 2002). Les facteurs responsables de cette baisse de performance incluent l'âge, le nombre de passages et le nombre de divisions cellulaires des cellules transgéniques, qui sont en général plus élevés que pour les cellules non-transgéniques au moment du transfert nucléaire. Les transgènes eux-mêmes pourraient interférer avec le développement embryonnaire normal.

L'intérêt d'obtenir des animaux transgéniques, hormis l'application en recherche fondamentale, est d'obtenir des substances pharmaceutiques excrétées dans le lait de femelles domestiques, telles que la chèvre et la vache, par exemple. L'introduction d'animaux transgéniques au sein des élevages permettrait de lutter contre certaines maladies (gènes de résistance), de limiter l'usage des antibiotiques ou d'accroître les performances zootechniques.

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

Cependant, d'autres problèmes restent à régler, notamment le vieillissement des animaux clonés. Les télomères sont les terminaisons des chromosomes ; ils possèdent une structure spéciale qui les protège des recombinaisons et des dégradations. En effet, ils sont importants pour maintenir l'intégrité des chromosomes. De nombreux mécanismes sont impliqués dans la régulation de la longueur des télomères. Une des causes du vieillissement cellulaire est le raccourcissement de ces télomères (ZHU *et al.*, 1998). Ainsi, on pensait que les animaux clonés vieillissaient plus vite et avaient une longueur de télomères plus courte que les individus normaux. En effet, Dolly, la première Brebis clonée à partir d'une cellule somatique adulte en 1996, vieillissait rapidement.

TIAN *et al.* (2000) ont étudié 4 veaux obtenus par clonage de fibroblastes ou de cellules du cumulus d'une vache laitière adulte de 13 ans. Les longueurs des télomères de ces 4 veaux n'étaient pas différentes de celles des témoins du même âge, et les veaux clonés avaient des télomères plus longs que ceux de la vache donneuse. Une longueur normale de télomère était donc restaurée après transfert nucléaire. Cette restauration se fait pendant l'embryogenèse par augmentation de l'activité de la télomérase. Ainsi, il semble que les télomères plus courts retrouvés chez Dolly soient une exception.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'HEMATOLOGIE ET DE LA BIOCHIMIE DU VEAU ET EVOLUTION DE CES DIFFERENTS PARAMETRES AVEC L'AGE

I. Paramètres hématologiques

Le tableau 6 présente les valeurs normales d'hématologie pour les veaux à différents âges.

TABLEAU 6 : Veau : valeurs normales d'hématologie (communication personnelle, CHAVATTE-PALMER)

	à la naissance	entre 3 et 6 semaines
Hématies ($\cdot 10^6/\mu\text{L}$)	6,0-9,5	8,5-10,5
Hémoglobine (g/dL)	8,4-12,0	9,7-12,7
Hématocrite (%)	26,8-42,2	32,1-39,7
VGM (μm^3)	41,4-51,0	34,6-41,0
Leucocytes (/μL)	6200-13000	7700-14000
Neutrophiles (/μL)	1500-8300	1500-4200
Eosinophiles (/μL)	0-300	0-500
Basophiles (/μL)	0-80	0-130
Lymphocytes (/μL)	2200-5700	4700-9000
Monocytes (/μL)	120-870	520-1100
N/L	1,1/1,0	0,41/1,0
Fibrinogène (g/L)	0,3-3	0-3

Le tableau 7 présente les valeurs hématologiques normales dans l'espèce bovine (JAIN, 1993). Cependant, 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 7 : Valeurs hématologiques normales des bovins adultes (d'après JAIN, 1993).

Paramètre étudié		Moyenne
Nombre d'hématies ($\cdot 10^6/\mu\text{L}$)	5,0-10,0	7,0
Hématocrite (%)	24,0-46,0	35,0
Taux d'hémoglobine (g/dL)	8,0-15,0	11,0
Volume corpusculaire moyen (μm^3)	40,0-60,0	52,0
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (pg)	11,0-17,0	14,0
Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (%)	30,0-36,0	32,7
Réticulocytes (%)	0	0
Leucocytes ($/\mu\text{L}$)	4000-10000	8 000
Lymphocytes	2500-7500	4 500
Neutrophiles	600-4000	2 000
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 ($\cdot 10^5$)	1,0-8,0	5,0
Fibrinogène (g/dL)	0,3-0,7	

A. Lignée rouge : paramètres et variation

1. Erythrocytes

- Définition et rôles

Les érythrocytes des bovins sont des cellules discoïdes anucléées biconcaves de 5 à 7 µm de diamètre. Le globule rouge est une cellule parfaitement différenciée et adaptée à sa fonction : forte charge en hémoglobine autorisant le transport des gaz, absence de noyau et d'organites cytoplasmiques.

L'érythropoïèse est l'ensemble des processus qui aboutissent à la libération des globules rouges dans le torrent circulatoire. Elle débute très tôt chez l'embryon ; les premières cellules sanguines apparaissent dans des îlots des parois de la vésicule ombilicale. Ce sont des cellules d'origine mésenchymateuse, dont l'activité débute chez les bovins vers le 28^{ème} jour pour se terminer entre la sixième et la dixième semaines. Le relais est pris par le foie dès 60 jours et jusqu'à 140 jours. Les cellules hématopoïétiques se situent alors dans les espaces de DISSE ménagés entre les travées hépatocytaires et les capillaires sinusoides. A partir du milieu de gestation, l'érythropoïèse devient progressivement splénique, la rate étant le lieu de production prédominant à partir de 200 jours. 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. Dans des conditions pathologiques, lors de demande importante en globules rouges, le foie et surtout la rate peuvent retrouver leur capacité hématopoïétique. La moelle osseuse hématopoïétique est surtout abondante dans les épiphyses des os longs, les côtes, les os plats, les os courts : vertèbres.

L'érythropoïèse se déroule en plusieurs étapes. Initialement se produit la division puis l'entrée en différenciation d'une cellule souche médullaire. On distingue deux compartiments : un compartiment multipotent et un compartiment de cellules souches engagées. Les cellules souches multipotentes, sont numériquement faibles, mais sont capables par mitose soit d'autorenouvellement, soit de différenciation en cellules souches engagées dans les lignées sanguines, notamment la lignée érythroblastique. Ces cellules souches multipotentes sont également appelées CFU-S (colony forming unit-spleen), car, injectées à un animal irradié à dose létale, elles déterminent l'apparition de colonies hématopoïétiques dans la rate. Les cellules souches engagées sont désignées par le sigle CFU-E (colony forming unit-erythroïde).

Le premier élément identifiable de la lignée érythroblastique est le proérythroblaste. Puis plusieurs divisions donnent successivement un érythroblaste basophile I, un érythroblaste basophile II, un érythroblaste polychromatophile et enfin un réticulocyte ou érythroblaste acidophile. A partir du stade érythroblaste polychromatophile, il y a arrêt des divisions et le noyau est expulsé. La phase de division cellulaire dure environ 2-3 jours chez les bovins. Chez les ruminants, la maturation des réticulocytes pour les conduire au stade hématie se poursuit presque entièrement au sein de la moelle osseuse et dure environ 2 jours. Après traversée de l'endothélium vasculaire, les cellules se retrouvent dans le torrent circulatoire globules rouges mûrs.

La régulation de l'érythropoïèse est hormonale, la principale hormone étant l'érythropoïétine, une glycoprotéine d'origine essentiellement rénale. Le foie peut

accessoirement chez l'adulte 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. La cible de l'érythropoïétine est la population CFU-E, mais l'hormone agit également sur les prorubicytes et tout au long de la lignée érythrocytaire. Elle accélère la prolifération cellulaire, diminue le temps de transit médullaire par augmentation de la synthèse d'ARN donc d'hémoglobine et favorise la sortie des réticulocytes (CASADEVALL, 1988). La production d'érythropoïétine est rapidement augmentée en cas de pertes sanguines. Sa demi-vie est brève, de l'ordre de 5 à 10 heures, et son élimination est urinaire et hépatique.

D'autres hormones comme l'hormone de croissance, la thyroxine, les androgènes ou le cortisol agissent pour partie par voie indirecte, via leurs différents effets métaboliques avec leurs conséquences sur la consommation d'oxygène ce qui retentit sur la synthèse d'érythropoïétine. On note également pour ces hormones, en présence d'érythropoïétine, un effet positif *in vitro* sur la croissance des cellules précurseurs.

Le fer est également un élément essentiel à l'érythropoïèse.

Les hématies contiennent un pigment caractéristique, l'hémoglobine, capable de fixer de façon réversible l'oxygène et une fraction du gaz carbonique transporté par le sang. Ce pigment confère aux hématies un rôle primordial dans les échanges respiratoires entre l'air, le sang et les tissus. L'hémoglobine est une hétéroprotéine. Chaque molécule comprend 4 hèmes et 4 chaînes globiniques identiques 2 à 2 polypeptidiques α et β .

La durée de vie des hématies dans la circulation est courte en raison des réserves limitées et non renouvelables d'enzymes nécessaires au métabolisme. Elle est d'environ 157 à 162 jours, chez les bovins adultes, plus courte chez le veau : 70 à 126 jours. L'érythrolyse a lieu pour 90% en secteur extra-vasculaire : les hématies sont phagocytées par le système des phagocytes mononucléés, notamment les macrophages spléniques, médullaires et hépatiques. Les modifications membranaires du globule rouge sénescents dues au caractère limité des ressources vitales semblent, par le biais d'une réaction immunologique, être à l'origine de la phagocytose.

L'anisocytose (diversité de taille des érythrocytes) est physiologique chez les Bovins, mais est surtout rencontrée pendant la première semaine de vie (TENNANT *et al.*, 1974).

Les réticulocytes ne sont rencontrés que pendant la première semaine après la naissance (TENNANT *et al.*, 1974). ADAMS *et al.* (1992) n'ont observé des réticulocytes que chez 2 veaux à 48 heures après la naissance, sur 35 veaux étudiés. Dans le sang périphérique de bovins sains, âgés de plus de 2 ans, on ne doit pas observer de réticulocytes (ROSENBERGER, 1977).

- Valeurs normales chez le veau et variations avec l'âge

Le nombre moyen d'hématies chez le veau est de 6 à $10 \cdot 10^6 / \mu\text{L}$, mais les données sont très variables selon les auteurs, car il existe de grandes variations entre les individus.

Au cours des 2 à 3 premières semaines après la naissance, on assiste à une activité croissante de l'érythropoïèse de la moelle osseuse, alors que les globules rouges sont détruits en masse (« mue sanguine »). Au cours des semaines et des mois suivants, la formation nouvelle d'érythrocytes est limitée par un approvisionnement insuffisant en fer surtout lors d'alimentation strictement lactée (anémie ferriprive fréquente). Malgré cela, le nombre de

globules rouges/mm³ de sang est souvent encore un peu plus élevé chez les veaux et les jeunes bovins que chez les adultes (ROSENBERGER, 1977).

La numération érythrocytaire diminue pendant le 24 premières heures après la naissance, avec des valeurs minimales observées à une semaine. Elle reste relativement basse pendant un mois, puis augmente progressivement dès le second mois pour atteindre les valeurs les plus hautes chez des veaux de 9 à 12 semaines (TENNANT *et al.*, 1974).

D'après KURZ et WILLETT (1991), la numération érythrocytaire, le taux d'hémoglobine et l'hématocrite diminuent de la naissance à 24 heures et continuent à décroître jusqu'à 144 heures. ADAMS *et al.* (1992) obtiennent les mêmes résultats en étudiant les valeurs hématologiques de 35 veaux de race à viande à la naissance, à 24 et 48 heures et à 3 semaines.

Cette diminution initiale du nombre d'hématies a été attribuée à une hémodilution après absorption du colostrum (TENNANT *et al.*, 1974 ; AMSTUTZ, 1980).

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 à 48 heures pour les veaux nés avec une assistance au cours du vêlage que pour les veaux nés naturellement sans assistance.

2. Hématocrite

- Définition

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

- Valeurs normales

L'hématocrite est de 30 à 40 % chez les Bovins. Après la naissance, il suit les mêmes variations que la numération globulaire : il diminue jusqu'au second mois, puis augmente pour atteindre la valeur de l'adulte à environ 4 mois (HOLMAN, 1956).

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

3. Taux d'hémoglobine

Le taux d'hémoglobine représente la richesse des hématies en hémoglobine et se mesure en g/100mL. Il est de 8 à 12 g/100mL chez les Bovins. Les veaux ont une teneur en hémoglobine sanguine plus élevée que les bovins adultes (jusqu'à 14 ou 15 g/dL parfois).

En pratique, ce qui est important pour l'organisme n'est pas le nombre de globules rouges mais la quantité d'oxygène transporté, donc le taux d'hémoglobine. L'anémie se définit d'ailleurs comme une diminution de la quantité d'hémoglobine contenue dans le volume sanguin, le volume plasmatique n'ayant pas changé.

L'anémie par carence d'apport en fer est fréquente chez les jeunes à régime lacté exclusif. Plusieurs situations sont considérées selon le type d'alimentation (allaitement naturel ou lactoremplaceur) 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 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. Des défauts de transfert materno-fœtal pourraient être à l'origine d'anémie congénitale (TENNANT *et al.*, 1975).

L'utilisation de lactoreplaceurs conduit à une évaluation plus précise des besoins. Les valeurs seuils sont variables selon les auteurs : pour BREMNER (1976), il faut un minimum de 25 à 30 ppm/MS. Chez le veau d'élevage, un apport d'aliments secs (foin, concentrés) dès les premières semaines après la naissance est généralement suffisant pour éviter l'anémie liée à l'épuisement des stocks hépatiques.

L'apport systématique de fer aux veaux nouveaux-nés pour pallier à une carence d'apport est envisageable. La voie injectable est la plus utilisée. Des dextrans ou des polymères glucidiques sont employés par voie intra-musculaire ; 10 à 50% restent fixés au point d'injection, le reste étant capté par le système des phagocytes mononucléés. La dose est de 0,5 à 1 g de fer pour un veau ; le fer plasmatique est alors augmenté pendant une quinzaine de jours. Les résultats sont bons. Un inconvénient de cette injection est l'effet qu'elle peut avoir sur les infections chroniques. L'hyposidérémie est en effet un mécanisme de défense de l'organisme vis-à-vis de bactéries.

4. Volume globulaire moyen

- Définition

Le volume globulaire moyen (V.G.M.) est un index qui exprime le volume moyen d'une hématie dans une population d'hématies.

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

$$\text{V.G.M.} = (\text{Ht} \times 10) / \text{N.G}$$

La valeur moyenne chez l'adulte est de 40 à 45 μm^3

- Valeurs normales chez le veau et variations avec l'âge

Les érythrocytes fœtaux chez les Bovins sont macrocytaires dans les premiers stades de gestation, c'est-à-dire de volume supérieur à celui des érythrocytes normaux chez l'adulte. A 3 mois de gestation, les érythrocytes fœtaux sont deux fois plus larges (V.G.M. = 90 μm^3) qu'à la naissance (AMSTUTZ, 1980). Le V.G.M. diminue tout au long de la gestation et continue à décroître après la naissance. Cette diminution progressive coïncide avec la disparition de l'hémoglobine fœtale et son remplacement par l'hémoglobine adulte (AMSTUTZ, 1980). Il existe en effet plusieurs types d'hémoglobine. L'hémoglobine embryonnaire est présente *in utero*. L'hémoglobine fœtal lui succède et peut représenter encore jusqu'à 90% de l'hémoglobine à la naissance ; elle est complètement remplacée par le type adulte dans les 4 à 8 semaines après la naissance, mais elle ne disparaît définitivement qu'à 6-7 mois chez les bovins. Il existe plusieurs types d'hémoglobine chez l'adulte : A et B.

Le V.G.M. est de $48,5 (\pm 4,5) \mu\text{m}^3$ à la naissance; il diminue progressivement pendant les deux premiers mois, puis, après 6 mois, il augmente progressivement jusqu'à 2 ans, où la valeur de l'adulte est atteinte (TENNANT *et al.*, 1974).

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

5. Thrombocytes

Les thrombocytes sont les plus petits éléments figurés du sang. Ce sont des fragments cellulaires anucléés, qui jouent un rôle essentiel dans l'hémostase et dans certains phénomènes inflammatoires. La numération plaquettaire chez les bovins est d'environ $5 (2 \text{ à } 8) \times 10^5$.

B. Lignée blanche : paramètres et variations

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 dépendant de l'antigène.

1. Les différentes cellules

- 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, soit au sein des muqueuses, soit dans des organes spécialisés : les organes lymphoïdes. Au cours de ces étapes, les cellules se multiplient et acquièrent progressivement une différenciation morphologique et fonctionnelle.

On définit deux populations fonctionnelles 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. Ils font également partie des cellules présentatrices d'antigènes. 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.

- Granulocytes neutrophiles

Les granulocytes neutrophiles sont des leucocytes caractérisés par de nombreuses granulations cytoplasmiques riches en substances antimicrobiennes, notamment antibactériennes, et par un noyau polylobé. Ce sont des cellules phagocytaires dont le rôle est essentiel dans la réponse immunitaire locale non-spécifique. Ils représentent par ailleurs un des maillons de la réaction inflammatoire.

Ces cellules sont produites dans la moelle osseuse hématopoïétique par multiplication et différenciation progressive de cellules souches. La régulation de la granulopoïèse reste encore obscure. Elle semble orchestrée par un ensemble de substances activatrices (granulopoïétine) ou inhibitrices (CIF : colony inhibitory factor) (JONGH, 1993).

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. Le polynucléaire neutrophile est une cellule à persistance tissulaire faible. La population granulocytaire est rapidement renouvelée dans les tissus, et le temps pendant lequel les granulocytes restent dans la circulation sanguine est très court. En effet, le temps de demi-vie est de 10 à 12 heures.

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

- Autres catégories cellulaires

- granulocytes éosinophiles

Ils sont identifiables par de grosses granulations éosinophiles orangées, riches en peroxydase, en enzymes lytiques diverses et en protéine basique majeure. Leur durée de vie dans le sang est brève : de 6 à 8 heures.

Les polynucléaires éosinophiles sont une des populations leucocytaires les moins abondantes du sang, mais la réserve médullaire est importante et très rapidement mobilisable.

Le granulocyte éosinophile est particulièrement impliqué dans la destruction des parasites, la destruction des immun-complexes, notamment ceux mettant en jeu des IgE (réactions allergiques), et la modulation des réactions inflammatoires.

- granulocytes basophiles

Les granulocytes basophiles contiennent également de nombreuses granulations, dont la composition est voisine de celle du mastocyte : histamine, leucotriènes... Par leur capacité de dégranulation, ils semblent jouer un rôle essentiel dans les réactions immunologiques de type hypersensibilité immédiate.

Le nombre de basophiles circulants est très faible.

- monocytes

Les monocytes ne représentent que 2 à 3 % des leucocytes circulants. Leur cytoplasme très pâle contient de fines granulations azurophiles.

Les monocytes 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 innombrables fonctions, les plus importantes sont :

- # leur rôle de défense contre certains micro-organismes : bactéries, virus...
- # la phagocytose de cellules et de débris tissulaires
- # la participation au processus de cicatrisation
- # la sécrétion de nombreuses molécules biologiquement actives (enzymes protéolytiques, interférons, interleukine 1, prostaglandines...) (JONGH, 1993).

2. Numération et formule leucocytaire : variations au moment du part et avec l'âge

Le nombre total de leucocytes est compris entre 5 000 et 10 000 par mm³ chez le bovin adulte, entre 6 000 et 12 000 par mm³ chez le veau (COLLIN, 2000). D'une manière générale, les jeunes bovins ont jusqu'à l'âge de 3 ans beaucoup plus de leucocytes que les bovins plus âgés. Chez un animal donné, le nombre de globules blancs peut être soumis à des variations considérables selon les jours, la saison (avec des valeurs minimales en hiver) et les techniques d'élevages (ROSENBERGER, 1977).

De plus, les globules blancs se trouvent sous forme de deux sous-populations : un pool circulant et un pool marginal, en quantités presque égales. Les globules blancs des échantillons de prélèvements veineux représentent uniquement le pool circulant. Divers facteurs comme l'adrénaline (dont le taux augmente avec le stress) ou les glucocorticoïdes peuvent déplacer les cellules des parois vers le pool circulant, ce qui augmente la numération totale des leucocytes. Ainsi, la numération leucocytaire est influencée par de nombreux facteurs et doit être interprétée avec précaution.

La répartition physiologique entre les différentes catégories de leucocytes est, chez les bovins, de type lymphocytaire. On compte en moyenne 60 % de lymphocytes et 35 % de polynucléaires neutrophiles (ou 65 % et 30 % respectivement). Le rapport neutrophiles/lymphocytes est de 0,5 environ. Les 5% restants sont représentés par les polynucléaires éosinophiles et, pour 1% environ, par les polynucléaires basophiles (rares) et les monocytes (BEZILLE, 1993).

Il existe de nombreux facteurs de variations pathologiques des polynucléaires. Les affections aiguës de la mamelle, du pied ou de l'utérus par exemple sont caractérisées par une leucocytose moyenne à forte et une neutrophilie marquée. Il en est de même pour les brûlures, les traumatismes ou les interventions chirurgicales. Pour les affections chroniques, on note une leucocytose modérée à absente et une neutrophilie modérée. En effet, les bovins ont une faible réserve médullaire en neutrophiles ; le nombre de neutrophiles diminue donc avec le passage à la chronicité et on peut même observer une neutropénie. Une leucopénie avec neutropénie accompagne généralement les infections virales.

Une hyperéosinophilie est observée lors d'allergies ou d'infestations parasitaires.

Une lymphocytose est notée dans la leucose bovine enzootique (maladie éradiquée en France) ou au cours de la convalescence qui suit les maladies infectieuses. Une lymphopénie est observée au début des infections virales ou à la suite d'une injection de glucocorticoïdes (BEZILLE, 1993 ; COLLIN, 2000).

Chez le veau nouveau-né, il y a une leucocytose physiologique (COLLIN, 2000).

TENNANT *et al.* (1974) ont étudié les variations des paramètres hématologiques des veaux au cours du temps. Le nombre de leucocytes est le plus haut à la naissance, puis il diminue significativement pendant les deux premiers jours pour rester stable par la suite (sauf processus pathologique). Cette chute initiale du nombre de leucocytes est le résultat d'une chute du nombre de polynucléaires neutrophiles. Ces derniers continuent à décroître jusqu'à 5 jours puis restent stables.

Le nombre de lymphocytes augmente significativement pendant la première semaine. D'après ADAMS *et al.* (1992), il a presque doublé à 3 semaines. Chez les veaux de moins d'un jour, le rapport neutrophiles/lymphocytes est d'environ 2,8, mais il change rapidement et à 5 jours, il est de 0,54 environ, ce qui est similaire à celui des veaux plus âgés et des adultes (TENNANT *et al.*, 1974).

On a donc une leucocytose avec neutrophilie et lymphopénie chez les veaux nouveau-nés (tableau 8). C'est la réponse hématologique à la production de corticostéroïdes au moment de la parturition. Cependant, chez les veaux nés par césarienne, le nombre de leucocytes et le rapport neutrophiles/lymphocytes sont identiques à ceux des adultes. Une leucocytose avec neutrophilie et lymphopénie est également observée chez ces veaux si la mère a reçu des corticoïdes auparavant pour induire le vêlage.

TABLEAU 8 : Formule leucocytaire chez le veau, d'après MORNET et ESPINASSE (1977)

Paramètre	De 1 à 3 semaines	De 6 à 12 semaines
Neutrophiles (%)	32,1-34,8 *	25,0
Lymphocytes (%)	57,3-60,7 **	63,0
Eosinophiles (%)	0	2,0
Basophiles (%)	0	0,5
Monocytes (%)	7,2-7,9	9,0

II. Paramètres biochimiques

A. Glycémie

Chez les bovins ruminants, la teneur en glucose dans le sang et le sérum est notoirement plus basse que chez les autres animaux. La glycémie est d'environ 50 (45 à 60) mg/100 mL. Pour les veaux de lait, elle peut aller jusqu'à 150 mg/100 mL, et diminue lors du passage monogastrique/polygastrique (SMITH, 1996).

La glycémie est influencée par l'alimentation, le stade de gestation ou de lactation, certains états pathologiques : hypoglycémie lors de fortes diarrhées chez les veaux de moins de 8 jours ou d'acétonémie chez la vache laitière, hyperglycémie surtout lors de stress.

Chez le veau nouveau-né, le niveau de glycémie, plutôt bas à la naissance, varie fortement au cours des premières 24 heures et dépend de l'abreuvement (ROSENBERGER, 1977).

Le maintien de la glycémie à des valeurs normales est l'un des principaux problèmes rencontrés par le jeune après la naissance, car l'apport nutritionnel maternel étant supprimé, le glycogène contenu dans le foie, le cœur et le rein devient la seule source de glucose rapidement mobilisable. Le veau nouveau-né est donc exposé à l'hypoglycémie. Mais ce phénomène s'amplifie encore lors d'anoxie. En effet, dans un premier temps, la stimulation adrénergique induite par l'anoxie provoque une intense glycogénolyse. La libération massive de glucose dans le torrent sanguin tend à pallier le faible rendement énergétique de la glycolyse anaérobie et provoque une hyperglycémie de durée variable. Mais secondairement, on a épuisement des réserves glycogéniques et l'hypoglycémie s'installe si le colostrum n'est pas précocement ingéré. Or, en cas d'anoxie, l'ingestion du colostrum est retardée par la baisse d'activité du veau qui ne recherche pas la mamelle. Le veau anoxique est donc fortement exposé à l'hypoglycémie post-natale (GUERCIA, 1997).

B. Créatininémie

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 créatininémie 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).

C. Urémie

L'urée est produite par le foie et excrétée par le rein après filtration glomérulaire. Comme la créatinine, elle est un indicateur de la fonction rénale; cependant, elle est moins fiable car elle est influencée par de nombreux facteurs nutritifs surtout chez les ruminants.

L'urémie est d'environ 25 (10-40) mg/100 mL chez les bovins. Elle est plus basse chez les veaux en période néonatale, car il y a une grosse prise de fluides par l'animal et une forte croissance (SMITH, 1996).

D. 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 et peut même être indétectable chez le veau nouveau-né (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 péritonite étaient celles qui présentaient le taux de fibrinogène le plus haut. Le taux de fibrinogène augmente également chez les veaux atteints de diarrhées à *Escherichia coli* (DELDAR *et al.*, 1984).

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 d'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 d'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.

TROISIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Cette étude est une étude rétrospective effectuée à partir de résultats collectés chez des veaux de 0 à 4 mois, au cours des années 2001, 2002 et 2003. Nous comparerons ici les résultats recueillis chez des veaux témoins avec ceux obtenus chez des veaux produits par clonage.

La première partie est une étude clinique : poids de naissance, anomalies cliniques rencontrées, résultats d'autopsie pour les veaux qui sont morts. La seconde partie concerne l'étude hématologique et biochimique.

I. Animaux, matériels et méthodes

A. Animaux

Tous les animaux pris en compte dans cette étude sont des veaux âgés de 0 à 4 mois, nés et élevés à la ferme expérimentale de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), à Bressonvilliers dans l'Essonne. Deux catégories d'animaux sont distinguées : les clones, qui sont des veaux obtenus par clonage somatique et qui constituent le groupe 1 de l'étude, et les témoins qui constituent le groupe 2. L'inventaire de tous les animaux se trouve en annexe 1. Les animaux pris en compte dans l'étude hématologique sont représentés en gras.

L'étude clinique porte sur 35 clones et 15 témoins ; l'étude hématologique regroupe les résultats de 23 clones et 12 témoins. Certains veaux n'ont pas pu être pris en compte dans l'étude hématologique, soit parce qu'ils manquent des données les concernant, soient parce qu'ils sont morts trop tôt. En effet, comme nous le verrons dans la partie B. Matériels et méthodes, il faut au moins trois analyses sanguines par veau pour que ce dernier puisse être inclus dans l'étude.

Le tableau 9 représente la répartition des veaux de cette étude selon leur catégorie et leur survie.

TABLEAU 9 : Répartition des veaux de cette étude selon leur catégorie et leur survie à un an

Veaux pris en compte dans l'étude hématologique

Catégorie	Survie	Mort	TOTAL
clones 2001	3	3	6
témoins 2001	1	0	1
clones 2002	15	2	17
témoins 2002	6	0	6
clones 2003	0	0	0
témoins 2003	5	0	5
TOTAL	30	5	35

Veaux pris en compte dans l'étude clinique

Catégorie	Survie	Mort	TOTAL
clones 2001	6	8	14
témoins 2001	1	0	1
clones 2002	15	6	21
témoins 2002	9	0	9
clones 2003	0	0	0
témoins 2003	5	0	5
TOTAL	36	14	50

1. Veaux clonés

Les veaux clonés sont obtenus par clonage somatique à partir de fibroblastes de peau d'oreille de bovins, selon la méthode précédemment décrite par VIGNON *et al.* (1998). Il s'agit surtout de clones somatiques adultes, mais il y a également quelques clones foetaux. Les animaux sont surtout de race Prim'Holstein, mais d'autres races sont aussi représentées. Le tableau 10 indique le type d'embryon transféré pour chaque animal, ainsi que sa race.

TABLEAU 10 : Origine des embryons clonés ayant donné les 35 veaux de cette étude.

Type d'embryon transféré	Type de clone	Race	Nombres de veaux
caséine	foetal	Prim'Holstein	2
BSF	foetal	Prim'Holstein	4
5538	adulte	Prim'Holstein	15
7711	adulte	Prim'Holstein	3
9913	adulte	Prim'Holstein	1
Helsinki	adulte	Charolais	5
Aurore	adulte	Bleu du Bajouzet	4
Bijou	adulte	Béarnaise	1

La réalisation du clonage et la culture des embryons jusqu'au stade blastocystes se font à l'INRA de Jouy-en-Josas. Les embryons sont ensuite transférés dans des vaches receveuses, qui sont à Bressonvilliers et c'est là que se déroulent les gestations.

Les gestations de clones sont suivies très régulièrement par échographie tous les 15 jours à partir de 30-35 jours ; le fœtus est examiné, ainsi que le placenta et les différentes enveloppes foetales. Des échographies par voie trans-abdominale sont réalisées en plus des échographies par voie trans-rectale. En cas de gestation pathologique (détection de LOS), la

vache receveuse est abattue pour l'autopsie. Les différentes anomalies observées au cours des gestations de clones sont répertoriées.

La naissance des clones est prévue à l'avance et des césariennes sont toujours programmées. Les vaches porteuses reçoivent une injection de 20 mg de dexaméthasone avant l'intervention.

2. Veaux témoins

Les veaux témoins sont issus d'insémination artificielle. Ils sont choisis de manière à être de même niveau génétique que les clones. Ils sont élevés dans les mêmes conditions que les clones.

L'échantillon de veaux témoins est inférieure en nombre à celui des clones. En effet, peu de témoins étaient disponibles en 2001, ce qui réduit le groupe témoin. Cependant, il s'agit d'une étude en cours, et d'autres témoins, que nous n'avons pas pu prendre en compte dans notre étude, pourront être utilisés ultérieurement.

Nous avons envisagé de prendre comme témoins des veaux issus de FIV pour agrandir notre échantillon témoin, mais l'analyse statistique a montré qu'ils étaient différents des témoins d'IA pour les paramètres étudiés, et ne pouvaient donc pas être inclus dans le groupe témoin. Nous les avons donc éliminés de l'étude.

3. Conditions de traitement

Dès la naissance, les veaux sont suivis régulièrement et examinés matin et soir au moment de la buvée. Les observations (quantité de lait bue, température, traitements éventuels...) sont notées sur les feuilles de suivi clinique. Le poids de naissance ainsi que les pesées suivantes sont également relevés. Tous les veaux reçoivent systématiquement une injection d'une suspension d'ampicilline et de colistine au cours de la première semaine.

Tous les animaux sont soumis aux mêmes conditions d'élevage : logement, alimentation... Les jeunes veaux sont d'abord placés dans des boxes individuels paillés, puis ils sont regroupés à plusieurs dans des aires paillées avec cornadis.

En cas de maladie, les veaux sont soumis à un traitement approprié en fonction de la pathologie : antibiotiques, anti-inflammatoires, réhydratants oraux, perfusion de solutés glucosés, shampooings en cas de problèmes cutanés...

B. Matériels et méthodes

1. Echantillons sanguins et méthodes d'analyse

Les prises de sang sont effectuées par ponction de la veine jugulaire dans des tubes sous vide. L'anticoagulant utilisé est l'E.D.T.A. pour l'hématologie. Les échantillons sanguins pour la biochimie sont prélevés sur tube sec. Pour la glycémie, la mesure se fait directement auprès du veau, sur sang total, à l'aide d'un glucomètre.

Les analyses hématologiques et biochimiques 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 sont effectuées par le laboratoire d'analyses médicales d'Arpajon utilisant les méthodes habituelles. Brièvement, les comptages cellulaires sont effectués par un analyseur d'hématologie automatique (Cell Dyn 3000 ; Abbot Laboratories, Rungis, France), et le dénombrement des différents 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 sont réalisées en utilisant un analyseur Koné 30i (Koné Instruments, Espoo, Finland) avec les réactifs Koné.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à certains paramètres de la numération et formule sanguine :

- hématoците
- taux d'hémoglobine
- volume globulaire moyen
- nombre de lymphocytes et leur pourcentage dans la formule leucocytaire
- nombre de monocytes et leur pourcentage dans la formule leucocytaire
- nombre de neutrophiles et leur pourcentage dans la formule leucocytaire

Nous voulions aussi étudier le nombre d'érythrocytes et de plaquettes, mais le laboratoire nous a indiqué que ces paramètres n'étaient pas fiables ; en effet, pour certains animaux, les thrombocytes étaient confondus avec les érythrocytes, ce qui donnait des numérations erronées. Nous avons donc décidé d'éliminer ces deux paramètres de l'étude.

Nous avons également étudié la glycémie, l'urémie, la créatininémie et le taux de fibrinogène.

2. Prises de sang

Les veaux clonés ou témoins de cette étude sont également utilisés pour d'autres recherches. Les prises de sang sont donc effectuées à intervalles de temps réguliers variant selon les expériences.

Pour notre étude, nous avons étudié sept prélèvements par animal, à J1, J4, J11, J21, J35, J49 et J63 après la naissance. Certains prélèvements sont manquants, soit parce que l'animal est mort, soit parce que les prises de sang n'ont pas été faites à ce moment là. Pour qu'un veau puisse être inclus dans l'étude, il faut au moins trois prélèvements sur les sept.

Pour l'urée et la créatinine, il n'y a en général qu'une valeur par animal, car ces paramètres ne sont analysés qu'à J1.

Pour la glycémie, la mesure est réalisée avant la buvée, qui a lieu deux fois par jour.

3. Analyses statistiques

Les données ont été traitées par le logiciel SAS (Statistic Analysis System, 1998). Les tests utilisés sont :

- l'analyse de variance (proc mixed, Littell *et al.*, 1998) pour les différents paramètres hématologiques et biochimiques. Nous avons testé sur ces variables l'effet clone, l'effet du jour de prélèvement et l'interaction combinée des deux (clone*prise de sang).

- Le test t de Student pour le poids de naissance, l'urémie et la créatininémie. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ajustées (Moyenne des moindres carrés ou Lsmeans) ± erreur standard sur la moyenne.

II. Résultats

A. Etude clinique

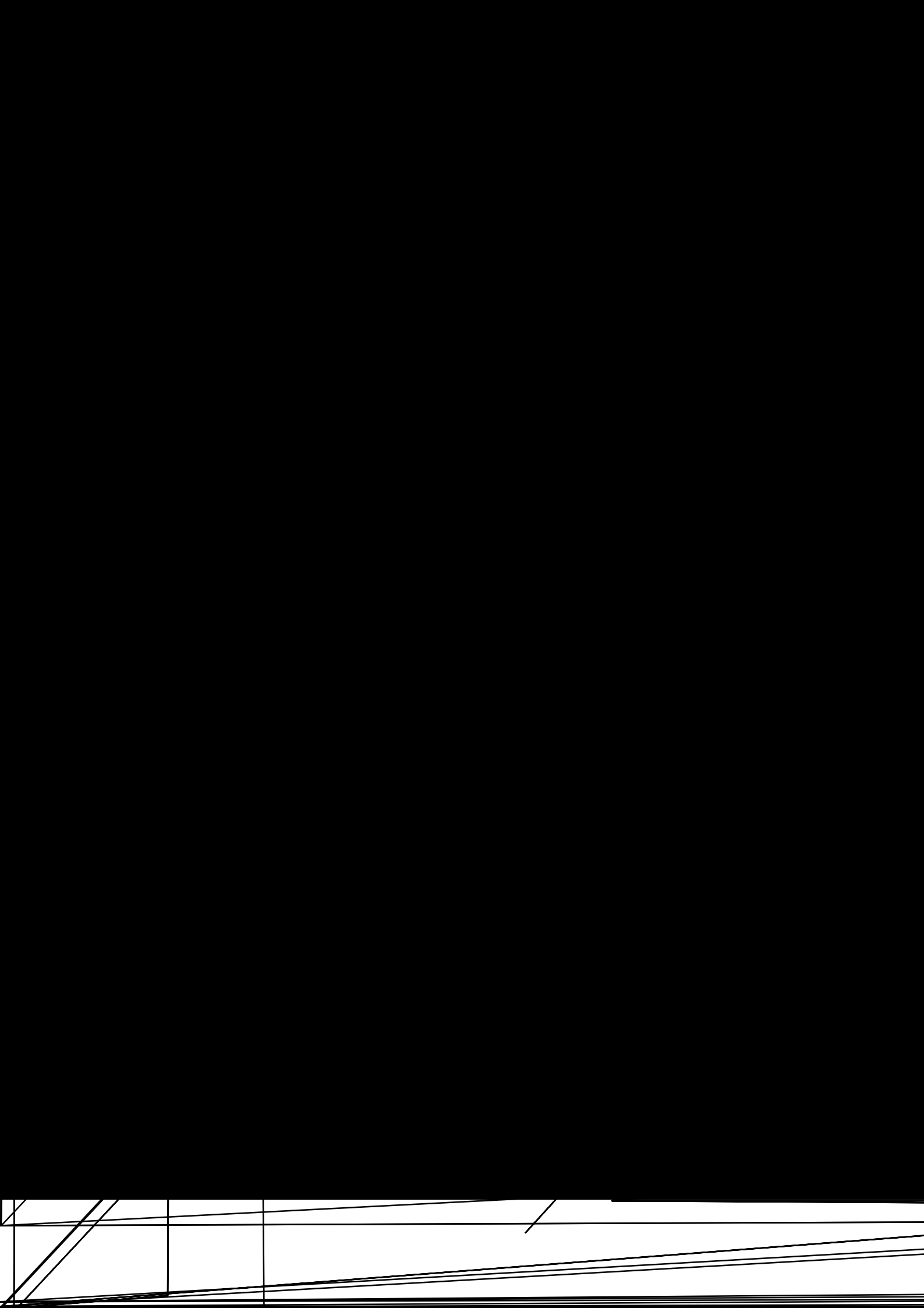
Cette étude porte sur 35 clones et 15 témoins.

1. Taux de survie

Le tableau 11 et la figure 1 présentent le taux de survie des clones nés en 2001 et 2002. En 2001, sur 14 clones, 6 ont survécu (43%) et 8 sont morts (57%). Les témoins 2001 ont tous survécu. En 2002, sur 21 clones, 15 ont survécu (71%) et 6 sont morts (29%). Le taux de survie est donc meilleur qu'en 2001. Les témoins 2002 ont tous survécu.

TABLEAU 11 : Taux de survie des clones nés en 2001 et 2002

Nombre de clones nés en 2001 ayant survécu	6	43 %
Nombre de clones morts en 2001	8	57 %
TOTAL 2001	14	100 %
Nombre de clones nés en 2002 ayant survécu	15	71%
Nombre de clones morts en 2002	6	29 %
TOTAL 2002	21	100 %
TOTAL vivants 2001/2002	21	60 %
TOTAL morts 2001/2002	14	40 %



Numéro	Date de naissance	Date de la mort	Autopsie	Anomalies cliniques
103	10-janv-01	mort à 36 H	cotylédons très gros, début d'hydroallantoïde	réflexe de succion absent puis faible
112	01-mars-01	mort subite à 119 j	augmentation du liquide amniotique	-
121	04-avr-01	mort à 22 jours, le 26/04/01	atrophie du thymus	problème de thermorégulation
122	11-avr-01	euthanasie à 28 jours, le 09/05/01	atrophie du thymus, caillots dans l'abdomen et le thorax, coeur flasque, oedème des oreillettes	-
186	18-juil-01	mort à 1 jour, le 19/07/01	LOS	hernie ombilicale, oedème du cou, difficultés respiratoires avec beaucoup de glaires
187	18-juil-01	mort à 4 jours, le 22/07/01	-	hyperthermie
188	18-juil-01	mort à 2 jours, le 20/07/01	reins en partie lysés: non fonctionnels	petite hernie ombilicale
189	19-juil-01	mort à 2 jours, le 21/07/01	sténose pylorique, atélectasie des lobes antérieurs des poumons	difficultés à déglutir, hernie ombilicale
211	31-janv-02	mort dans la 1 ^{ère} journée	LOS	-
216	01-mars-02	mort dans la 1 ^{ère} journée	stéatose, rein anormal	difficultés respiratoires
227	13-avr-02	mort à 10 H	-	hémorragie interne
2257	28-nov-02	mort à 26 jours, le 24/12/02	-	-
2260	04-déc-02	mort à 25 jours, le 29/12/02	-	opération ombilic
2263	16-déc-02	euthanasie à 4 jours, le 20/12/02	-	oreille droite tordue, cou bloqué ne pouvant pas tourner à droite et incliné vers le bas, anomalies des 4 membres, atrophie de la queue

- : rien de notable

Au bilan, nous avons rencontré chez les clones qui n'ont pas survécu des anomalies très variées : problèmes de placentation, atrophie du thymus, anomalies cardiaques, difficultés

respiratoires, veaux mous avec absence de réflexe de tétée, anomalies rénales, malformations morphologiques.

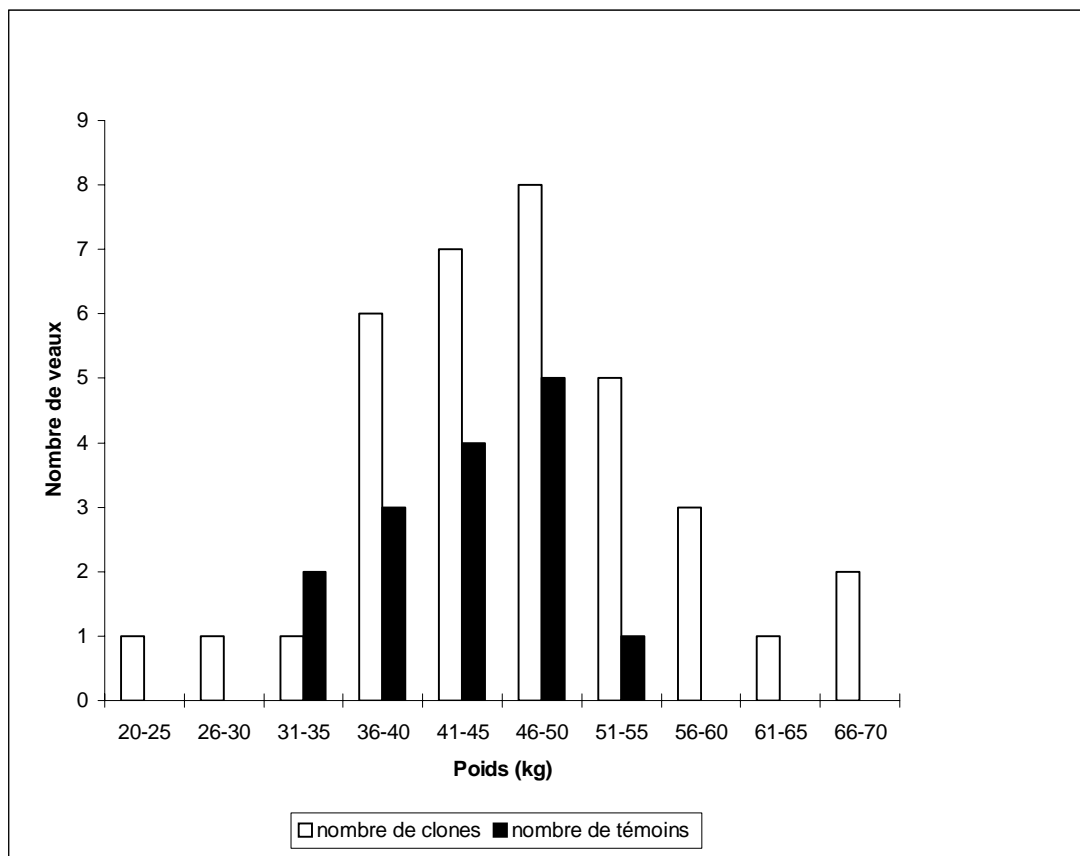
Les témoins ont tous survécu et n'ont présenté aucune anomalie clinique. On note donc une plus forte mortalité néonatale chez les clones que chez les témoins, s'accompagnant d'un taux d'anomalies plus important.

2. Poids de naissance

L'annexe 2 présente le poids de naissance des 35 clones et des 15 témoins de l'étude.

La figure 2 montre la répartition du poids de naissance des clones et des témoins. On note que les poids de naissance des témoins sont centrés entre 34 et 51 kg, tandis que les poids de naissance des clones se répartissent de façon beaucoup plus large, de 23 à 68 kg.

FIGURE 2 : Répartition du poids de naissance de 35 clones et 15 témoins



Le test de Student appliqué à la comparaison des poids de naissance chez les clones et les témoins donne un résultat non significatif à 5% ($p=0,084$). Il n'y a donc pas de différence

significative pour le poids de naissance entre les clones et les témoins (tableau 13). Cependant, la répartition des différents poids de naissance se fait de manière beaucoup plus large chez les clones, qui ont un écart-type nettement plus élevé que les témoins.

TABLEAU 13 : Poids de naissance moyen et erreur standard chez 35 clones et 15 témoins

Variable	Témoins n=15	Clones n=35	p
Poids de naissance (kg)	43 ± 5,34	47 ± 10,01	0,084

3 .Caractéristiques cliniques des veaux obtenus

Les anomalies cliniques des clones qui sont morts ont été détaillées en 1. Chez les clones qui ont survécu, on ne note pas de problèmes particuliers. Les clones 130 et 131 avaient une hernie ombilicale. Le veau 197 a présenté une diarrhée avec du sang, mais cela s'est résolu rapidement à l'aide d'un traitement classique : réhydratation par voie orale (CORYDIET[®]), antibiotiques (PENHISTASTREP[®]). Les clones 234 et 239 ont présenté des dépilations. Pour tous les autres veaux, il n'y a rien de particulier à signaler.

Il faut cependant noter que certains clones (nombre non encore communiqué car étude en cours) ont présenté plus tardivement (à partir de 8 mois, donc en dehors du cadre de notre étude) de la teigne, des dépilations à différents endroits du corps, et des masses ressemblant à des papillomes, pouvant atteindre plusieurs centimètres de diamètre.

B. Etude hématologique et biochimique

Cette étude porte sur 23 clones et 12 témoins. En effet, certains clones ne sont pas inclus dans cette étude soit parce qu'ils sont morts trop tôt, soit parce qu'ils manquent des données les concernant. Or, comme nous l'avons vu précédemment, il faut au moins trois analyses pour qu'un veau puisse être pris en compte ici.

Les annexes 3, 4 et 5 présentent les résultats des prises de sang de tous les veaux pour les sept prélèvements.

1. Résultats hématologiques

a. Lignée rouge

- Hémoglobine

- Témoins

Les valeurs obtenues dans notre échantillon témoin sont conformes à celles que l'on trouve dans la littérature (voir plus haut). A la naissance, le taux d'hémoglobine moyen est de $11,25 \pm 0,46$ g/dL (tableau 14). Il n'y a pas de différences significatives pour le taux d'hémoglobine des témoins d'une prise de sang à l'autre. Il semble qu'il n'y ait donc pas d'évolution du taux d'hémoglobine des témoins au cours des deux premiers mois. Le taux d'hémoglobine moyen des témoins sur les sept prises de sang est de $11,19 \pm 0,31$ g/dL, ce qui est dans les normes pour l'espèce bovine.

- Clones

Le taux d'hémoglobine moyen des clones sur les sept prises de sang est de $9,41 \pm 0,21$ g/dL, ce qui est dans les normes. A la naissance, le taux d'hémoglobine moyen est de $8,22 \pm 0,28$ g/dL, ce qui est dans les normes inférieures pour le veau. Il augmente progressivement au cours des deux premiers mois pour atteindre $9,58 \pm 0,28$ g/dL à 3 semaines et $10,55 \pm 0,31$ g/dL à 2 mois. Il y a une différence significative ($p < 0,0001$) pour le taux d'hémoglobine entre la valeur obtenue à la deuxième prise de sang (J4) et celle de la troisième prise de sang (J11). En effet, le taux d'hémoglobine moyen passe de $8,44 \pm 0,28$ à $9,35 \pm 0,28$ g/dL, ce qui représente une augmentation de 1 g/dL. Il y a également une différence significative ($p = 0,033$) pour le taux d'hémoglobine entre les prises de sang 6 (J49) et 7 (J63) : le taux d'hémoglobine moyen subit une augmentation de 0,5 g/dL (tableau 14).

- Comparaison clones/témoins

Il y a une différence hautement significative ($p < 0,0001$) pour le taux d'hémoglobine moyen entre les clones ($9,41 \pm 0,21$ g/dL) et les témoins ($11,19 \pm 0,31$ g/dL) sur les différentes prises de sang. Les valeurs obtenues pour les clones sont significativement inférieures à celles des témoins, jusqu'à 35 jours. A J49 et J63, la différence n'est plus significative, même si les valeurs des clones sont toujours inférieures à celles des témoins (figure 3).

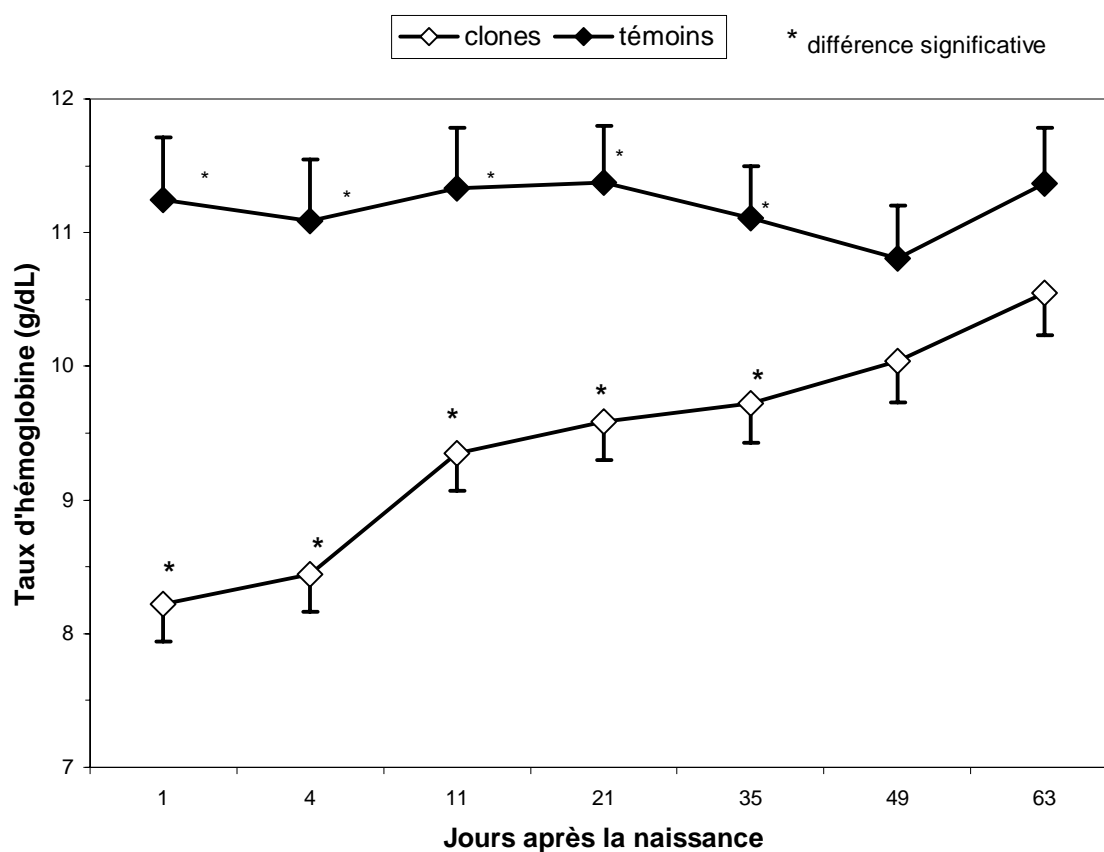
L'effet d'interaction clone*prise de sang n'est pas significatif, donc l'effet clone est le même pour toutes les prises de sang (taux d'hémoglobine toujours inférieur à celui des témoins).

De plus, l'évolution du taux d'hémoglobine au cours du temps est différente pour les clones et pour les témoins : le taux augmente chez les clones au cours des deux premiers mois, tout en restant toujours inférieur à celui des témoins, tandis qu'il reste stable chez les témoins (figure 3).

TABLEAU 14 : Taux d'hémoglobine moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	Taux d'hémoglobine des clones (g/dL) ± Erreur Standard	Taux d'hémoglobine des témoins (g/dL) ± Erreur Standard
1	8,22 ± 0,28	11,24 ± 0,46
4	8,44 ± 0,28	11,09 ± 0,46
11	9,35 ± 0,28	11,33 ± 0,45
21	9,58 ± 0,28	11,37 ± 0,43
35	9,72 ± 0,30	11,11 ± 0,39
49	10,04 ± 0,31	10,81 ± 0,39
63	10,55 ± 0,31	11,37 ± 0,42

FIGURE 3 : Taux d'hémoglobine moyen chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



- Hématocrite
 - Témoins

Les valeurs obtenues dans notre échantillon témoin sont conformes à celles que l'on trouve dans la littérature (voir le tableau 6). Il n'y a pas de différences significatives pour les valeurs de l'hématocrite d'une prise de sang à l'autre. L'hématocrite des témoins ne varie donc pas au cours du temps jusqu'à 63 jours. L'hématocrite moyen des témoins sur les sept prises de sang est de $37,82 \pm 1,02\%$.

➤ Clones

A la naissance l'hématocrite moyen est de $27,39 \pm 0,98\%$, ce qui est dans les normes pour le veau (tableau 6). Il augmente régulièrement au cours des deux premiers mois, pour atteindre $33,22 \pm 0,99\%$ à 3 semaines et $36,47 \pm 1,12\%$ à 2 mois. Il y a une différence significative ($p < 0,0001$) pour l'hématocrite entre la deuxième (J4) et la troisième prise de sang (J11), ainsi qu'entre la troisième et la quatrième (J21) ($p = 0,035$) : l'hématocrite augmente alors de manière significative (tableau 15).

L'hématocrite moyen des clones sur toutes les prises de sang est de $32,45 \pm 0,70\%$.

➤ Comparaison clones/témoins

Il y a une différence hautement significative ($p < 0,0001$) pour l'hématocrite moyen entre les clones ($32,45 \pm 0,70\%$) et les témoins ($37,82 \pm 1,02\%$) sur les différentes prises de sang. L'hématocrite des clones est significativement inférieur à celui des témoins jusqu'à J35. A J49 et J63, la différence n'est plus significative, mais l'hématocrite des clones reste inférieur à celui des témoins.

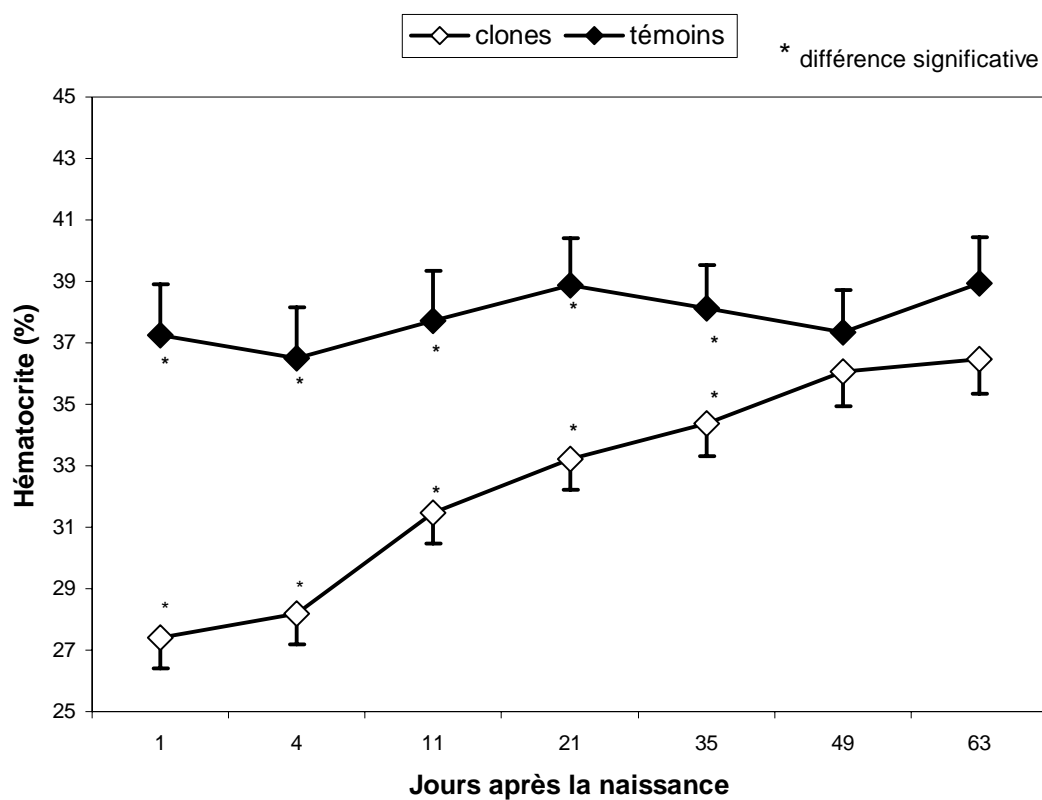
L'effet d'interaction clone*prise de sang n'est pas significatif, donc l'effet clone est le même pour toutes les prises de sang (hématocrite toujours inférieur à celui des témoins).

L'évolution de l'hématocrite au cours du temps est différente pour les clones et pour les témoins : pour les clones, l'hématocrite augmente de la naissance à 63 jours, tandis que pour les témoins, il reste stable (tableau 15, figure 4).

TABLEAU 15 : Hématocrite moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	Hématocrite des clones (%) ± Erreur Standard	Hématocrite des témoins (%) ± Erreur Standard
1	27,39 ± 0,98	37,26 ± 1,66
4	28,18 ± 0,98	36,51 ± 1,64
11	31,46 ± 0,98	37,72 ± 1,61
21	33,22 ± 0,99	38,87 ± 1,55
35	34,37 ± 1,06	38,13 ± 1,41
49	36,05 ± 1,10	37,34 ± 1,40
63	36,47 ± 1,12	38,94 ± 1,50

FIGURE 4 : Hématocrite moyen chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



- Volume Globulaire Moyen

➤ Témoins

Le VGM des témoins est conforme aux normes trouvées dans la littérature. Il diminue régulièrement au cours des deux premiers mois, mais seules deux diminutions sont significatives : entre J1 et J4 ($p=0,048$) et entre J11 et J21 ($p=0,009$). Le VGM moyen des témoins sur les sept prises de sang est de $43,16 \pm 0,84 \mu\text{m}^3$.

➤ Clones

Le VGM des clones est également conforme aux valeurs trouvées dans la littérature pour le veau. Il diminue de manière significative d'une prise de sang à l'autre, sauf entre J4 et J11 et entre J49 et J63, où on note tout de même une diminution mais qui n'est pas significative. Le VGM moyen des clones sur les sept prises de sang est de $42,98 \pm 0,60 \mu\text{m}^3$.

➤ Comparaison clones/témoins

Il n'y a pas de différence significative pour le VGM entre les clones et les témoins sur l'ensemble des prises de sang ($p=0,862$). Il n'y a aucune prise de sang pour laquelle la différence entre les 2 groupes est significative.

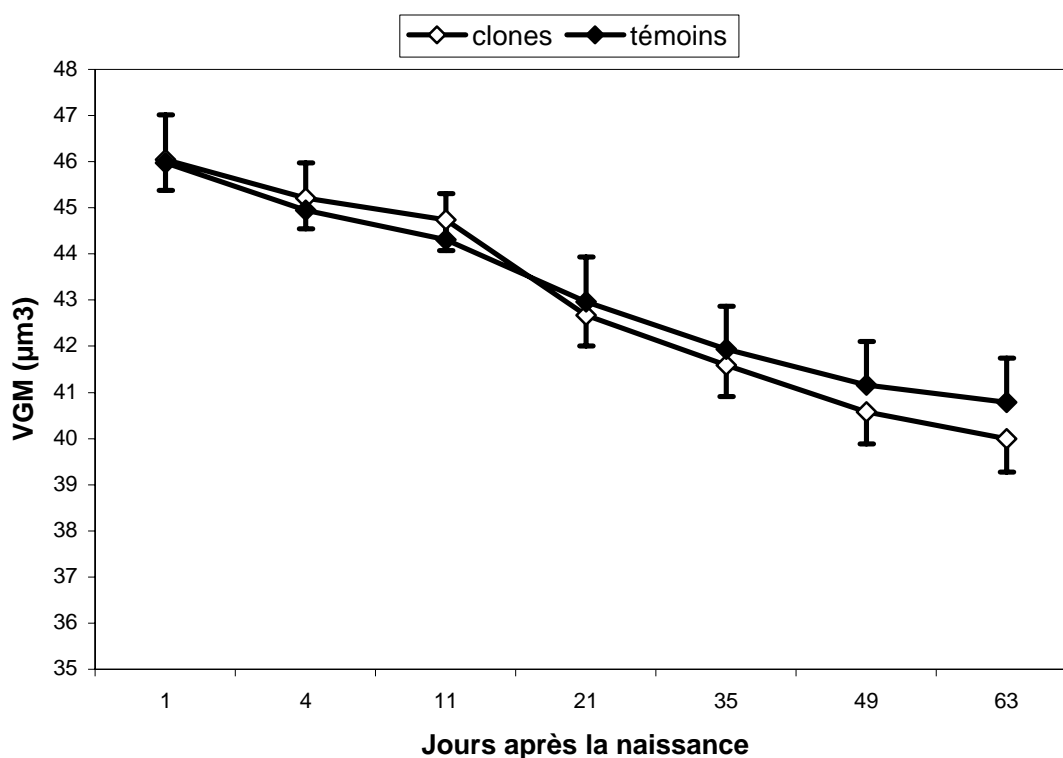
L'interaction clone*prise de sang n'est pas significative ($p=0,918$).

Dans les 2 groupes, le VGM diminue régulièrement au cours des deux premiers mois (tableau 16, figure 5).

TABLEAU 16 : Volume Globulaire Moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	VGM chez les clones (μm^3) \pm erreur standard	VGM chez les témoins (μm^3) \pm erreur standard
1	46,04 \pm 0,66	45,97 \pm 1,05
4	45,21 \pm 0,66	44,95 \pm 1,03
11	44,74 \pm 0,66	44,31 \pm 1,00
21	42,67 \pm 0,67	42,96 \pm 0,97
35	41,59 \pm 0,68	41,94 \pm 0,93
49	40,58 \pm 0,70	41,17 \pm 0,93
63	39,99 \pm 0,72	40,80 \pm 0,96

FIGURE 5 : Volume Globulaire Moyen chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



b. Lignée blanche

- Numération lymphocytaire

➤ Témoins

A la naissance, la numération lymphocytaire des témoins est de $1943,56 \pm 596,27 /\mu\text{L}$, ce qui est un peu inférieur aux valeurs que l'on trouve dans la littérature. Elle augmente ensuite pour être significativement plus élevée à 4 jours ($p=0,049$), où elle atteint $3118,25 \pm 594,87 /\mu\text{L}$, ce qui est dans les normes de l'espèce pour cet âge. Jusqu'à 63 jours, elle subit quelques variations, mais qui ne sont pas significatives. De 21 à 63 jours, la numération lymphocytaire est dans les normes pour l'espèce bovine, mais est un peu faible par rapport à l'âge des veaux (tableau 6). La numération lymphocytaire moyenne des témoins sur les sept prises de sang est de $3439,63 \pm 336,20/\mu\text{L}$.

➤ Clones

A la naissance, la numération lymphocytaire des clones est de $1955,96 \pm 353,16 /\mu\text{L}$, ce qui est un peu inférieur aux valeurs que l'on trouve dans la littérature. Elle augmente jusqu'à 4 jours, où elle est significativement plus élevée ($p=0,002$) (tableau 17). Jusqu'à 63 jours, elle subit de légères variations, mais qui ne sont pas significatives. De 21 à 63 jours, la numération lymphocytaire des clones est dans les normes pour l'espèce bovine (tableau 7), mais est un peu faible étant donné l'âge des veaux (tableau 6). La numération lymphocytaire moyenne des clones sur toutes les prises de sang est de $2842,68 \pm 229,20/\mu\text{L}$.

➤ Comparaison clones/témoins

Il n'y a pas de différence significative ($p=0,144$) pour la numération lymphocytaire moyenne entre les clones ($2842,68 \pm 229,20/\mu\text{L}$) et les témoins ($3439,63 \pm 336,20/\mu\text{L}$) sur l'ensemble des prises de sang. Il n'y a aucune prise de sang pour laquelle la différence entre les 2 groupes est significative.

De plus, l'interaction clone*prise de sang n'est pas significative ($p=0,778$) donc l'effet clone est le même pour toutes les prises de sang (courbe des clones en dessous de celle des témoins à chaque point).

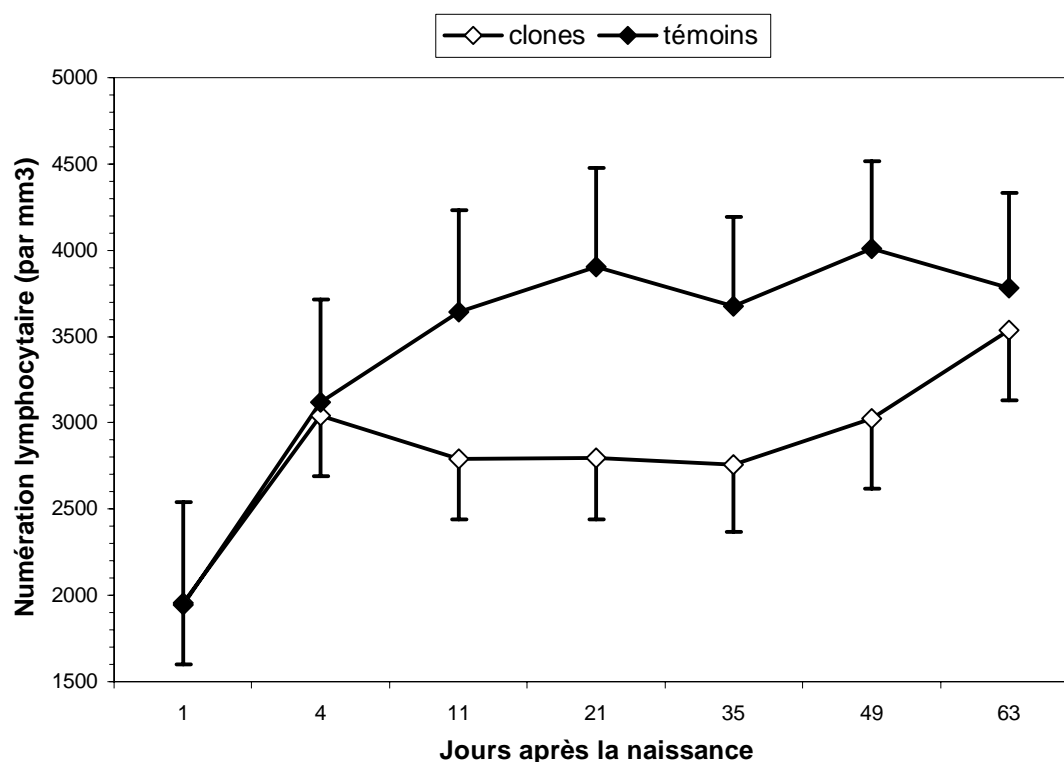
Dans les 2 groupes, la numération lymphocytaire est un peu basse à la naissance, puis augmente jusqu'à 4 jours, pour rester ensuite à peu près stable (tableau 17, figure 6).

TABLEAU 17 : Numération lymphocytaire moyenne et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	Numération lymphocytaire des clones ($/\mu\text{L}$) \pm Erreur Standard	Numération lymphocytaire des témoins \pm Erreur
--------------------------	--	---

		Standard
1	1955,96 ± 353,16	1943,56 ± 596,27
4	3042,13 ± 353,16	3118,25 ± 594,87
11	2792,22 ± 353,16	3642,34 ± 590,36
21	2797,35 ± 359,01	3906,37 ± 573,35
35	2754,88 ± 388,81	3673,83 ± 517,73
49	3022,03 ± 402,57	4009,83 ± 505,02
63	3534,21 ± 405,97	3783,24 ± 548,96

FIGURE 6 : Numération lymphocytaire moyenne chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



- Pourcentage de lymphocytes dans la numération leucocytaire

➤ Témoins

A la naissance, le pourcentage de lymphocytes des témoins est de $21,60 \pm 5,01\%$, ce qui est inférieur aux normes de l'espèce trouvées dans la littérature (tableau 8). Il augmente pour être significativement plus élevé à 4 jours ($p=0,0009$), où il atteint $41,96 \pm 5,01\%$. Il

varie ensuite jusqu'à 63 jours, mais ne subit qu'une deuxième augmentation significative ($p=0,004$) entre J11 et J21, où il passe de $38,75 \pm 5,00$ à $56,43 \pm 4,95\%$ (tableau 18).

D'une manière générale, le pourcentage de lymphocytes des témoins est inférieur aux normes entre J1 et J11. De J21 à J63, il est dans les normes pour l'espèce bovine, mais devrait être un peu plus élevé, étant donné l'âge des animaux.

Le pourcentage moyen de lymphocytes chez les témoins sur tous les prélèvements est de $44,07 \pm 2,30 \%$.

➤ Clones

A la naissance, le pourcentage de lymphocytes des clones est de $13,17 \pm 2,95\%$, ce qui est bien inférieur aux valeurs trouvées dans la littérature (tableau 8). Il augmente jusqu'à 4 jours, où il est significativement plus élevé ($p<0,0001$) et atteint $34,04 \pm 2,95\%$. Il subit ensuite des fluctuations jusqu'à 2 mois (seule augmentation significative de J11 à J21, $p=0,002$).

Le pourcentage de lymphocytes des clones est inférieure aux normes de l'espèce jusqu'à J11. A partir de là, il rentre dans les normes inférieures pour les bovins, mais est faible compte tenu de l'âge des animaux.

Le pourcentage moyen de lymphocytes chez les clones sur tous les prélèvements est de $38,98 \pm 1,54 \%$.

➤ Comparaison clones/témoins

Il n'y a pas de différence significative pour le pourcentage de lymphocytes entre les clones ($38,98 \pm 1,54\%$) et les témoins ($44,07 \pm 2,30\%$) sur les différentes prises de sang ($p=0,068$).

De plus, l'interaction clone*prise de sang n'est pas significative ($p=0,88$), donc l'effet clone est le même quelle que soit la prise de sang : la courbe des clones est toujours sous celle des témoins (figure 7).

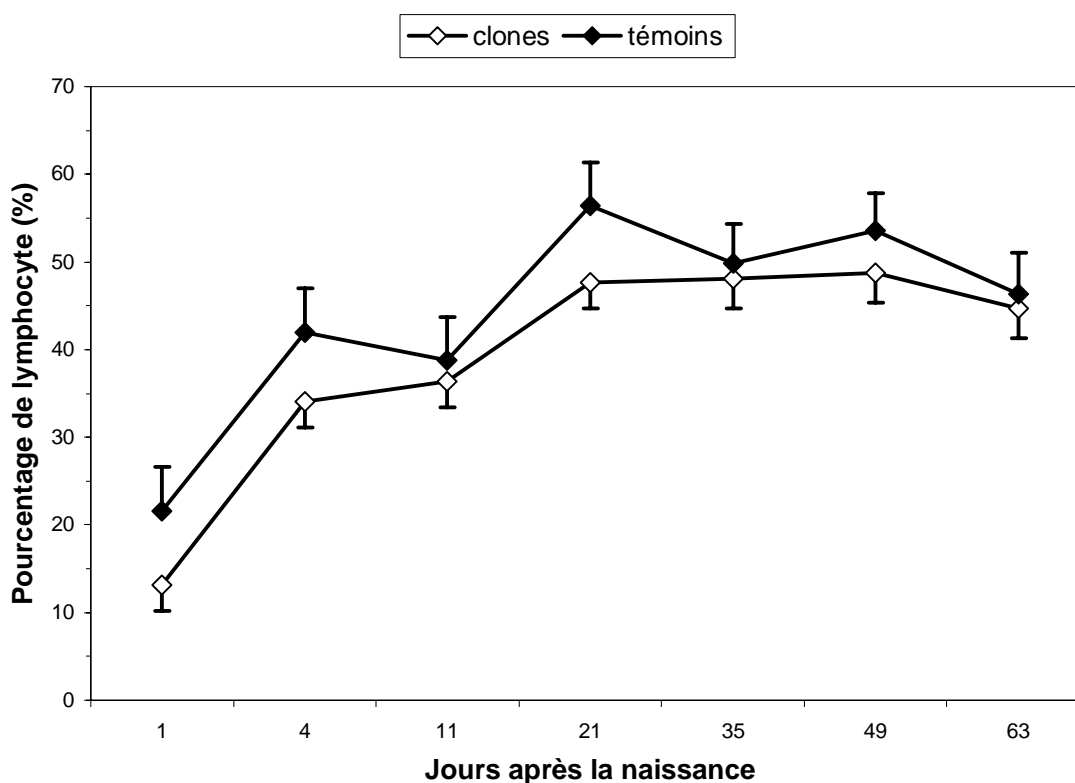
Dans les deux groupes, le pourcentage de lymphocytes augmente globalement au cours des 2 premiers mois (tableau 18, figure 7), mais reste un peu faible étant donné le jeune âge des veaux.

TABLEAU 18 : Pourcentage de lymphocytes moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	Pourcentage de	Pourcentage de
--------------------------	----------------	----------------

	lymphocytes des clones (%) ± Erreur Standard	lymphocytes des témoins (%) ± Erreur Standard
1	13,17 ± 2,95	21,60 ± 5,01
4	34,04 ± 2,95	41,96 ± 5,01
11	36,39 ± 2,95	38,75 ± 5,00
21	47,70 ± 3,01	56,43 ± 4,95
35	48,06 ± 3,31	49,85 ± 4,43
49	48,76 ± 3,42	53,56 ± 4,26
63	44,71 ± 3,43	46,35 ± 4,69

FIGURE 7 : Pourcentage de lymphocytes moyen chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



- Numération des neutrophiles

- Témoins

Pour chaque prise de sang, la numération des neutrophiles chez les témoins est dans les normes décrites dans la littérature, avec une neutrophilie à la naissance (tableau 19). Il y a une diminution significative ($p=0,002$) de cette numération entre les deux premières prises de

sang : le nombre de neutrophiles est diminué de moitié entre J1 et J4. La numération subit ensuite diverses variations ; une baisse significative ($p=0,021$) est notée entre J11 et J21 (tableau 19).

La numération moyenne des neutrophiles chez les témoins sur les différentes prises de sang est de $4059,61 \pm 1024,89/\mu\text{L}$.

➤ Clones

A la naissance, la numération des neutrophiles chez les clones est très élevée : $11941 \pm 991,39/\mu\text{L}$. Elle baisse de manière significative ($p<0,0001$) entre J1 et J4 : diminution d'un facteur 2,25. Elle se maintient ensuite à des valeurs normales chez le veau jusqu'à J49. De J49 à J63, elle augmente de manière significative ($p=0,017$) pour atteindre $5601,21 \pm 1130,89/\mu\text{L}$, ce qui est un peu élevé (tableau 19).

La numération moyenne des neutrophiles chez les clones sur les différentes prises de sang est de $5109,36 \pm 702,19/\mu\text{L}$.

➤ Comparaison clones/témoins

Il n'y a pas de différence significative pour la numération des neutrophiles entre les clones ($5109,36 \pm 702,19/\mu\text{L}$) et les témoins ($4059,61 \pm 1024,89/\mu\text{L}$) ($p=0,399$) sur l'ensemble des prises de sang. Cependant, à J1, la numération des neutrophiles chez les clones est significativement plus élevée que chez les témoins ($p=0,029$) (tableau 19, figure 8).

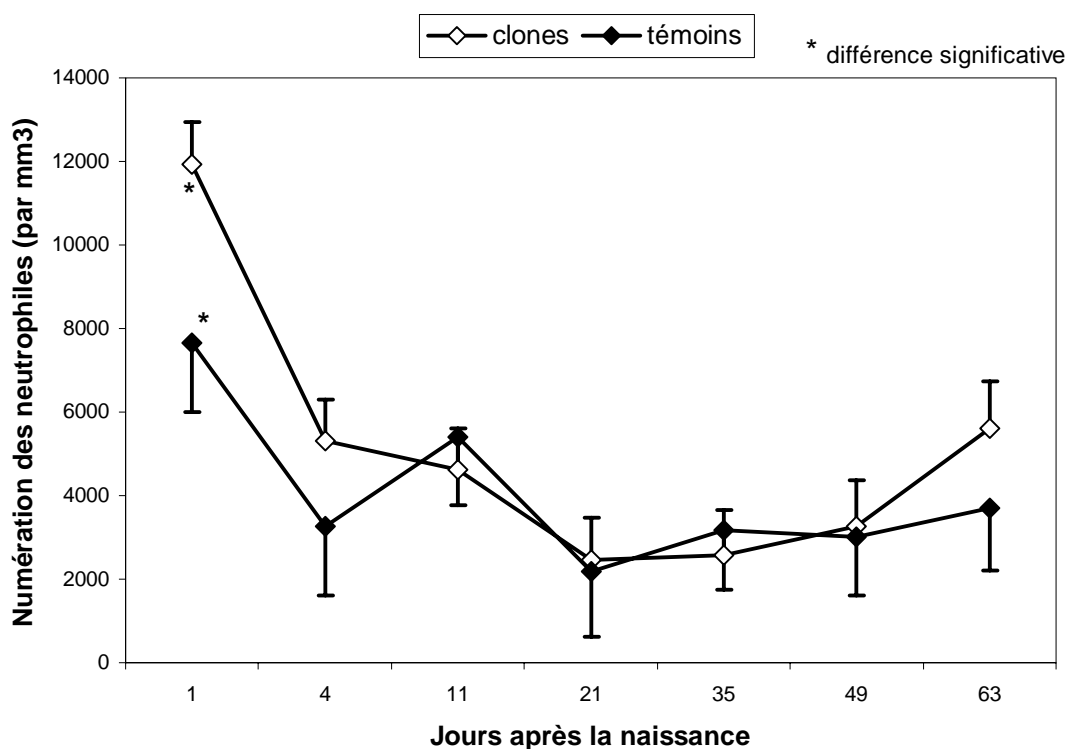
L'interaction clone*prise de sang n'est pas significative ($p=0,274$), donc l'effet clone est le même quelle que soit la prise de sang. Cependant, à J11 et J35, la courbe des clones passe sous celle des témoins (figure 8).

TABLEAU 19 : Numération moyenne des neutrophiles et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	Numération des neutrophiles chez les	Numération des neutrophiles chez les
--------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------

	clones (μL) \pm Erreur Standard	témoins (μL) \pm Erreur Standard
1	11941 \pm 991,39	7661,70 \pm 1672,01
4	5302,52 \pm 991,39	3267,73 \pm 1659,90
11	4627,57 \pm 991,39	5402,58 \pm 1631,22
21	2459,67 \pm 1004,21	2186,09 \pm 1562,03
35	2578,23 \pm 1072,45	3175,34 \pm 1428,47
49	3255,44 \pm 1113,71	3014,38 \pm 1407,99
63	5601,21 \pm 1130,89	3709,46 \pm 1511,81

FIGURE 8 : Numération moyenne des neutrophiles chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



- Pourcentage de neutrophiles dans la numération leucocytaire

➤ Témoins

L'évolution du pourcentage de neutrophiles chez les témoins dans les 2 premiers mois suit l'évolution de leur numération. On retrouve donc une diminution significative importante entre J1 et J4 ($p < 0,0001$) et une seconde entre J11 et J21 ($p = 0,0005$).

Le pourcentage moyen de neutrophiles chez les témoins au cours des différentes prises de sang est de $47,35 \pm 1,84\%$.

➤ Clones

De même, chez les clones, les évolutions du pourcentage et de la numération des neutrophiles au cours du temps sont similaires (figures 8 et 9). A J1, le pourcentage de neutrophiles est très élevé et atteint plus de 80% (tableau 20).

Le pourcentage moyen de neutrophiles chez les clones au cours des différentes prises de sang est de $50,35 \pm 1,23\%$.

➤ Comparaison clones/témoins

Il n'y a pas de différence significative pour le pourcentage de neutrophiles entre les clones ($50,35 \pm 1,23\%$) et les témoins ($47,35 \pm 1,84\%$) sur l'ensemble des prises de sang ($p=0,178$).

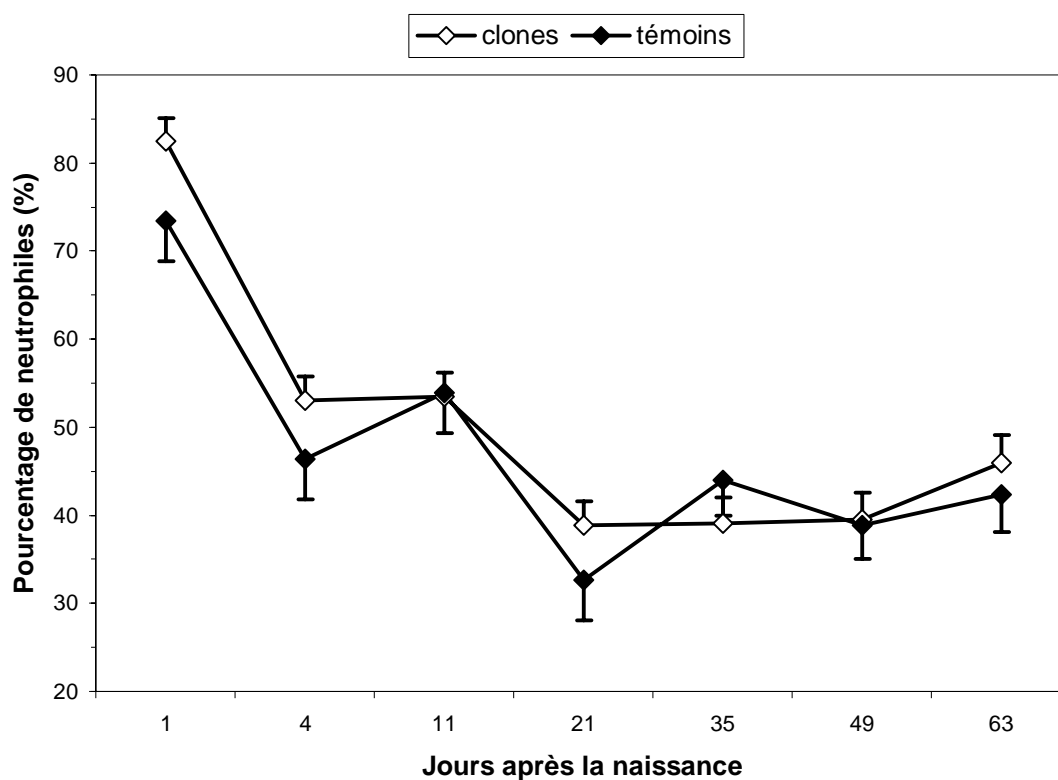
De plus, l'interaction clone*prise de sang n'est pas significative ($p=0,477$), donc l'effet clone est le même pour toutes les prises de sang. Cependant à J35, la courbe des clones passe sous celle des témoins (figure 9).

TABLEAU 20 : Pourcentage moyen de neutrophiles et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	Pourcentage de neutrophiles chez les clones (%) \pm Erreur	Pourcentage de neutrophiles chez les témoins (%) \pm Erreur
--------------------------	--	---

	Standard	Standard
1	82,48 ± 2,67	73,38 ± 4,52
4	53,04 ± 2,67	46,38 ± 4,52
11	53,48 ± 2,67	53,88 ± 4,52
21	38,91 ± 2,73	32,59 ± 4,51
35	39,05 ± 3,01	43,98 ± 4,04
49	39,48 ± 3,10	38,88 ± 3,86
63	45,99 ± 3,10	42,37 ± 4,26

FIGURE 9 : Pourcentage moyen de neutrophiles chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



- Numération monocyttaire

- Témoins

Les valeurs obtenues dans notre échantillon témoin sont conformes à celles que l'on trouve dans la littérature (voir le tableau 6). Il n'y a pas de différences significatives pour la numération monocyttaire d'une prise de sang à l'autre. Cette numération ne varie donc pas de manière importante au cours du temps jusqu'à 63 jours, mais subit seulement des fluctuations

non significatives (tableau 21). La numération moyenne des monocytes chez les témoins sur les sept prises de sang est de $609,13 \pm 105,16/\mu\text{L}$.

➤ Clones

La numération monocyttaire chez les clones est également dans les normes pour chaque prise de sang. Les valeurs de cette numération varient légèrement jusqu'à 2 mois, mais de manière non significative. La numération moyenne des monocytes chez les clones sur les sept prises de sang est de $748,39 \pm 69,95/\mu\text{L}$.

➤ Comparaison clones/témoins

Il n'y a pas de différence significative pour la numération monocyttaire entre les clones ($748,39 \pm 69,95/\mu\text{L}$) et les témoins ($609,13 \pm 105,16/\mu\text{L}$) sur l'ensemble des prises de sang ($p=0,272$).

De plus, l'interaction clone*prise de sang n'est pas significative ($p=0,772$), donc l'effet clone est le même pour toutes les prises de sang. La courbe des clones est toujours au dessus de celle des témoins, sauf à J63 (figure 10).

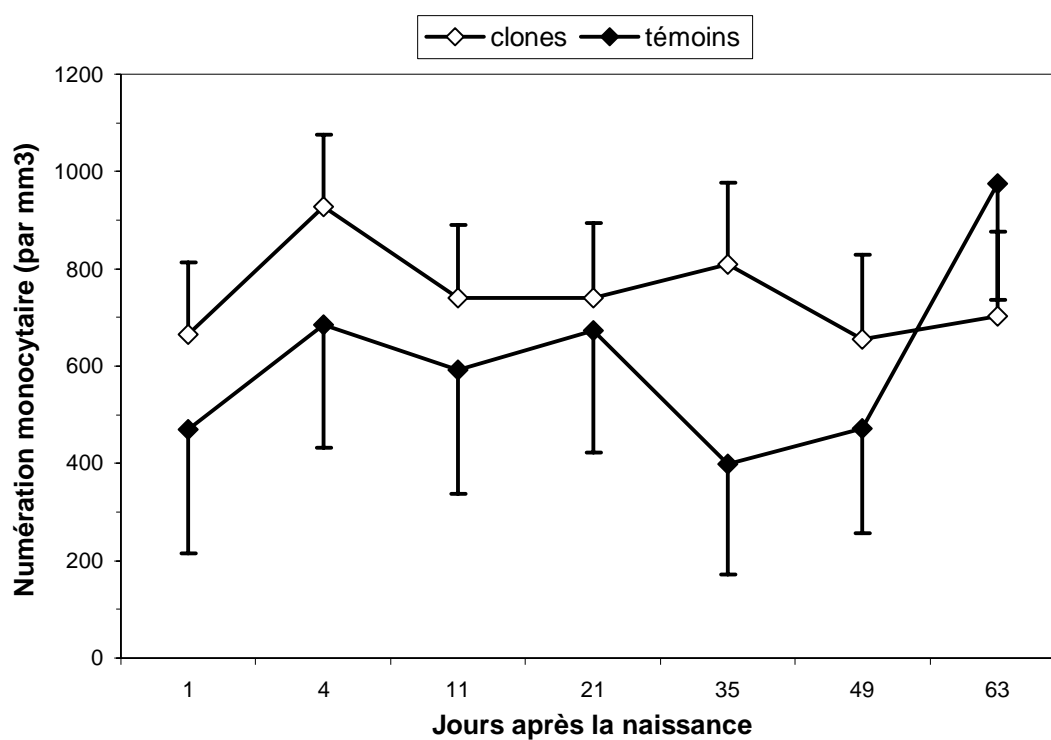
Dans les 2 groupes, la numération monocyttaire subit des variations au cours du temps, mais ne change pas de manière significative (tableau 21, figure 10).

TABLEAU 21 : Numération monocyttaire moyenne et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	Numération monocyttaire des clones (μL) \pm Erreur Standard	Numération monocyttaire des témoins (μL) \pm Erreur Standard
1	$664,35 \pm 149,50$	$469,09 \pm 253,49$

4	926,78 ± 149,50	685,40 ± 253,49
11	740,35 ± 149,50	591,32 ± 253,45
21	741,03 ± 152,76	673,89 ± 252,29
35	808,32 ± 168,51	397,77 ± 225,65
49	654,38 ± 173,59	471,74 ± 215,90
63	703,49 ± 173,74	974,74 ± 238,31

FIGURE 10: Numération monocyttaire moyenne chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



- Pourcentage de monocytes dans la numération leucocytaire

➤ Témoins

Le pourcentage de monocytes chez les témoins fluctue au cours des 2 premiers mois, mais ne subit jamais de variation qui soit significative d'une prise de sang à l'autre.

Le pourcentage moyen de monocytes chez les témoins sur l'ensemble des prises de sang est de $8,20 \pm 1,10\%$.

➤ Clones

A la naissance, le pourcentage de monocytes chez les clones est de $4,04 \pm 1,58\%$. Il augmente de manière significative ($p < 0,0001$) pour atteindre $12,48 \pm 1,58\%$ à 4 jours : il a donc triplé. Il subit ensuite des variations non significatives jusqu'à 63 jours.

Le pourcentage moyen de monocytes chez les clones sur l'ensemble des prises de sang est de $9,81 \pm 0,73\%$.

➤ Comparaison clones/témoins

Il n'y a pas de différence significative pour le pourcentage de monocytes entre les clones ($9,81 \pm 0,73\%$) et les témoins ($8,20 \pm 1,10\%$) sur l'ensemble des prises de sang ($p = 0,226$). Cependant, à J35, le pourcentage de monocytes est significativement plus élevé ($p = 0,038$) chez les clones ($12,57 \pm 1,78\%$) que chez les témoins ($6,34 \pm 2,38\%$), où il est environ deux fois plus faible (tableau 22, figure 11).

L'interaction clone*prise de sang n'est pas significative, donc l'effet clone est globalement le même quelle que soit la prise de sang. On note cependant un changement à J1 et à J63, où la courbe des clones passe sous celle des témoins (figure 11).

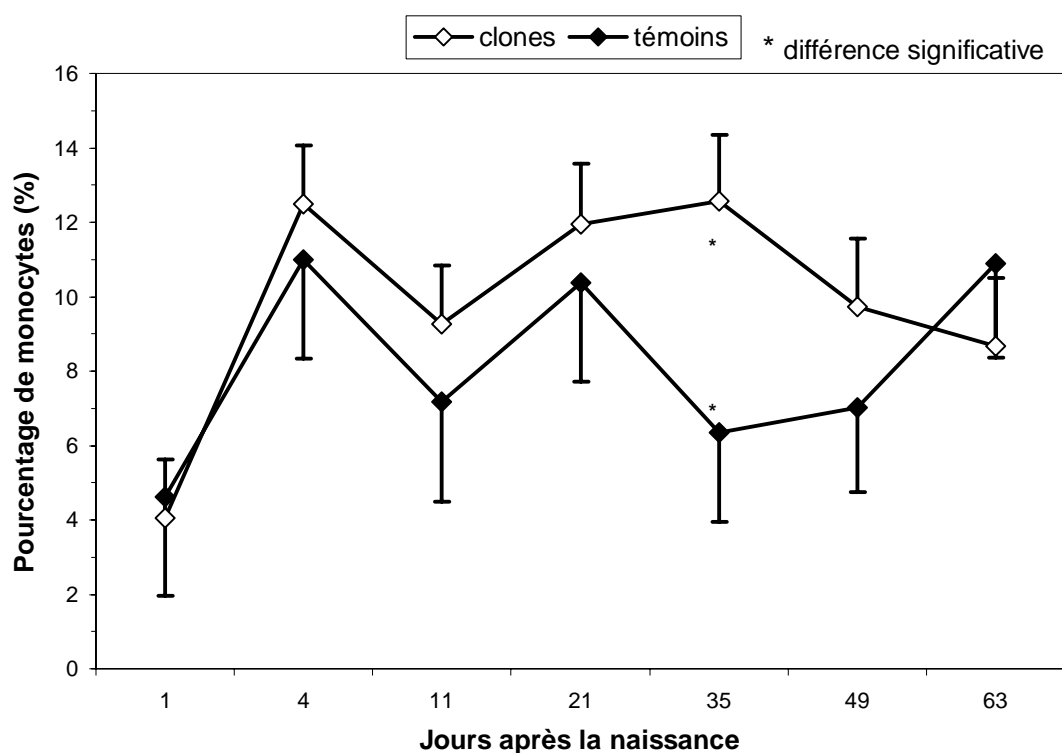
L'évolution du pourcentage de monocytes suit le même profil dans les 2 groupes jusqu'à J21, puis les variations se font en sens inverse pour les clones et pour les témoins, sans que les différences soient significatives, sauf à J35 (tableau 22, figure 11).

TABLEAU 22 : Pourcentage moyen de monocytes et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	Pourcentage de monocytes chez les clones (%) \pm Erreur Standard	Pourcentage de monocytes chez les témoins (%) \pm Erreur Standard
1	$4,04 \pm 1,58$	$4,63 \pm 2,68$

4	12,48 ± 1,58	11,01 ± 2,68
11	9,26 ± 1,58	7,16 ± 2,68
21	11,95 ± 1,61	10,37 ± 2,67
35	12,57 ± 1,78	6,34 ± 2,38
49	9,73 ± 1,83	7,03 ± 2,28
63	8,67 ± 1,83	10,89 ± 2,52

FIGURE 11 : Pourcentage moyen de monocytes chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



2. Résultats biochimiques

a. Glycémie

➤ Témoins

La glycémie des témoins est dans les normes pour le veau sur toutes les prises de sang. Il y a une assez grande variabilité des valeurs selon les individus, car les écart-types sont importants. La glycémie fluctue légèrement au cours du temps, mais les différences ne sont jamais significatives d'une prise de sang à l'autre (tableau 23).

La glycémie moyenne des témoins sur l'ensemble des prises de sang est de $0,92 \pm 0,09$ g/L.

➤ Clones

La glycémie des clones se maintient de façon assez constante au cours des deux premiers mois ; il n'y a pas de différence significative d'une prise de sang à l'autre. Toutes les valeurs sont dans les normes pour le veau.

La glycémie moyenne des clones sur l'ensemble des prises de sang est de $0,96 \pm 0,03$ g/L.

➤ Comparaison clones/témoins

Il n'y a pas de différence significative pour la glycémie entre les clones ($0,96 \pm 0,03$ g/L) et les témoins ($0,92 \pm 0,09$ g/L) sur l'ensemble des prises de sang ($p=0,67$).

L'interaction clone*prise de sang n'est pas significative ($p=0,784$).

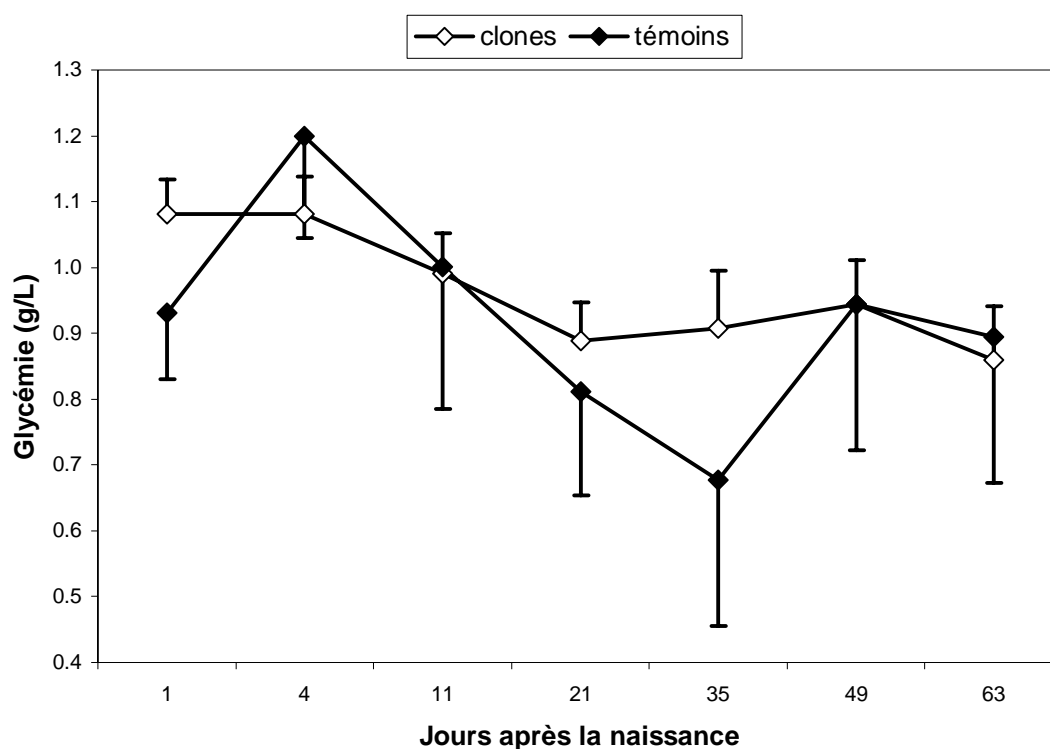
Dans les 2 groupes, il n'y a pas de différence significative d'un prélèvement à l'autre ; cependant la glycémie des clones est encore plus constante que celle des témoins. De plus, les écart-types chez les témoins sont particulièrement importants (tableau 23, figure 12).

TABLEAU 23 : Glycémie moyenne et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	Glycémie des clones (g/L) ± erreur standard	Glycémie des témoins (g/L) ± erreur standard
1	$1,08 \pm 0,05$	$0,93 \pm 0,10$
4	$1,08 \pm 0,06$	$1,20 \pm 0,15$
11	$0,99 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,21$
21	$0,89 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,16$

35	$0,91 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,22$
49	$0,94 \pm 0,07$	$0,94 \pm 0,22$
63	$0,86 \pm 0,08$	$0,89 \pm 0,22$

FIGURE 12 : Glycémie moyenne chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



b. Taux de fibrinogène

➤ Témoins

Le taux de fibrinogène des témoins est dans les normes de l'espèce (tableau 6). Il ne varie pas de manière significative d'une prise de sang à l'autre. Le taux moyen de fibrinogène des témoins sur l'ensemble des prises de sang est de $2,54 \pm 0,18$ g/L.

➤ Clones

Le taux de fibrinogène chez les clones est également conforme aux normes de l'espèce. A la naissance, il est de $1,94 \pm 0,24$ g/L ; il augmente de manière significative à J4 où il atteint $3,92 \pm 0,23$ g/L (tableau 24). Il reste ensuite relativement stable jusqu'à J63, les variations qu'il subit n'étant pas significatives. Le taux moyen de fibrinogène des clones sur l'ensemble des prises de sang est de $3,08 \pm 0,12$ g/L.

➤ Comparaison clones/témoins

Il y a une différence significative pour le taux de fibrinogène entre les clones et les témoins sur l'ensemble des prises de sang ($p=0,015$). Le taux de fibrinogène est significativement plus élevé chez les clones que chez les témoins.

L'interaction clone*prise de sang n'est pas significative ($p=0,102$) ; l'effet clone est donc le même quelle que soit la prise de sang. La courbe des clones est toujours au-dessus de celle des témoins, sauf à J1 (figure 13).

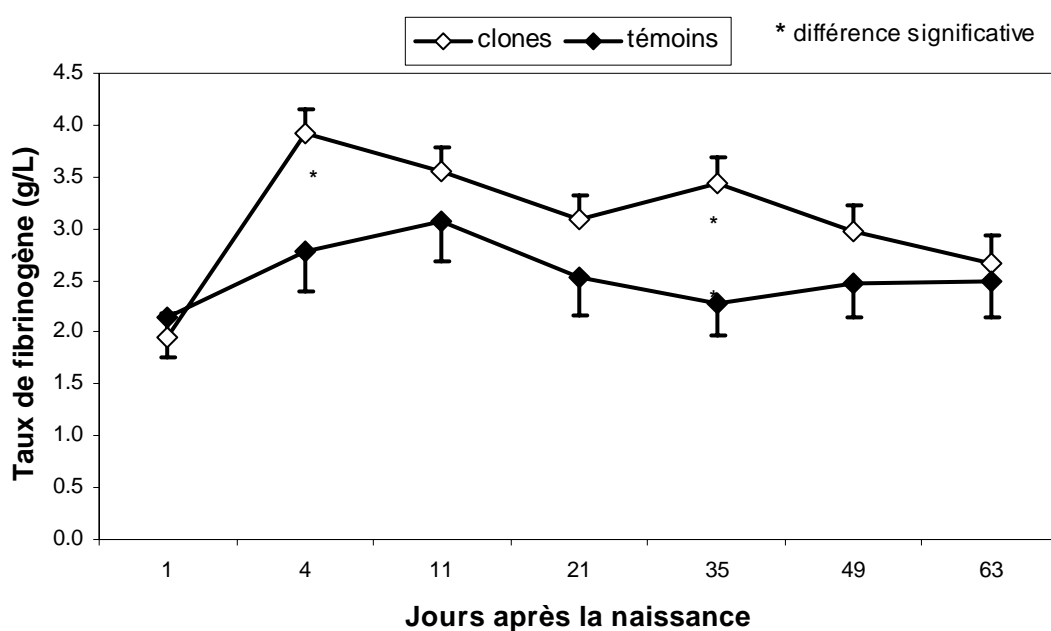
Dans les 2 groupes, le taux de fibrinogène subit des variations non significatives d'une prise de sang à l'autre, sauf chez les clones entre J1 et J4 où il y a une augmentation significative.

TABLEAU 24 : Taux de fibrinogène moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps

Jours après la naissance	Taux de fibrinogène chez les clones (g/L) et erreur standard	Taux de fibrinogène chez les témoins (g/L) et erreur standard
1	$1,94 \pm 0,24$	$2,15 \pm 0,40$
4	$3,92 \pm 0,23$	$2,77 \pm 0,38$
11	$3,56 \pm 0,22$	$3,07 \pm 0,37$

21	$3,08 \pm 0,23$	$2,53 \pm 0,37$
35	$3,43 \pm 0,25$	$2,29 \pm 0,32$
49	$2,97 \pm 0,26$	$2,46 \pm 0,32$
63	$2,67 \pm 0,27$	$2,50 \pm 0,35$

FIGURE 13 : Taux de fibrinogène moyen chez 23 clones et 12 témoins au cours du temps



c. Urée

Le taux d'urée n'a été mesuré qu'à la première prise de sang, dans les deux groupes.

Le test de Student appliqué à la comparaison du taux d'urée chez les clones et les témoins donne un résultat non significatif à 5% ($p=0,623$). Il n'y a donc pas de différence significative pour le taux d'urée entre les clones et les témoins à J1 (tableau 25).

Variable	Témoins n=12	Clones n=23	p
Taux d'urée (g/L)	0,15 ± 0,042	0,16 ± 0,076	0,623

d. Créatinine

Le taux de créatinine n'a également été mesuré qu'à la première prise de sang, dans les deux groupes.

Le test de Student appliqué à la comparaison du taux de créatinine chez les clones et les témoins donne un résultat non significatif à 5% ($p=0,712$). Il n'y a donc pas de différence significative pour le taux de créatinine entre les clones et les témoins à J1 (tableau 26). Il y a cependant une répartition des valeurs plus large chez les clones que chez les témoins, avec un écart-type deux fois plus grand.

TABLEAU 26 : Taux de créatinine moyen et erreur standard chez 23 clones et 12 témoins à J1

Variable	Témoins n=12	Clones n=23	p
Taux de créatinine (mg/L)	14,31 ± 3,199	15,32 ± 6,848	0,712

Le tableau 27 résume la moyenne et l'erreur standard pour chaque paramètre, chez les clones et chez les témoins.

TABLEAU 27 : Moyenne et erreur standard pour différents paramètres chez 23 clones et 12 témoins

Variables	Clones n=23	Témoins n=12	p
------------------	------------------------	-------------------------	----------

Taux d'hémoglobine (g/dL)	9.41 ± 0.21	11.19 ± 0.31	< 0.0001
Hématocrite (%)	32.45 ± 0.70	37.82 ± 1.02	< 0.0001
Nombre de lymphocytes (par mm³)	2842.68 ± 229.20	3439.63 ± 336.20	0.144
Pourcentage de lymphocytes (%)	38.98 ± 1.54	44.07 ± 2.30	0.068
Nombre de monocytes (par mm³)	748.39 ± 69.95	609.13 ± 105.16	0.272
Pourcentage de monocytes (%)	9.81 ± 0.73	8.20 ± 1.10	0.226
Nombre de neutrophiles (par mm³)	5109.36 ± 702.19	4059.61 ± 1024.89	0.399
Pourcentage de neutrophiles (%)	50.35 ± 1.23	47.35 ± 1.84	0.178
Volume globulaire moyen (µm³)	42.96 ± 0.61	42.34 ± 0.89	0.569
Taux de fibrinogène (g/L)	3.08 ± 0.12	2.54 ± 0.18	0.015
Glycémie (g/L)	0.96 ± 0.04	0.92 ± 0.09	0.67

III. Discussion

Nous allons à présent discuter les résultats de cette étude et leur intérêt au regard de ce qui a déjà été écrit sur le sujet. Les résultats obtenus chez les clones pour la lignée rouge, la lignée blanche, la biochimie et les autres paramètres vont être comparés dans un premier temps à ceux observés dans la littérature, puis à ceux recueillis dans notre échantillon témoin. Nous tenterons d'expliquer d'où viennent les différences observées entre clones et témoins, présenteront quelles sont les critiques et les réserves à apporter et suggéreront des recherches ultérieures dans ce domaine.

A. La lignée rouge : interprétation des résultats

1. Taux d'hémoglobine et hématocrite

➤ Témoins

Les valeurs obtenues dans notre échantillon témoin pour les différents paramètres de la lignée rouge sont conformes à celles que l'on trouve dans la littérature.

Le taux d'hémoglobine et l'hématocrite de nos témoins ne subissent pas de variations significatives au cours des deux premiers mois, mais restent stables. D'après certains auteurs pourtant, ces paramètres diminuent dans les premiers jours pour rester relativement bas le premier mois et augmenter dès le second mois (HOLMAN, 1956 ; TENNANT *et al.*, 1974 ; KURZ et WILLETT, 1991 ; ADAMS *et al.*, 1992). La diminution initiale de ces paramètres serait due à l'hémodilution provoquée par l'absorption du colostrum.

➤ Clones

Les valeurs obtenues chez les clones sont dans les normes pour le veau, mais sont significativement plus basses que celles observées dans l'échantillon témoin. Cependant, le taux d'hémoglobine et l'hématocrite des clones augmentent au cours du temps et à partir de J49, il n'y a plus de différence significative avec les témoins.

L'évolution de ces deux paramètres chez les clones au cours du temps n'est pas celle que l'on trouve habituellement dans la littérature pour les veaux : diminution dans les premiers jours puis augmentation à partir de 4 semaines (HOLMAN, 1956 ; TENNANT *et al.*, 1974 ; KURZ et WILLETT, 1991 ; ADAMS *et al.*, 1992).

Nos résultats sont différents de ceux de 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.

Plusieurs hypothèses nous permettent d'expliquer ces différences entre clones et témoins.

Des analyses histologiques récentes intéressant le foie de fœtus clonés, à différents stades de gestation, ont montré que le foie de certains clones avait moins de foyers hématopoïétiques que le foie des témoins. Certains foies n'en contenaient même aucun (communication personnelle : Pascale CHAVATTE-PALMER). Ceci pourraient expliquer des taux d'hémoglobine plus faibles chez les clones que chez les témoins à la naissance, l'érythropoïèse se déroulant en partie dans le foie du fœtus au cours de la gestation. Cependant, la localisation hépatique de l'érythropoïèse est surtout importante entre 60 et 140 jours de gestation ; elle est ensuite minoritaire et remplacée progressivement par la rate puis par la moelle osseuse. Il est donc normal que peu de foyers érythropoïétiques soient trouvés dans le foie à certains stades de gestation, notamment après 140 jours.

L'anémie par carence d'apport en fer est fréquente chez les veaux nourris uniquement au lait ou aux lactoreplaceurs. Cependant, elle ne se développe en général qu'à partir d'un mois, lorsque les réserves hépatiques sont épuisées, alors que c'est précisément à partir de cet âge que nos clones ont des taux d'hémoglobine qui remontent pour être semblables à ceux des témoins. De plus, cette anémie peut être évitée par l'injection de fer et par l'apport de fourrages dès les premières semaines, ce qui est le cas chez nos clones.

D'après TENNANT *et al.* (1975), il existe une anémie congénitale chez les veaux à la naissance, principalement due à une carence en fer. Les auteurs suggèrent que cette anémie se développe *in utero* et pourrait être causée par une perte importante d'érythrocytes par le fœtus (HIBBS *et al.*, 1963 ; TENNANT *et al.*, 1975). Cette perte d'hématies pourrait être provoquée par des hémorragies fœtales ou placentaires, ou par des anastomoses vasculaires anormales entre les circulations fœtale et maternelle. Ces hypothèses sont importantes à prendre en compte, étant donnée la fréquence des anomalies placentaires chez les clones.

Il a également été montré chez les ovins que des anémies modérées à sévères étaient associées à une augmentation du volume du liquide amniotique (SOHL et BRACE, 1999). Etant donnée la fréquence des hydramnios chez les clones, cette observation est importante à prendre en compte. Cependant, il semble que ce soit l'anémie qui entraîne l'augmentation du liquide amniotique (par un phénomène de diurèse induite par l'hypoxémie) et non l'inverse. De plus, dans notre étude, l'anémie et les problèmes placentaires ne semblent pas forcément liés. Cependant, le clone 112 qui présente une augmentation du liquide amniotique a des taux d'hémoglobine légèrement en dessous de normes pour les premiers prélèvements : 7,9 g/dL à J1 et 7,8 g/dL à J4.

Une autre hypothèse pouvant expliquer cette différence entre clones et témoins est le mode de vêlage. Les témoins naissent par vêlage naturel, tandis que les clones naissent tous par césarienne. Or, d'après ADAMS *et al.* (1992), les veaux nés avec une assistance au cours du vêlage ont des taux d'hémoglobine et un hématocrite plus bas que les veaux nés sans assistance pendant les 48 premières heures. Cependant, cette explication n'est valable que pour les deux ou trois premiers jours.

La régulation hormonale de l'érythropoïèse est également une source d'explication. En effet, l'érythropoïèse est principalement stimulée par l'érythropoïétine, mais d'autres hormones interviennent. L'hormone de croissance, la thyroxine, les androgènes ou le cortisol agissent par voie indirecte, via leurs différents effets métaboliques avec leurs conséquences sur la consommation d'oxygène ce qui stimule la synthèse d'érythropoïétine et donc l'érythropoïèse. Or certains auteurs ont trouvé des taux d'hormones thyroïdiennes plus bas chez les clones que chez les témoins (GARRY *et al.*, 1996 ; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002). L'hypothyroïdie provoque une dépression de l'érythropoïèse, secondairement aux perturbations métaboliques qu'elle entraîne avec diminution des besoins en oxygène. Des valeurs plus basses en hormones thyroïdiennes chez les clones pourraient donc entraîner une diminution de la quantité d'oxygène transportée et donc du taux d'hémoglobine. Des effets semblables sont possibles pour l'hormone de croissance et le cortisol. Cependant, il ne semble pas y avoir de différence à la naissance pour le taux d'hormone de croissance entre clones et témoins (CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002 ; GOVONI *et al.*, 2002). Pour les valeurs du cortisol, les résultats sont différents selon les auteurs ; GARRY *et al.* (1996) ne trouvent pas de différences entre les clones et les témoins, CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002) et MATSUZAKI et SHIGA (2002) trouvent des valeurs de cortisolémie plus faibles chez les clones que chez les témoins, tandis que pour EDWARDS *et al.* (2002), la cortisolémie est plus élevée chez les clones que chez les témoins. Il serait intéressant de mesurer la cortisolémie chez nos clones.

Les anémies néonatales chez le veau sont en général bien résolues par l'injection de fer dextran. Tous nos veaux reçoivent une telle injection à la naissance. Le taux

d'hémoglobine des clones, qui est un peu bas à la naissance, augmente rapidement et atteint dès 49 jours la même valeur que celui des témoins.

D'après TENNANT *et al.* (1975), seuls les veaux vraiment très anémiés avec des hématocrites très faibles meurent. D'ailleurs, nous pouvons noter que parmi les clones nés en 2001 et qui n'ont pas survécu, les veaux 187, 188, 189 et 103 avaient de faibles taux d'hémoglobine, respectivement 5,6 ; 5,1 ; 7,5 et 4,8 g/dL. Cependant, parmi ces veaux, seul le clone 103 présentait des anomalies placentaires, les enveloppes fœtales des autres clones semblant normales. Des problèmes d'hémorragie placentaire ou de mauvaise vascularisation, à l'origine de l'anémie, sont donc à écarter ici, au moins pour trois des veaux.

De plus, d'autres clones qui sont morts dans les premiers jours n'étaient pas anémiés : clone 211 (taux d'hémoglobine de 10,2 g/dL), clone 227 (taux d'hémoglobine de 13,5 g/dL) et clone 2263 (taux d'hémoglobine de 10,7 g/dL). L'anémie n'est donc pas la seule pathologie qui entraîne la mort des clones dans les premiers jours.

En résumé, les clones ont un taux d'hémoglobine et un hématocrite plus bas que les moins pendant le premier mois, puis il n'y a plus de différences significatives et les valeurs

2. Volume Globulaire Moyen

s clones ne trouvons pas de différence significative pour le VGM entre t ts

(2002), la cortisolémie est plus faible chez les clones que chez les témoins ; pour EDWARDS *et al.* (2002) c'est le contraire, tandis que GARRY *et al.* (1996) ne trouvent pas de différences.

Nous nous attendions à trouver des différences entre clones et témoins pour la lignée blanche. En effet, des problèmes d'atrophie du thymus ont été observés chez des clones par divers auteurs. De plus, il y a une forte mortalité néonatale chez les clones ; cette mortalité pourrait être liée à des problèmes immunitaires chez certains animaux. GARRY *et al.* (1996) ont décrit de nombreux problèmes infectieux chez les clones. Cependant, dans l'étude de HILL *et al.* (1999), il n'a pas été observé de pathologies infectieuses chez les clones, mais plutôt des anomalies congénitales, comme c'est aussi le cas chez nos clones.

La numération leucocytaire doit être interprétée avec précaution car, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, elle est influencée par de nombreux facteurs : stress, température, techniques d'élevage, injection de corticoïdes... Ainsi, les écarts-types sont importants et il n'est pas évident de faire des comparaisons, la numération leucocytaire pouvant être très différente pour un même individu selon le jour.

Les clones 121 et 122 ont présenté une atrophie thymique. Leurs comptages lymphocytaires étaient un peu bas pendant les premiers jours (surtout pour le clone 121 qui a 703 lymphocytes / μ L à J1), mais ils se sont rétablis ensuite normalement. Cependant, le clone 121 est mort à 22 jours de problème de thermorégulation. Le clone 122 a dû être euthanasié à 28 jours ; il avait également des anomalies cardiaques. Des aplasies thymiques chez les clones ont été décrites dans la littérature ; RENARD *et al.* (1999) ont étudié un clone avec aplasie thymique. Ce clone est mort d'anémie à 7 semaines. Pour notre part, le clone 121 n'était pas anémié. Le clone 122 avait des valeurs normales pour le taux d'hémoglobine et pour l'hématocrite au début, mais est devenu anémié à J21 : taux d'hémoglobine de 5,7 g/dL et hématocrite de 18,9 %.

C. Paramètres biochimiques

1. Urée et créatinine

Il n'y a pas de différences significatives pour ces deux paramètres entre les clones et les témoins. Cependant, les mesures n'ont été faites qu'à J1 ; d'éventuelles modifications ultérieures n'ont donc pas pu être notées.

Les clones 188 et 216, morts dans les deux premiers jours, présentaient des anomalies rénales sans que l'urémie et la créatininémie ne soient augmentées. Ces deux paramètres n'ont probablement pas eu le temps d'augmenter en quantité dans le sang, étant donné la mort précoce des veaux.

2. Glycémie

Aucune différence significative n'a été notée pour la glycémie entre les deux groupes. Toutes les valeurs obtenues sont dans les normes pour le veau ; les clones régulent donc correctement leur glycémie. Cependant, les écart-types sont beaucoup plus grands dans l'échantillon témoin que chez les clones. Les mesures réalisées chez les témoins ont peut-être

été faites moins rigoureusement que chez les clones : glycémie mesurée après la buvée et non avant, oubli de certains prélèvements...

Une autre hypothèse pour expliquer cette différence serait une moins grande variabilité des clones pour certains paramètres. ARCHER *et al.* (2003) se sont intéressés à la variabilité de certains caractères chez des porcs clonés (clonage somatique) et l'ont comparée à celle de témoins obtenus par saillie naturelle. Ils s'attendaient à trouver une plus grande homogénéité chez les clones que chez les témoins, car les clones possèdent le même patrimoine génétique. Cette homogénéité pourrait être exploitée en recherche ; en effet, le fait d'avoir des animaux possédant une bonne homogénéité pour divers caractères permettrait de réduire la taille des échantillons d'animaux utilisés en expérimentation animale. Finalement, deux groupes de caractères se sont constitués. Certains paramètres étaient moins variables chez les clones : taux d'urée et de créatinine, phosphatases alcalines par exemple. Mais d'autres étaient aussi variables chez les clones que chez les témoins : poids à 27 semaines, glycémie, protéines totales. Cette découverte pourrait expliquer que, pour certains paramètres, les écarts-types soient plus faibles chez les clones, tandis que pour d'autres, ils soient comparables dans les deux groupes. Cependant, dans notre étude, la glycémie des clones est moins variable que celle des témoins, ce qui est contraire aux résultats de ARCHER *et al.* Leur étude porte sur l'espèce porcine, ce qui peut aussi être source de différences.

Les résultats obtenus pour la glycémie des clones sont identiques à ceux précédemment publiés par GARRY *et al.* (1996) et CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002), qui n'ont trouvé aucune différence pour la glycémie entre des veaux clonés et un échantillon témoin. Cependant, il serait intéressant de mesurer également le taux d'insuline chez nos clones ; en effet, CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002) n'ont trouvé aucune différence pour le taux d'insuline entre clones et témoins, mais GARRY *et al.* (1996) avaient obtenus des taux d'insuline particulièrement élevés chez les clones.

3. Fibrinogène

Le taux de fibrinogène est significativement plus élevé chez les clones que chez les témoins. Cependant, il est dans les normes pour le veau ; on ne peut donc pas dire qu'il y a plus de problèmes d'inflammation chez les clones que chez les témoins. Les diarrhées néonatales peuvent entraîner une augmentation du taux de fibrinogène, mais les clones n'ont pas été plus atteints que les témoins.

D. Autres paramètres

1. Taux de survie et anomalies cliniques rencontrées

Le taux de survie des clones est meilleur en 2002 (71%) qu'en 2001 (43%). Ceci peut s'expliquer par une meilleure maîtrise des techniques de transfert nucléaire, par une meilleure surveillance des veaux clonés juste après la naissance, grâce à l'expérience acquise en néonatalogie pour les clones. De plus, l'origine des clones, c'est-à-dire l'origine de la cellule donneuse de noyau, n'est pas toujours la même. Sur 5 clones Helsinki, 4 sont morts ; sur 3 clones 7711, 2 sont morts ; sur 4 clones Aurore, 3 sont morts ; alors que sur 15 clones 5538, vache donneuse majoritairement utilisée en 2002, seuls 3 clones sont morts.

Dans l'ensemble, sur les deux années, le taux de mortalité des clones est comparable à ceux observés dans la littérature.

Les clones qui ne survivent pas meurent en général dans les premiers jours ou au cours du premier mois, mais au-delà il n'y a plus de problème de mortalité (sauf pour le clone 112 mort subitement à 119 jours sans explication). C'est également ce qui est observé par d'autres auteurs ayant publié sur le sujet.

L'analyse statistique comparant les clones ayant survécu à ceux qui sont morts ne montre pas de différences significatives pour tous les paramètres hématologiques et biochimiques étudiés, entre ces 2 groupes. On ne peut donc *a priori* pas prévoir quels clones vont mourir et quels clones vont survivre à la seule lumière de ces analyses. Cependant, les clones morts dans les premiers jours ne sont pas pris en compte dans cette comparaison, car ils n'ont subi qu'un prélèvement. Pour ces clones, les résultats des analyses sont souvent révélateurs de maladies particulières et annoncent un mauvais pronostic (voir plus haut).

Les anomalies cliniques retrouvées chez nos clones sont semblables à celles décrites dans la littérature : anomalies placentaires, syndrome du gros veau, problèmes cardio-respiratoires, anomalies morphologiques, aplasie thymique, anomalie rénale. Les clones présentant ce type d'anomalies sont morts. Ceux qui ont survécu ne présentaient pas d'anomalies cliniques ou de maladie particulière, si ce n'est quelques cas de hernies ombilicales.

2. Poids de naissance

Comme nous l'avons vu dans la partie « Résultats », le poids de naissance des clones et des témoins n'est pas significativement différent. Cependant, pour les clones, les poids de naissance sont plus largement répartis et s'étalent de 23 à 68 kg, ce qui donne un écart-type élevé, d'environ 10. Pour les témoins au contraire, les poids de naissance s'étalent de 34 à 51 kg, avec une majorité des animaux entre 40 et 50kg, ce qui donne un écart-type d'environ 5, soit deux fois plus faible que pour les clones. Il faut cependant garder à l'esprit que les écart-types sont influencés par le nombre d'animaux de l'échantillon et que des écart-types plus importants chez les clones pourraient être dues au nombre plus important de clones que de témoins étudiés.

Nos résultats sont différents de ceux trouvés dans la littérature. En effet, la majorité 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 ; KATO *et al.*, 2000 ; KUBOTA *et al.*, 2000 ; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2000 et 2002 ; HEYMAN *et al.*, 2002 ; PACE *et al.*, 2002). Le nombre important de veaux inclus dans notre échantillon clone (n=35) explique peut-être cette différence.

Les 4 clones présentant les poids de naissance les plus faibles sont les veaux 233, 234, 244 et 245, qui sont issus de gestations gemellaires. Leur poids sont bas par rapport à ceux rapportés dans la littérature pour les clones (annexe 2).

Trois clones ont un poids de naissance supérieur à 61 kg ; pour trois clones le poids de naissance se situe entre 56 et 60 kg et pour cinq clones entre 51 et 55 kg. Deux clones présentent le syndrome du gros veau : les veaux 211 et 186, avec un poids respectif de 53 et

64 kg. Mais la majorité des clones (n=21) ont un poids de naissance compris entre 36 et 50 kg, comme les témoins.

CONCLUSION

Nous avons étudié et comparé l'évolution des paramètres hématologiques et biochimiques de 23 veaux produits par clonage somatique et de 12 veaux témoins issus d'insémination artificielle au cours des 63 premiers jours après la naissance. Ce travail a été réalisé à la ferme expérimentale de l'Institut National de Recherche Agronomique à Bressonvilliers, dans l'Essonne. Une étude clinique a également été menée pour comparer le taux de mortalité, le poids de naissance et les caractéristiques cliniques de 35 clones somatiques et de 15 témoins d'IA.

Parmi les 35 clones, 14 présentaient des anomalies et sont morts : syndrome du gros veau (n=2), aplasie thymique (n=2), anomalies placentaires (n=2), problèmes respiratoires et cardiaques (n=3), anomalies rénales (n=2), malformations morphologiques (n=1). Certains présentaient d'autres pathologies comme des hernies ombilicales et des diarrhées. Le taux de mortalité était donc beaucoup plus élevé chez les clones (40%) que chez les témoins (0%).

Le poids de naissance n'était pas significativement différent entre les clones et les témoins.

Pour l'étude hématologique et biochimique, les clones

ont été sacrifiés à 6 et 12 semaines

de vie. Les données hématologiques et biochimiques obtenues pour les clones restaient toujours dans

les limites de la normale pendant les premiers jours après la naissance, car c'est souvent à ce

moment que les anomalies se manifestent.

Après 63 jours de vie, les clones ont été sacrifiés à 63 jours. Cependant, les clones

clones que chez les témoins au cours de toute l'étude, mais sans dépasser les normes de l'espèce.

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.

AMSTUTZ HE. (1980) *Bovine Medicine and Surgery*. 2nd ed. Santa Barbara : American Veterinary Publication, 1269p.

ARCHER GS, DINDOT S, FRIEND TH, WALKER S, ZAUNBRECHER G, LAWHORN B *et al.* (2003) Hierarchical Phenotypic and Epigenetic Variation in Cloned Swine. *Biology of Reproduction*, **69**, 430-436.

BARNES FL. (2000) The effects of early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology*, **53**, 649-658.

BAVISTER BD. (2000) Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*, **53**, 619-626.

BEZILLE P. (1993) Numération et formule leucocytaire chez les bovins. *Le Point Vétérinaire*, **25**(154), 285-287.

BLONDIN P, FARIN PW, CROSIER AE, ALEXANDER JE, FARIN CE. (2000) In vitro production of embryos alters levels of insulin-like Growth Factor-II messenger ribonucleic acid in bovine fetuses 63 days after transfer. *Biology of Reproduction*, **62**, 384-389.

BREMNER I, BROCKWAY JM, DONNELLY HT. (1976) Anaemia and veal calf production. *The Veterinary Record*, **99**(11), 203-205.

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**(2), 138-139.

CABELLO G, LEVIEUX D. (1978) The effects of thyroxine and climatic factors on colostral gammaglobulin absorption in newborn calves. *Am. Rech. Vet.*, **9**, 309-318.

CASADEVALL N, LACOMBE C, VARET B. (1988) Erythropoietin. *Revue du Praticien*, **38**(19), 1290-1294.

CHAVATTE-PALMER P, HEYMAN Y, RENARD JP. (2000) Clonage et physiopathologie de la gestation associée. *Gynécol.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. *Biology of Reproduction*, **66**(6), 1596-1603.

CHILLIARD Y, BOCQUIER F, DELAVALD C, FAULCONNIER Y, BONNET M, GUERRE-MILLO M *et al.* (1999) La leptine chez le ruminant. Facteurs de variation physiologiques et nutritionnels. *Productions Animales*, **12**, 225-237.

- 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.
- COLLIN E. (2000) Les examens sanguins chez les bovins II : utilisations pratiques de l'hémocytologie. *Le Point Vétérinaire*, **31**(205), 153-158.
- DELDAR A, NAYLOR JM, BLOOM JC. (1984) Effects of Escherichia Coli on leukocyte and platelet counts, fibrinogen concentrations, and blood clotting in colostrums-fed and colostrums deficient neonatal calves. *American Journal of Veterinary Research*, **45**, 670-677.
- DE SOUSA PA, WALKER S, KING TJ, YOUNG LE, HARKNESS L, RITCHIE WA *et al.* (2000) Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep. *Theriogenology*, **53**, 214.
- ECTORS FJ, DELVAL A, BECKERS JF, DRION PV, REMY B, ECTORS F. (1997) Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine. *Annales de médecine vétérinaire*, **141**, 239-244.
- EDWARDS L, PEURA T, HARTWICH K, RUDIGER S, MC MILLEN IC, WALKER S. (2002) Postnatal growth and circulating ACTH and cortisol concentrations during the first month of life in cloned lambs. *Endocrinology*, **143**(9), 3699-3702.
- ENRIGHT BP, TANEJA M, SCHREIBER D, RIESEN J, TIAN XC, FORTUNNE JE *et al.* (2002) Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biology of Reproduction*, **66**, 291-296.
- FERGUSON EM, LEESE HJ. (1999) Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, **116**, 373-378.
- FORSBERG EJ, STRELCHENKO NS, AUGENSTEIN ML, BETTHAUSER JM, CHILDS LA, EILERTSEN KJ *et al.* (2002) Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biology of Reproduction*, **67**(1), 327-333.
- GARRET JE, GEISERT RD, ZAVY MT, MORGAN GL. (1988) Evidence for maternal regulation of early conceptu growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, **84**, 437-446.
- GARRY FB, ADAMS R, MC CANN JP, ODDE KG. (1996) Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*, **45**(1), 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*, **50**, 321.
- GEISERT RD, LEE CY, SIMMEN FA, ZAVY MT, FLISS AE, BAZER FW *et al.* (1991) Expression of mesenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, -II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the oestrus cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction*, **45**, 975-983.

GOVONI KE, TIAN XC, KAZMER GW, TANEJA M, ENRIGHT BP, RIVARD AL. (2002) Age-related changes of the somatotropic axis in cloned Holstein calves. *Biology of Reproduction*, **66**, 1293-1298.

GUERCIA L (1997) *L'anoxie du veau avant et après la naissance*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 99p.

GUERRE-MILLO M. (1998) La leptine et l'obésité. *Biofutur*, **183**, 30-34.

HEYMAN Y, CHAVATTE-PALMER P, LEBOURHIS D, DENIAU F, LAIGRE P, VIGNON X *et al.* (1999) Evolution of pregnancies after transfer of cloned bovine blastocysts derived from fetal or adult somatic cells. 15ème réunion AETE, Lyon, France. Lyon : Fondation Mérieux, 166p.

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. *Biology of Reproduction*, **66**(1), 6-13.

HIBBS JW, CONRAD HR, VANDERSALL JH, GALE C. (1963) Occurrence of iron deficiency anemia in dairy calves at birth and its alleviation by iron dextran injection. *Journal of Dairy Science*, **46**, 1118-1124.

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 case studies). *Theriogenology*, **51**(8), 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.

HOLMAN HH. (1956) Changes associated with age in the blood picture of calves and heifers. *The British Veterinary Journal*, 91-104.

HONEGGER A, HUMBEL RE. (1986) Insulin-like growth factors -I and -II in fetal and adult bovine serum : purification, primary structures, and immunologic cross-reactivities. *J. Biol. Chem.*, **261**, 569-575.

HOPKINS PS, THORBURN GD. (1972) The effects of fetal thyroidectomy on the development of the ovine fetus. *Journal of Endocrinology*, **54**, 55-56.

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

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

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

KATO Y, TANI T, TSUNODA Y. (2000) Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Journal of reproduction and Fertility*, **120**(2), 231-237.

KRUIP TAM, DEN DAAS JHG. (1997) In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition 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.

KURZ MM, WILLET LB. (1991) Carbohydrate, enzymes and hematology dynamics in newborn calves. *Journal of Dairy Science*, **74**(7), 2109-2118.

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**(5548), 1893-1894.

LEE RS, PETERSON AJ, DONNISON MJ, RAVELICH S, LEDGARD AM, LI N *et al.* (2003) 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. *Biology of Reproduction*, en cours de publication.

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

MAC EVOY TG, ROBINSON JJ, SINCLAIR KD. (2001) Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction*, **122**, 507-518.

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

MATSUZAKI M, SHIGA K. (2002) Endocrine characteristics of cloned calves. *Cloning Stem Cells*, **4**(3), 261-267.

MAXFIELD EK, SINCLAIR KD, DUNNE LD, BROADBENT PJ, ROBINSON JJ, STEWART E *et al.* (1998) Temporary exposure of ovine embryos to an advanced uterine environment does not affect fetal weight but alters fetal muscle development. *Biology of Reproduction*, **59**, 321-325.

MIYAMOTO N, TSUJI M, IMATAKI T, NAGAMACHI N, HIROSE S, HAMADA Y. (1991) Influence of mode of delivery on fetal pituitary-thyroid axis. *Acta. Paediatr. Jpn*, **33**, 363-368.

MORNET P, ESPINASSE J. (1977) *Le veau*. Paris : Edition Maloine, 607p.

- NATHANIELSZ PW. (1975) Thyroid function in the fetus and newborn mammal. *Br. Med. Bull.*, **31**, 51-56.
- PACE MM, AUGENSTEIN ML, BETTHAUSER JM, CHILDS LA, EILERTSEN KJ, ENOS JM *et al.* (2002) Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biology of Reproduction*, **67**, 334-339.
- REINEKE EP, HERNANDEZ MV, OXENDER WD. (1971) Thyroid function in the fetal and neonatal bovine. *Fed. Proceed.* **30**(2).
- RENARD JP, CHASTANT S, CHESNE P, RICHARD C, MARCHAL J, CORDONNIER N *et al.* (1999) Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *The Lancet*, **353**, 1489-1491.
- RHIND SM, KING TJ, HARKNESS LM, BELLAMY C, WALLACE W, DE SOUSA P *et al.* (2003) Cloned lambs-lessons from pathology. *Nature Biotechnology*, **21**(7), 744-745.
- ROSENBERGER G. (1977) *Examen clinique des Bovins*. 2nd ed. Berlin : Edition Paul Parey, 526p.
- SAS. 1998. *STAT user's guide*. SAS Inst. INC.. Cary. NC. USA.
- SMITH BP. (1996) *Large Animal Internal Medicine*. 2nd ed. Saint-Louis : Mosby-Year Book, 2040p.
- SMITH LC, BORDIGNON V, BABKINE M, FECTEAU G, KEEFER C. (2000) Benefits and problems with cloning animals. *Canadian Veterinary Journal*, **41**, 919-924.
- SOHL BD, BRACE RA. (1999) Relationship between graded degrees of anemia and amniotic fluid volume in the ovine fetus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **181**(6), 1552-1559.
- 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.
- TAILLIEU S. (1996) *Les facteurs de croissance à activité insulino-semblable (IGFs ou insulin-like growth factors)*. Thèse Méd. Vét., Alfort, n°68.
- 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.
- TIAN XC, XU J, YANG X. (2000) Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nature genetics*, **26**, 272-273.

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.

VIGNON X, CHESNE P, LE BOURHIS D, FLECHON JE, HEYMAN Y, RENARD JP. (1998) Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *Académie des Sciences*, **321**, 735-745.

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

WELLS DN, MISICA PM, TERVIT HR, VIVANCO WH. (1998) Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*, **10** (4), 369-378.

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

WILMUT I, SALES DI. (1981) Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, **61**, 179-184.

WILMUT I, SCHNIEKE A, MC WHIR J, KIND A, CAMPBELL KHS. (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, embryo transfer and natural mating. *Animal Reproduction Science*, **38**(1-2), 73-83.

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

YOUNG LE, GUTTIEREZ CG, BUTTERWITH SC, ROBINSON JJ, BROADBENT PJ, MC EVOY TG *et al.* (1999) Altered IGF binding protein expression is associated with large offspring syndrome in fetal sheep. *Theriogenology*, **51**, 196.

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

ZHU LX, HATHCOCK KS, PRAKASH H, LANSDORP PM, SELDIN MF, HODES RJ *et al.* (1998) Telomere length regulation in mice is linked to a novel chromosome locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 8648-8653.

ANNEXES

Annexe 1: Inventaire des veaux de l'étude

co

s

aux pris en

numéro	date de naissance	catégorie	type d'embryon transféré	
239	01-août-02	clone	clone 5538	
244	06-sept-02	clone	2 w clone 5538	
245	06-sept-02	clone	2 w clone 5538	
247	19-sept-02	clone	1 w clone 5538	
248	19-sept-02	clone	1 w clone 5538	
249	19-oct-02	T		
250	23-oct-02	T		
2251	25-oct-02	T		
2252	26-oct-02	T		
2253	21-nov-02	clone	1 w Bijou	
2254	24-nov-02	T		
2255	27-nov-02	T		
2256	28-nov-02	clone	1 w clone 5538	
2257	28-nov-02	clone	1 w clone 5538	mort le 24/12/02
2258	04-déc-02	clone	1 w clone 5538	
2259	04-déc-02	clone	1 w clone 5538	
2260	04-déc-02	clone	1 w clone 5538	mort le 29/12/02
2261	12-déc-02	T		
2262	14-déc-02	clone	2 w clone 5538	
2263	16-déc-02	clone	2 w clone 5538	euthanasie le 20/12/02
2264	16-déc-02	T		
2265	18-déc-02	T		
301	22-janv-03	T		
302	30-janv-03	T		
303	31-janv-03	T		
304	04-févr-03	T		
305	21-févr-03	T		

Annexe 2 : Poids de naissance des veaux de l'étude (T=témoin)

numéro	date de naissance	catégorie	poids de naissance
103	10-janv-01	clone	59 kg
105	16-janv-01	clone	46 kg
60	26-févr-01	T	51 kg
112	01-mars-01	clone	68 kg
121	04-avr-01	clone	44 kg
122	11-avr-01	clone	45 kg
130	04-juil-01	clone	49 kg
131	04-juil-01	clone	37 kg
186	18-juil-01	clone	64 kg
187	18-juil-01	clone	40 kg
188	18-juil-01	clone	43 kg
189	19-juil-01	clone	53 kg
139	14-août-01	clone	57 kg
197	06-sept-01	clone	43 kg
152	07-déc-01	clone	48 kg
208	24-janv-02	clone	66 kg
211	31-janv-02	clone	53 kg
216	01-mars-02	clone	48 kg
217	03-mars-02	clone	39 kg
218	07-mars-02	clone	46 kg
227	13-avr-02	clone	37 kg
233	03-juil-02	clone	23 kg
234	03-juil-02	clone	55 kg
239	01-août-02	clone	38 kg
244	06-sept-02	clone	31 kg
245	06-sept-02	clone	36 kg

numéro	date de naissance	catégorie	poids de naissance
247	19-sept-02	clone	44 kg
248	19-sept-02	clone	53 kg
249	19-oct-02	T	42 kg
250	23-oct-02	T	40 kg
2251	25-oct-02	T	49 kg
2252	26-oct-02	T	41 kg
2253	21-nov-02	clone	44 kg
2254	24-nov-02	T	34 kg
2255	27-nov-02	T	41 kg
2256	28-nov-02	clone	50 kg
2257	28-nov-02	clone	58 kg
2258	04-déc-02	clone	44 kg
2259	04-déc-02	clone	46 kg
2260	04-déc-02	clone	54 kg
2261	12-déc-02	T	49 kg
2262	14-déc-02	clone	49 kg
2263	16-déc-02	clone	30 kg
2264	16-déc-02	T	40 kg
2265	18-déc-02	T	38 kg
301	22-janv-03	T	47 kg
302	30-janv-03	T	42 kg
303	31-janv-03	T	48 kg
304	04-févr-03	T	48 kg
305	21-févr-03	T	35 kg

Annexe 3 : Paramètres hématologiques des veaux de l'étude pour la lignée rouge (PS=prise de sang ; VGM=Volume Globulaire Moyen en μm^3 ; hémoglobine en g/dL ; hématocrite en % ; groupe 1=clone ; groupe 2=témoin)

Veau	groupe	PS	Hémoglobine	Hématocrite	VGM
103	1	1	4,8	15,7	48,76
103	1	2			
103	1	3			
103	1	4			
103	1	5			
103	1	6			

Veau	groupe	PS	Hémoglobine	Hématocrite	VGM
121	1	7			
122	1	1	9,9	32,5	50,15
122	1	2	10,0	32,8	49,40
122	1	3	8,7	27,4	46,36
122	1	4	5,7	18,9	43,45
122	1	5			
122	1	6			
122	1	7			
130	1	1	9,1	28,4	51,54
130	1	2			
130	1	3			
130	1	4			
130	1	5			
130	1	6			
130	1	7			
131	1	1	11,5	35,9	50,99
131	1	2			
131	1	3			
131	1	4			
131	1	5			
131	1	6			
131	1	7			
187	1	1	5,6	19,7	42,64
188	1	1	5,1	18,3	42,46
189	1	1	7,5	25,8	44,95
197	1	1	9,6	32,1	44,58
197	1	2	8,8	28,7	43,68
197	1	3	9,0	29,6	43,09
197	1	4	8,8	29,7	42,98
197	1	5	9,8	32,9	41,54
197	1	6	10,2	35,5	40,76
197	1	7	9,7	33,4	40,73
152	1	1	12,6	42,4	44,44
152	1	2	11,1	36,9	43,11
152	1	3	12,5	42,5	43,19
152	1	4			
152	1	5			
152	1	6			

Veau	groupe	PS	Hémoglobine	Hématocrite	VGM
152	1	7			
208	1	1	7,9	24,3	50,1
208	1	2	8,8	27,6	48,51
208	1	3	10,6	33,9	46,5
208	1	4	11,3	37,1	45,13
208	1	5	10,2	34,7	43,05
208	1	6	10,5	36,9	41,46
208	1	7	10,4	36,3	40,74
211	1	1	10,2	32,8	54,21
211	1	2			
211	1	3			
211	1	4			
211	1	5			
211	1	6			
211	1	7			
217	1	1	8,2	27,4	63,43
217	1	2	8,1	26,3	58,71
217	1	3	9,1	28,8	50,7
217	1	4	9,4	30,8	46,32
217	1	5	9,8	33,2	44,03
217	1	6	10,2	34,6	43,14
217	1	7	10,5	34,7	42,32
218	1	1	6,6	24,8	42,39
218	1	2	5,7	20,8	41,27
218	1	3	7,0	25,6	42,52
218	1	4	7,5	27,3	41,11
218	1	5	9,9	35,7	41,66
218	1	6			
218	1	7	10,2	34,4	41,7
227	1	1	13,5	46,7	60,81
227	1	2			
227	1	3			
227	1	4			
227	1	5			
227	1	6			
227	1	7			
233	1	1	7,0	23,3	42,91
233	1	2	7,9	27,2	44,23

233	1	3	8,6	28,6	43,73
233	1	4	8,3	28,7	43,03
Veau	groupe	PS	Hémoglobine	Hématocrite	VGM
233	1	5	9,4	32,8	41,57
233	1	6	10,4	36,4	41,32
233	1	7	9,9	34,3	40,83
234	1	1	8,7	29,3	43,02
234	1	2	10,2	34,9	43,25
234	1	3	10,2	34,9	42,93
234	1	4	11,2	39,5	42,38
234	1	5	8,9	31,8	40,66
234	1	6	7,5	26,4	39,58
234	1	7	7,5	26,7	40,15
239	1	1	7,7	25,2	42,14
239	1	2	9,0	30,0	42,92
239	1	3	10,2	35,2	44,33
239	1	4	10,8	37,6	42,73
239	1	5	10,0	34,8	41,63
239	1	6	8,4	30,3	40,35
239	1	7	8,8	31,4	40,00
244	1	1	8,1	27,7	42,48
244	1	2	8,5	29,5	41,84
244	1	3	9,7	33,7	42,88
244	1	4	9,4	33,6	41,33
244	1	5	9,8	35,4	40,36
244	1	6	10,9	39,7	40,39
244	1	7	12,4	43,8	38,49
245	1	1	8,3	28,5	42,47
245	1	2	8,1	28,1	42,07
245	1	3	9,5	33,5	42,78
245	1	4	9,9	35,5	41,28
245	1	5	9,9	36,3	40,47
245	1	6	10,5	38,4	40,29
245	1	7	12,6	45,4	38,47
247	1	1	8,4	27,9	42,92
247	1	2	10,1	34,2	42,70
247	1	3	11,1	37,6	42,73
247	1	4	11,0	38,3	41,86
247	1	5	10,9	39,1	40,77

247	1	6	12,4	44,2	38,70
247	1	7	12,2	45,6	38,38
248	1	1	8,5	28,3	43,07
Veau	groupe	PS	Hémoglobine	Hématocrite	VGM
248	1	2	7,9	26,7	42,52
248	1	3	9,3	31,7	43,37
248	1	4	10,7	39,0	42,07
248	1	5	8,9	32,5	40,98
248	1	6	12,0	43,2	39,27
248	1	7	11,9	22,7	
249	2	1			
249	2	2			
249	2	3			
249	2	4			
249	2	5	11,4	38,5	42,21
249	2	6	10,7	36,6	41,17
249	2	7	10,6	35,8	41,34
250	2	1			
250	2	2			
250	2	3			
250	2	4			
250	2	5	10,7	37,9	42,16
250	2	6	10,5	37,2	41,29
250	2	7			
2251		1			
2251	2	2			
2251	2	3			
2251	2	4			
2251	2	5	11,3	38,0	41,94
2251	2	6	11,3	38,8	41,54
2251	2	7	11,5	39,6	41,21
2252	2	1			
2252	2	2			
2252	2	3			
2252	2	4			
2252	2	5	10,6	37,6	40,91
2252	2	6	10,8	38,0	40,55
2252	2	7	11,3	39,7	40,39
2253	1	1	5,7	19,5	45,67

2253	1	2	6,4	21,7	44,29
2253	1	3	8,0	26,8	46,13
2253	1	4	10,2	36,3	42,86
2253	1	5	10,7	37,4	41,51
Veau	groupe	PS	Hémoglobine	Hématocrite	VGM
2253	1	6	10,5	37,3	41,03
2253	1	7	11,2	40,2	41,23
2254	2	1	10,8	37,1	44,11
2254	2	2	11,0	37,4	43,39
2254	2	3	9,8	34,0	42,66
2254	2	4	9,9	35,7	41,80
2254	2	5	11,4		
2254	2	6	11,0	39,0	38,54
2254	2	7	10,8	38,4	38,40
2255	2	1	10,4	34,0	46,01
2255	2	2	9,7	31,8	44,66
2255	2	3	11,0	37,0	44,36
2255	2	4	10,5	34,9	43,14
2255	2	5			
2255	2	6	12,1	41,3	
2255	2	7	11,6	39,1	41,33
2256	1	1	8,1	26,0	44,37
2256	1	2	8,2	27,3	44,03
2256	1	3	9,9	33,2	44,56
2256	1	4	10,6	37,5	42,71
2256	1	5	10,7	39,9	41,52
2256	1	6	9,1	33,7	40,07
2256	1	7	10,3	38,3	39,85
2257	1	1	7,1	24,1	42,81
2257	1	2	6,8	23,8	42,58
2257	1	3	8,3	28,7	43,35
2257	1	4	8,1	27,8	41,87
2257	1	5			
2257	1	6			
2257	1	7			
2258	1	1	8,4	28,1	42,58
2258	1	2	9,5	32,2	43,22
2258	1	3	10,5	36,4	43,08
2258	1	4	10,7	37,6	42,11

2258	1	5	11,9	42,0	39,70
2258	1	6	12,0	43,4	39,03
2258	1	7	11,2	40,6	38,23
2259	1	1	7,8	26,3	41,88
2259	1	2	9,4	32,7	42,75
Veau	groupe	PS	Hémoglobine	Hématocrite	VGM
2259	1	3	10,5	37,0	42,33
2259	1	4	9,5	33,4	41,08
2259	1	5	10,9	40,1	40,46
2259	1	6	10,4	39,2	39,92
2259	1	7			
2260	1	1	5,7	19,2	42,67
2260	1	2	5,4	18,3	42,36
2260	1	3	6,2	21,9	42,86
2260	1	4	7,4	26,4	41,31
2260	1	5			
2260	1	6			
2260	1	7			
2262	1	1	9,2	28,5	60,00
2262	1	2	8,8	26,4	56,17
2262	1	3	8,9	27,2	52,92
2262	1	4	9,9	35,5	41,09
2262	1	5	8,7	30,5	44,66
2262	1	6	9,7	35,2	41,85
2262	1	7	11,4	41,6	38,88
2263	1	1	10,7	36,7	43,13
2263	1	2	11,8	41,0	42,62
2263	1	3			
2263	1	4			
2263	1	5			
2263	1	6			
2263	1	7			
301	2	1	10,5	35,2	44,44
301	2	2	10,9	35,8	43,29
301	2	3	10,4	35,2	42,82
301	2	4	11,6	40,6	41,73
301	2	5	11,0	39,2	40,92
301	2	6	10,0	35,6	40,32
301	2	7	10,5	37,4	40,35

302	2	1	11,8	38,7	46,63
302	2	2	11,9	39,1	45,78
302	2	3	12,7	41,8	44,71
302	2	4	12,8	43,0	42,66
302	2	5	11,4	39,9	42,22
302	2	6	10,9	38,1	41,37
Veau	groupe	PS	Hémoglobine	Hématocrite	VGM
302	2	7	12,4	41,8	39,89
303	2	1	12,7	40,8	46,58
303	2	2	10,6	34,6	45,17
303	2	3	11,2	36,4	44,77
303	2	4	10,6	36,3	43,42
303	2	5	9,3	31,4	41,92
303	2	6	10,0	33,5	41,51
303	2	7	10,7	35,5	41,28
304	2	1	11,1	36,6	45,52
304	2	2	11,6	38,2	45,48
304	2	3	12,6	42,7	44,81
304	2	4	12,1	41,2	43,41
304	2	5	11,9	40,6	42,42
304	2	6	10,6	34,6	41,59
304	2	7	13,0	42,8	40,84
305	2	1	13,7	45,5	47,64
305	2	2	13,8	44,8	46,38
305	2	3	14,1	45,6	44,62
305	2	4	13,6	45,2	43,71
305	2	5	12,0	41,8	43,14
305	2	6	11,1	38,7	42,30
305	2	7			

Annexe 4 : Paramètres hématologiques des veaux de l'étude pour la lignée blanche (PS=prise de sang ; Lympho=nombre de lymphocytes par mm³ ; Mono=nombre de monocytes par mm³ ; Neutro=nombre de neutrophiles par mm³; %L, %M et %N=pourcentages respectifs des lymphocytes, des monocytes et des neutrophiles dans la formule leucocytaire ; groupe 1=clone ; groupe 2=témoin)

Veau	groupe	PS	Lympho	% L	Mono	% M	Neutro	% N
103	1	1	1624	14	580	5	9396	81
103	1	2						
103	1	3						
103	1	4						
103	1	5						
103	1	6						
103	1	7						
105	1	1	1251	9	278	2	12371	89
105	1	2	6806	41	0	0	9794	59
105	1	3	3080	35	440	5	5192	59
105	1	4	3200	40	240	3	3920	49
105	1	5	2997	37	1782	22	3240	40
105	1	6	3220	46	420	6	3080	44
105	1	7	3740	55	680	10	2244	33
60	2	1	1078	7	924	6	13398	87
60	2	2	3608	41	1144	13	4048	46
60	2	3	2499	17	294	2	11907	81
60	2	4	1971	27	949	13	4307	59
60	2	5	2808	39	144	2	4248	59
60	2	6						
60	2	7						
112	1	1	295	5	649	11	4897	83
112	1	2	2028	26	234	3	5538	71
112	1	3	3588	39	1104	12	4508	49
112	1	4	5358	47	1254	11	4446	39
112	1	5	2925	39	375	5	4200	56
112	1	6	2200	44	400	8	2200	44
112	1	7	2496	48	624	12	2080	40
121	1	1	703	19	74	2	2886	78
121	1	2	2080	16	520	4	10400	80
121	1	3	4489	67	536	8	1474	22
121	1	4	3290	47	560	8	3150	45

Veau	groupe	PS	Lympho	% L	Mono	% M	Neutro	% N
121	1	5						
121	1	6						
121	1	7						
122	1	1	1278	6	1065	5	18957	89
122	1	2	1258	37	680	20	1462	43
122	1	3	3136	49	768	12	2496	39
122	1	4	1628	74	22	1	550	25
122	1	5						
122	1	6						
122	1	7						
130	1	1	1890	10	756	4	16254	86
130	1	2						
130	1	3						
130	1	4						
130	1	5						
130	1	6						
130	1	7						
131	1	1	1168	8	438	3	12994	89
131	1	2						
131	1	3						
131	1	4						
131	1	5						
131	1	6						
131	1	7						
187	1	1	900	10	270	3	7830	87
188	1	1	715	11	325	5	5395	83
189	1	1	1022	14	365	5	5913	81
197	1	1	783	9	174	2	7743	89
197	1	2	3285	45	730	10	3285	45
197	1	3	2146	29	370	5	4884	66
197	1	4	1155	35	429	13	1683	51
197	1	5	1628	44	444	12	1628	44
197	1	6	3000	60	450	9	1350	27
197	1	7	3599	61	531	9	1593	27
152	1	1	1410	10	564	4	11985	85
152	1	2	1328	16	1660	20	5063	61
152	1	3	1764	21	756	9	5796	69
152	1	4						

Veau	groupe	PS	Lympho	% L	Mono	% M	Neutro	% N
152	1	5						
152	1	6						
152	1	7						
208	1	1	1260	7	360	2	16380	91
208	1	2	1575	15	1995	19	6720	64
208	1	3	2860	44	195	3	3380	52
208	1	4	2670	30	1424	16	4628	52
208	1	5	2772	77	612	17	216	6
208	1	6	4590	54	935	11	2890	34
208	1	7	3640	35	1248	12	5512	53
211	1	1	2675	25	321	3	7704	72
211	1	2						
211	1	3						
211	1	4						
211	1	5						
211	1	6						
211	1	7						
217	1	1	2835	35	405	5	4860	60
217	1	2	7056	49	1728	12	5472	38
217	1	3	3933	57	414	6	2277	33
217	1	4	1394	34	1025	25	1435	35
217	1	5	4047	71	1083	19	456	8
217	1	6	2336	32	1241	17	3577	49
217	1	7	6030	45	536	4	6834	51
218	1	1	520	5	624	6	9256	89
218	1	2	1242	18	1587	23	3933	57
218	1	3	2360	40	649	11	2832	48
218	1	4	1092	26	882	21	2100	50
218	1	5	2838	43	858	13	2838	43
218	1	6						
218	1	7	1742	26	1474	22	3417	51
227	1	1	1659	21	474	6	5688	72
227	1	2						
227	1	3						
227	1	4						
227	1	5						
227	1	6						
227	1	7						

233	1	1	1140	10	456	4	9804	86
233	1	2	1665	45	592	16	1443	39
Veau	groupe	PS	Lympho	% L	Mono	% M	Neutro	% N
233	1	3	2665	41	1300	20	2535	39
233	1	4	1947	33	1475	25	2478	42
233	1	5	2451	43	912	16	2337	41
233	1	6	2772	66	504	12	714	17
233	1	7	3186	54	0	0	2596	44
234	1	1	1312	8	656	4	14432	88
234	1	2	1829	31	826	14	3245	55
234	1	3	1728	36	624	13	2400	50
234	1	4	2484	46	702	13	2052	38
234	1	5	2760	60	552	12	1196	26
234	1	6	1568	8	588	3	17444	89
234	1	7	4477	11	0	0	36223	89
239	1	1	2442	11	0	0	19758	89
239	1	2	2257	37	854	14	2989	49
239	1	3	2640	33	480	6	4880	61
239	1	4	2967	69	473	11	860	20
239	1	5	2394	57	420	10	1386	33
239	1	6	2772	44	378	6	3087	49
239	1	7	2726	29	1410	15	5170	55
244	1	1	2010	15	0	0	11390	85
244	1	2	1715	35	1176	24	2009	41
244	1	3	1836	34	1080	20	2430	45
244	1	4	3795	55	897	13	2139	31
244	1	5	1988	28	1349	19	3763	53
244	1	6	2829	41	1242	18	2760	40
244	1	7	2907	19	2295	15	9945	65
245	1	1	1508	13	232	2	9860	85
245	1	2	1674	31	810	15	2916	54
245	1	3	1938	38	663	13	2499	49
245	1	4	3311	43	1617	21	2618	34
245	1	5	2345	35	1139	17	3216	48
245	1	6	2997	37	1377	17	3645	45
245	1	7	3645	45	729	9	3726	46
247	1	1	2261	17	399	3	10640	80
247	1	2	2304	36	64	1	4032	63
247	1	3	1650	30	275	5	3520	64

247	1	4	4221	67	882	14	1197	19
247	1	5	2618	34	1155	15	3850	50
247	1	6	3484	52	469	7	2680	40
Veau	groupe	PS	Lympho	% L	Mono	% M	Neutro	% N
247	1	7	4018	49	984	12	3198	39
248	1	1	2226	14	1113	7	12561	79
248	1	2	3172	61	156	3	1872	36
248	1	3	2499	49	51	1	2550	50
248	1	4	4582	79	232	4	986	17
248	1	5	2106	27	1170	15	4524	58
248	1	6	2356	31	1672	22	3420	45
248	1	7	2380	34	700	10	3920	56
249	2	1						
249	2	2						
249	2	3						
249	2	4						
249	2	5	3135	55	0	0	2565	45
249	2	6	3375	45	0	0	4050	54
249	2	7	2200	44	900	18	1900	38
250	2	1						
250	2	2						
250	2	3						
250	2	4						
250	2	5	1763	41	946	22	1505	35
250	2	6	2280	38	1200	20	2520	42
250	2	7						
2251		1						
2251	2	2						
2251	2	3						
2251	2	4						
2251	2	5	3276	36	1365	15	4368	48
2251	2	6	5184	54	0	0	4416	46
2251	2	7	4453	61	365	5	2482	34
2252	2	1						
2252	2	2						
2252	2	3						
2252	2	4						
2252	2	5	1782	54	33	1	1485	45
2252	2	6	4836	62	78	1	2886	37

2252	2	7	4814	58	83	1	3403	41
2253	1	1	735	7	315	3	9450	90
2253	1	2	1496	17	1408	16	5896	67
2253	1	3	110	1	3960	36	6380	58
Veau	groupe	PS	Lympho	% L	Mono	% M	Neutro	% N
2253	1	4	1848	28	1188	18	3564	54
2253	1	5	2950	59	250	5	1800	36
2253	1	6	2520	72	420	12	490	14
2253	1	7	1410	47	330	11	1230	41
2254	2	1	1962	18	218	2	8720	80
2254	2	2	1739	37	1410	30	1504	32
2254	2	3	4047	57	213	3	2840	40
2254	2	4	4740	79	0	0	1260	21
2254	2	5						
2254	2	6	3572	47	1216	16	2812	37
2254	2	7	6032	58	104	1	4264	41
2255	2	1	1530	18	340	4	6545	77
2255	2	2	3174	46	759	11	2898	42
2255	2	3	3528	36	1274	13	4998	51
2255	2	4	4875	65	975	13	1650	22
2255	2	5						
2255	2	6	4148	61	1020	15	1564	23
2255	2	7	4736	74	64	1	1600	25
2256	1	1	1372	14	392	4	7742	79
2256	1	2	1836	34	486	9	3024	56
2256	1	3	2385	45	53	1	2862	54
2256	1	4	2650	50	477	9	2173	41
2256	1	5	4830	42	1610	14	5060	44
2256	1	6	4536	63	72	1	2520	35
2256	1	7	5162	89	290	5	290	5
2257	1	1	3900	39	300	3	5800	58
2257	1	2	3400	50	68	1	3332	49
2257	1	3	7398	54	274	2	5891	43
2257	1	4	3431	47	657	9	3212	44
2257	1	5						
2257	1	6						
2257	1	7						
2258	1	1	1720	10	516	3	14964	87
2258	1	2	1748	38	966	21	1886	41

2258	1	3	2520	24	840	8	7140	68
2258	1	4	2790	62	90	2	1620	36
2258	1	5	2880	64	180	4	1395	31
2258	1	6	4425	59	75	1	3000	40
2258	1	7	4480	64	140	2	2240	32
Veau	groupe	PS	Lympho	% L	Mono	% M	Neutro	% N
2259	1	1	644	4	1449	9	13846	86
2259	1	2	2604	42	1364	22	2170	35
2259	1	3	2976	31	480	5	6144	64
2259	1	4	2820	60	517	11	1363	29
2259	1	5	3000	60	250	5	1750	35
2259	1	6	3380	65	52	1	1768	34
2259	1	7						
2260	1	1	1106	14	237	3	6557	83
2260	1	2	3072	32	1536	16	4992	52
2260	1	3	2860	20	1716	12	9724	68
2260	1	4	2544	48	53	1	2703	51
2260	1	5						
2260	1	6						
2260	1	7						
2262	1	1	12276	22	5022	9	38502	69
2262	1	2	14539	31	1876	4	30485	65
2262	1	3	3660	20	0	0	14640	80
2262	1	4	2924	34	1204	14	4472	52
2262	1	5	2496	39	704	11	3200	50
2262	1	6	3363	59	741	13	1368	24
2262	1	7	4472	43	104	1	5824	56
2263	1	1	3674	22	1503	9	11523	69
2263	1	2	1265	23	220	4	4015	73
2263	1	3						
2263	1	4						
2263	1	5						
2263	1	6						
2263	1	7						
301	2	1	2730	35	234	3	4836	62
301	2	2	4836	62	78	1	2886	37
301	2	3	6943	53	0	0	6157	47
301	2	4	6596	68	0	0	3007	31
301	2	5	6783	57	119	1	4998	42

301	2	6	6305	65	0	0	3298	34
301	2	7	4551	37	1107	9	6642	54
302	2	1	2520	30	504	6	5376	64
302	2	2	882	21	798	19	2478	59
302	2	3	1440	24	1200	20	3300	55
302	2	4	2542	41	930	15	2728	44
Veau	groupe	PS	Lympho	% L	Mono	% M	Neutro	% N
302	2	5	2640	48	1045	19	1815	33
302	2	6	3416	61	56	1	2128	38
302	2	7	2695	35	847	11	4158	54
303	2	1	2900	25	464	4	8236	71
303	2	2	3784	43	88	1	4928	56
303	2	3	3744	36	0	0	6656	64
303	2	4	2600	52	1350	27	1000	20
303	2	5	4560	48	0	0	4940	52
303	2	6	2700	45	1140	19	2100	35
303	2	7	4998	49	0	0	5202	51
304	2	1	1210	10	484	4	10164	84
304	2	2	2414	34	284	4	4402	62
304	2	3	3280	40	902	11	4018	49
304	2	4	4661	59	790	10	2449	31
304	2	5	4408	58	76	1	3116	41
304	2	6	3549	39	455	5	5096	56
304	2	7	103	1	5253	51	4532	44
305	2	1	2190	30	584	8	4526	62
305	2	2	5304	52	918	9	3774	37
305	2	3	4944	48	824	8	4532	44
305	2	4	5632	64	264	3	2904	33
305	2	5	4968	54	92	1	4140	45
305	2	6	5244	76	69	1	1587	23
305	2	7						

Annexe 5 : Paramètres biochimiques des veaux de l'étude (glycémie, urée et taux de fibrinogène en g/L ; créatinine en mg/L ; PS=prise de sang ; groupe 1=clone ; groupe 2=témoin)

Veau	groupe	PS	Glycémie	Fibrinogène	Urée	Créatinine
103	1	1	1,56	0,88	0,29	18,7
103	1	2				
103	1	3				
103	1	4				
103	1	5				
103	1	6				
103	1	7				
105	1	1	1,15	1,7	0,16	12,5
105	1	2	1,07	5,29		
105	1	3		3,61		
105	1	4	0,96	1,80		
105	1	5	0,97	3,22		
105	1	6	1,15			
105	1	7	1,02	2,07		
60	2	1	1,11	1,61	0,15	11,8
60	2	2	1,41	2,64		
60	2	3	1,09	3,30		
60	2	4	0,94	3,30		
60	2	5		2,45		
60	2	6				
60	2	7				
112	1	1	1,01		0,17	12,2
112	1	2	1,16	2,33		
112	1	3	0,93	4,83		
112	1	4	0,70	2,84		
112	1	5	0,85	2,72		
112	1	6	0,84	3,09		
112	1	7		2,59		
121	1	1	0,59	1,25	0,20	23,9
121	1	2	1,55	5,61		
121	1	3	0,77	4,62		
121	1	4	0,38	3,09		
121	1	5				
121	1	6				

Veau	groupe	PS	Glycémie	Fibrinogène	Urée	Créatinine
121	1	7				
122	1	1	1,07	2,50	0,15	15,9
122	1	2	0,95	3,50		
122	1	3	0,85	2,40		
122	1	4	0,24	4,62		
122	1	5				
122	1	6				
122	1	7				
130	1	1	0,82	1,05	0,23	12,3
130	1	2	1,21			
130	1	3	1,17			
130	1	4	1,14			
130	1	5	1,10			
130	1	6	1,17			
130	1	7	1,15			
131	1	1	0,64	1,30	0,13	11,3
131	1	2	0,88			
131	1	3	1,05			
131	1	4	1,25			
131	1	5	1,01			
131	1	6	1,03			
131	1	7	1,19			
187	1	1	0,67	1,54	0,30	21,5
188	1	1	0,36	1,25	0,25	23,5
189	1	1	0,38	1,41	0,20	19,0
197	1	1	1,11	2,14	0,17	15,0
197	1	2	1,10	4,74		
197	1	3	1,11	2,93		
197	1	4	0,98	2,32		
197	1	5		3,69		
197	1	6	0,89	2,32		
197	1	7		2,32		
152	1	1	1,24	1,92	0,20	37,7
152	1	2	1,17	3,94		
152	1	3	1,13	6,58		
152	1	4				
152	1	5				
152	1	6				

152	1	7					
Veau	groupe	PS	Glycémie	Fibrinogène	Urée	Créatinine	
208	1	1	1,19	1,54			
208	1	2	1,06	3,58			
208	1	3	0,71	3,81			
208	1	4	0,89	1,99			
208	1	5	0,83	1,63			
208	1	6	0,82	1,92			
208	1	7		2,66			
211	1	1		1,45			
211	1	2					
211	1	3					
211	1	4					
211	1	5					
211	1	6					
211	1	7					
217	1	1	1,35	4,74	0,41	15,8	
217	1	2	0,84	6,58			
217	1	3	0,92	3,58	0,14	9,6	
217	1	4	1,15	1,79			
217	1	5	1,18	2,14			
217	1	6	1,04	2,86			
217	1	7	0,87				
218	1	1	1,18		0,27	21,1	
218	1	2	0,86	5,93	0,09	9,6	
218	1	3	1,37	2,86	0,11	10,7	
218	1	4	1,14	1,54			
218	1	5					
218	1	6					
218	1	7		2,72			
227	1	1			0,26	20,7	
227	1	2					
227	1	3					
227	1	4					
227	1	5					
227	1	6					
227	1	7					
233	1	1	1,29	3	1	4	

233	1	3		3,27		
233	1	4	1,08	3,37		
Veau	groupe	PS	Glycémie	Fibrinogène	Urée	Créatinine
233	1	5	0,97	3,27		
233	1	6	1,00	2,55		
233	1	7	0,89	2,08		
234	1	1	1,23	2,01		
234	1	2		201	0,09	11,1
234	1	3		2,67		
234	1	4	1,09	3,47		
234	1	5	0,79	3,18		
234	1	6		3,93		
234	1	7	0,82	5,59		
239	1	1	1,29	165	9	10,8
239	1	2	1,32	3,93		
239	1	3		1,94		
239	1	4	1,02			
239	1	5		2,16		
239	1	6	0,94	2,94		
239	1	7	0,69	2,24		
244	1	1	1,13	1,56	0,22	26,1
244	1	2	1,03	3,47		
244	1	3	1,09	1,65		
244	1	4	1,17	1,94		
244	1	5		2,93		
244	1	6	1,21	2,93		
244	1	7	1,01	3,09		
245	1	1	1,09	1,48	0,21	26,1
245	1	2	1,11	3,10		
245	1	3	1,30	2,08		
245	1	4	1,08	2,44		
245	1	5		3,26		
245	1	6	1,06	3,09		
245	1	7	1,18	2,66		
247	1	1	1,40	1,76	0,09	12,4
247	1	2	1,20	2,79		
247	1	3	0,73	2,16		
247	1	4		2,79		
247	1	5		6,85		

247	1	6	1,00	3,17		
247	1	7		2,34		
248	1	1	1,15	1,70	0,16	11,9
Veau	groupe	PS	Glycémie	Fibrinogène	Urée	Créatinine
248	1	2	0,99	3,79		
248	1	3	0,84	3,45		
248	1	4		3,67		
248	1	5		4,65		
248	1	6	0,80	3,92		
248	1	7		2,72		
249	2	1	0,90			
249	2	2				
249	2	3				
249	2	4				
249	2	5		2,16		
249	2	6		2,24		
249	2	7		1,70		
250	2	1				
250	2	2				
250	2	3				
250	2	4				
250	2	5		1,65		
250	2	6		2,08		
250	2	7				
2251		1	0,97			
2251	2	2				
2251	2	3				
2251	2	4				
2251	2	5		1,94		
2251	2	6		2,24		
2251	2	7		1,48		
2252	2	1	0,79			
2252	2	2				
2252	2	3				
2252	2	4				
2252	2	5		1,56		
2252	2	6		1,70		
2252	2	7		2,44		
2253	1	1			0,18	10,2

2253	1	2		3,36		
2253	1	3		3,45		
2253	1	4		2,93		
2253	1	5		2,16		
Veau	groupe	PS	Glycémie	Fibrinogène	Urée	Créatinine
2253	1	6		3,79		
2253	1	7		2,32		
2254	2	1	0,90	2,34	0,21	12,5
2254	2	2	1,04	2,24		
2254	2	3		2,34		
2254	2	4		2,44		
2254	2	5		2,24		
2254	2	6		2,08		
2254	2	7		3,45		
2255	2	1		2,86		
2255	2	2		3,56		
2255	2	3		3,09		
2255	2	4		2,66		
2255	2	5				
2255	2	6		2,65		
2255	2	7		3,35		
2256	1	1		1,03	0,11	13,8
2256	1	2		3,17		
2256	1	3		3,45		
2256	1	4		3,67		
2256	1	5		3,67		
2256	1	6		3,17		
2256	1	7		2,65		
2257	1	1	0,39	1,27	0,22	13,7
2257	1	2	0,78	4,35		
2257	1	3		8,19		
2257	1	4	0,58	7,22		
2257	1	5				
2257	1	6				
2257	1	7				
2258	1	1		1,94	0,11	12,6
2258	1	2		3,79		
2258	1	3		2,08		
2258	1	4		1,22		

2258	1	5		2,44		
2258	1	6		1,86		
2258	1	7				
2259	1	1		2,08	0,08	10,5
2259	1	2		3,26		
Veau	groupe	PS	Glycémie	Fibrinogène	Urée	Créatinine
2259	1	3		1,81		
2259	1	4		2,66		
2259	1	5		3,36		
2259	1	6		3,17		
2259	1	7				
2260	1	1	0,60	1,27	0,16	10,8
2260	1	2		4,88		
2260	1	3	1,12	5,56		
2260	1	4		2,79		
2260	1	5				
2260	1	6				
2260	1	7				
2262	1	1		3,09	0,20	18,8
2262	1	2		2,93		
2262	1	3		4,88		
2262	1	4		6,46		
2262	1	5		5,10		
2262	1	6		2,32		
2262	1	7		1,99		
2263	1	1	1,30	3,45	0,24	17,7
2263	1	2	0,98	4,19		
2263	1	3				
2263	1	4				
2263	1	5				
2263	1	6				
2263	1	7				
301	2	1		1,99	0,11	16,0
301	2	2		4,20		
301	2	3		4,52		
301	2	4	0,75	2,53		
301	2	5	0,66	1,92		
301	2	6	0,93	1,86		
301	2	7	0,88	3,08		

302	2	1			0,13	13,2
302	2	2		2,71		
302	2	3		2,42		
302	2	4		2,65		
302	2	5		2,53		
302	2	6		3,67		
Veau	groupe	PS	Glycémie	Fibrinogène	Urée	Créatinine
302	2	7		2,15		
303	2	1		1,74	0,09	20,5
303	2	2		2,07		
303	2	3		4,20		
303	2	4		2,53		
303	2	5		3,26		
303	2	6		3,79		
303	2	7		2,78		
304	2	1		2,03	0,19	11,3
304	2	2		2,23		
304	2	3		2,23		
304	2	4		2,42		
304	2	5		2,65		
304	2	6		2,42		
304	2	7		2,23		
305	2	1		2,53	0,14	14,9
305	2	2		2,65		
305	2	3		2,70		
305	2	4		2,42		
305	2	5		2,71		
305	2	6		2,32		
305	2	7				

ETUDE HEMATOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET CLINIQUE COMPARATIVE DE VEAUX ISSUS DE CLONAGE SOMATIQUE ET DE VEAUX TEMOINS

ISSENMANN Hedwige :

RESUME :

Neuf critères hématologiques (taux d'hémoglobine, hématocrite, volume globulaire moyen, numérations des lymphocytes, des neutrophiles et des monocytes et leur pourcentage respectif dans la formule leucocytaire) et quatre paramètres biochimiques (glucose, urée, créatinine et taux de fibrinogène) sont étudiés chez 23 veaux produits par clonage somatique et 12 témoins d'insémination artificielle, entre 1 et 63 jours après la naissance, dans le but de déterminer s'il y a des différences significatives entre les deux groupes et si les clones sont normaux. Le poids de naissance, les caractéristiques cliniques et le taux de mortalité de 35 clones somatiques et de 15 témoins d'IA sont également comparés.

Les valeurs obtenues chez les clones pour les différents paramètres mesurés sont dans les normes pour le veau. Cependant, les clones ont un taux d'hémoglobine et un hématocrite significativement plus faibles que les témoins, et un taux de fibrinogène significativement plus élevé que les témoins. Les clones présentent de nombreuses anomalies cliniques et congénitales, qui entraînent un fort taux de mortalité, surtout dans les premiers jours après la naissance. Il semble cependant que, passé ce stade, les clones puissent se développer normalement, de la même façon que les témoins.

Mots-clés :

Veau, clonage, hématologie, biochimie, clinique

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. REMY

Assesseur : Dr. MILLEMANN

Invité :

Dr. CHAVATTE-PALMER

Adresse de l'auteur :

Melle Hedwige ISSENMANN

3, square Claude Barrès

92200 Neuilly-sur-Seine

HEMATOLOGIC, BIOCHEMICAL AND CLINICAL COMPARATIVE STUDY OF SOMATIC CLONED CALVES AND CONTROLS

ISSENMANN Hedwige :

SUMMARY :

Nine hematological parameters (hemoglobin concentration, hematocrit, mean corpuscular volume, total counts of lymphocytes, neutrophils and monocytes and their percentage in the total leukocyte count) and four biochemical parameters (glucose, urea, creatinine and fibrinogen) are studied in 23 somatic cloned calves and 12 AI calves, between 1 and 63 days after birth. The objective of the study is to know whether there are significant differences between clones and controls, and whether cloned calves are normal. Body weight at birth, clinical features and mortality rate of 35 somatic cloned calves and 15 AI calves are also compared.

Clones' values for the different parameters are within normal ranges for calves. However, hemoglobin concentration and hematocrit are significantly lower in clones than in controls, and fibrinogen is significantly higher in clones than in controls. Clones exhibit several types of clinical and congenital abnormalities that may hinder their survival. Mortality is high in the first days after birth, but 2 Tw̄rufibrinoge4

