

## CHAPITRE 4.11.

# TRANSFERT NUCLÉAIRE DE CELLULES SOMATIQUES CHEZ LE BÉTAIL ET LES CHEVAUX D'ÉLEVAGE

Article 4.11.1.

### Préface

Suite à la première réunion du Groupe *ad hoc* de l'OIE sur la biotechnologie qui s'est tenue du 3 au 5 avril 2006, la Commission des normes biologiques de cette Organisation a suggéré de limiter le mandat « à l'élaboration de recommandations relatives aux risques que constituent pour la santé animale le clonage par transfert nucléaire de cellules somatiques (TNCS) des animaux de rente, y compris les critères d'évaluation de la santé des embryons et des animaux issus de ce clonage ». Les recommandations qui suivent sont une amorce permettant l'identification et la caractérisation des *risques* pour la santé animale associés à la technologie du clonage par TNCS, ainsi qu'une base de discussion sur ces risques.

Article 4.11.2.

### Généralités

Lors de la première réunion du Groupe *ad hoc* sur la biotechnologie, il a été recommandé que le Sous-groupe chargé des biotechnologies de la reproduction animale rédige des recommandations sur l'*analyse des risques* réalisée selon le principe du cycle de vie pour les animaux issus de la biotechnologie. Il a été proposé de définir les « Biotechnologies de la reproduction animale » comme étant « la production d'animaux grâce à l'utilisation des technologies de reproduction assistée (TRA), qui vont de l'insémination artificielle aux techniques faisant appel à une composante *in vitro* importante, telles que la fécondation *in vitro*, le transfert d'embryons, la scission d'embryon et englobant la reproduction asexuée telle que le transfert nucléaire ». Les recommandations qui suivent sont limitées au clonage par TNCS, et reposent sur une *analyse des risques* appliquée aux animaux issus des biotechnologies subdivisés en catégories selon le principe du cycle de vie qui suit le schéma suivant : i) embryons, ii) receveurs, iii) descendance, iv) progéniture des animaux clonés.

Article 4.11.3.

### Champ d'application

Les présentes recommandations portent sur les aspects liés à la santé des *animaux* de rente issus de certaines biotechnologies de la reproduction.

Compte tenu du mandat qui a été assigné à l'OIE et de la suggestion de la Commission des normes biologiques de cette Organisation, le Groupe *ad hoc* sur la biotechnologie recommande d'identifier les paramètres de l'*analyse des risques* pour la santé animale et leurs conséquences sur la sécurité de l'environnement et la sécurité sanitaire des denrées alimentaires et des aliments destinés aux animaux. Les présentes recommandations seront initialement axées sur les critères scientifiques appliqués à l'évaluation des *risques*, aux mesures de prévention et aux conseils en matière d'animaux de rente et de chevaux issus du clonage par TNCS. Cette orientation initiale n'exclut nullement l'ajout de questions importantes à un stade ultérieur. À l'heure actuelle, les présentes recommandations englobent les points suivants :

- identification des *risques* pour la santé animale et recommandations relatives à la *gestion de ces risques* chez les embryons, les receveurs, les animaux clonés et la progéniture des animaux clonés ;
- *risques* et mesures de prévention liés aux techniques de clonage par TNCS ;
- quelques questions liées au *bien-être des animaux*.

Sachant en outre que les questions suivantes ont été prises en compte par d'autres instances ou instruments, ou sont susceptibles de l'être, ou encore qu'elles pourront être traitées ultérieurement par l'OIE, le document ne traite pas des points suivants :

- sécurité sanitaire et aspects nutritionnels des aliments issus des technologies de reproduction assistée, tels que les aliments transgéniques (traités par le Codex) ;
- *risques* liés à l'introduction dans l'environnement d'animaux clonés ;
- *risques* liés aux animaux transgéniques qui n'ont pas été obtenus par transfert nucléaire de cellules somatiques ou autres techniques de clonage ;
- biotechnologies appliquées aux animaux non reproducteurs ;
- *risques* liés aux animaux produits à des fins de xénotransplantation ou comme donneurs d'organes ;
- technologies liées aux cellules souches ;
- *risques* liés à la santé des animaux aquatiques, y compris les poissons clonés ;
- *risques* liés aux autres *animaux* terrestres tels que les *animaux sauvages* (mammifères et autres), y compris les volailles et les insectes.

#### Article 4.11.4.

### **Cadre général : analyse de risque – principes généraux**

1. En général, l'*analyse de risque* comporte l'*identification des dangers*, l'*appréciation du risque*, la *gestion du risque* et la *communication relative au risque*. L'*appréciation du risque* est le volet de l'analyse qui permet d'estimer les *risques* associés à un *danger* (voir chapitre 2.1.). Ces principes sont systématiquement utilisés par les organismes de surveillance pour prendre des décisions concernant les rejets expérimentaux ou commerciaux. Ces analyses peuvent ensuite être utilisées pour déterminer si les résultats obtenus appellent une gestion ou une réglementation. La *gestion du risque* est la démarche par laquelle les experts évaluent les autres actions ou politiques possibles en réponse au(x) résultat(s) de l'*appréciation du risque* en prenant en compte les différents aspects sociaux, économiques et juridiques qui constituent le cadre dans lequel ces activités se déroulent.
2. Pour ce qui est des *maladies* animales, en particulier celles figurant dans le *Code terrestre*, un accord général existe sur la nature des risques potentiels ; ces *risques* peuvent être qualitatifs ou quantitatifs (voir chapitre 2.1.). Dans les scénarios de *maladie*, il est plus probable qu'une *appréciation qualitative du risque* soit la seule requise. Les évaluations qualitatives ne nécessitent pas de recourir à une modélisation mathématique pour procéder aux prises de décision courantes. Les appréciations quantitatives ou semi-quantitatives attribuent aux *risques* une valeur numérique (par exemple, 1/1 000 000) ou descriptive (élevé/moyen/faible).

3. Dans le contexte du clonage animal, on distingue deux grandes catégories d'*appréciation du risque* : l'*appréciation du risque* absolu et l'analyse comparée des *risques*. L'*appréciation du risque* absolu permet de caractériser le *risque* sans le rapporter à un élément de comparaison (par exemple, la probabilité qu'un animal transmette une *maladie* du bétail donnée). L'analyse comparée des *risques* (ou *appréciation du risque* relatif) place le *risque* dans le contexte d'une comparaison : par exemple, la probabilité qu'un animal produit par une technique de reproduction transmette une *maladie* donnée à un autre animal de la même espèce comparée à la probabilité qu'un animal similaire produit par une autre technique de reproduction transmette la même *maladie* à un autre animal de la même espèce.
4. Quelle que soit la méthodologie employée, l'*identification des dangers* constitue une étape préliminaire dans toutes les *appréciations du risque* fondées sur des critères scientifiques. Dans le cadre de l'*appréciation des risques* associés au clonage animal (TNCS), de l'embryon au développement de l'animal cloné puis à la descendance, il est important d'affirmer clairement à ce stade que seule une appréciation comparative semi-quantitative du *risque* peut être réalisée. L'appréciation systématique, absolue, quantitative des *risques* potentiels est difficile en raison du caractère relativement nouveau de la technologie et de la variabilité des résultats selon les *laboratoires* et les espèces clonées. En outre, avec la technique du TNCS, il n'existe aucun *danger* découlant de l'introduction de nouveaux gènes (ce qui peut se produire dans le cas de la transgénèse). En conséquence, l'analyse des facteurs qui contribuent aux *risques* pour la santé animale passe par l'analyse des éléments de référence existants.
5. En résumé, il faut identifier les points spécifiques sur lesquels doit être axée l'*appréciation du risque*. Comme l'illustre le diagramme ci-joint – l'accent est mis sur l'examen des éléments essentiels de la création d'un embryon – selon la terminologie actuelle, en commençant par la sélection du donneur d'ovocyte et des cellules pour aller jusqu'à la création d'un embryon par la méthode du clonage. La deuxième phase sera axée sur le receveur de l'embryon cloné et les aspects liés à la santé et aux soins des animaux. Le clone d'embryon qui représentera une descendance constitue la troisième partie du système dont l'évaluation nécessite des recommandations claires, et la génération suivante, soit la descendance de l'animal cloné (qui est le fruit d'une reproduction sexuée normale), soit les animaux produits par reclonage (clones de clones), est la quatrième et dernière étape.

#### Article 4.11.5.

### Gérer les risques pour la santé animale associés aux embryons

La production d'embryons par des techniques *in vitro* existe depuis de nombreuses années. Bien que les étapes supplémentaires que comporte le clonage confèrent une nouvelle dimension à cette technique, nombre de *risques* associés au TNCS ont été antérieurement identifiés pour des biotechniques de reproduction animale bien établies (voir chapitre 4.8.). Une analyse de la méthodologie appliquée au TNCS permet de classer comme suit les éléments de l'opération :

- a) Ovocytes (obtenus à l'abattoir, recueillis par ponction transvaginale échoguidée ou par laparotomie)  
Les ovaires qui font l'objet d'un prélèvement dans un abattoir doivent être prélevés, transportés et traités conformément aux recommandations exposées dans le chapitre 4.8.  
Les principaux risques sont associés à l'état de santé de l'animal chez lequel les ovaires sont prélevés et à la qualité des ovocytes.
- b) Cellules donneuses (cellules obtenues chez l'animal choisi pour qu'il soit cloné – par biopsie, recueillies à l'abattage ou après la mort)  
Actuellement, on ne constate aucun nouveau *risque* spécifique lié au clonage par TNCS. On a suggéré l'existence d'un *risque* lié à l'activation de rétrovirus endogènes lors des techniques de transfert cellulaire, mais ce *risque* pourrait être plus théorique que réel. Dans certaines techniques expérimentales actuelles, la cellule donneuse peut être traitée par des agents chimiques pour modifier sa composition, par exemple par inhibiteurs de cycle cellulaire ou modificateurs de la chromatine.
- c) Mise en culture *in vitro* des embryons reconstruits (technique utilisée pour la fusion du matériel du donneur et du receveur et pour la mise en culture de l'embryon reconstruit)

- d) Risques associés à la méthode de fusion des cellules donneuses avec des ovocytes receveurs énucléés et en conditions de culture.

En outre, le manipulateur doit veiller à ce que la gestation du clone soit compatible avec la race, l'anatomie et la physiologie de la mère de remplacement.

### 1. Ovocytes

Le laboratoire ou le producteur doit établir un dossier détaillé relatif aux ovaires – leur origine, l'état de santé de l'animal chez lequel ils ont été obtenus, les informations sur les lésions systémiques présentes sur l'animal et les données adaptées relatives au troupeau. Ces renseignements sont particulièrement utiles lorsque le mélange des ovaires est susceptible de donner lieu à une contamination croisée du tissu ovarien.

Les liquides folliculaires peuvent contenir différents agents infectieux tels que le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) et peuvent contaminer le liquide folliculaire mélangé provenant d'animaux sains. En outre, le choix de la technique permettant le recueil des ovocytes, telles que l'aspiration ou le découpage en tranches des follicules ovariens, détermine le degré de contamination sanguine ou la quantité de matériel étranger. Il convient de recueillir un échantillon représentatif pour démontrer l'absence de matériel biologique infectieux pour chaque lot mélangé.

Les ovocytes sont amenés à maturation en tant que complexes ovocytes-cumulus (COC) puis placés dans la plupart des cas dans un milieu de culture ou maturation. Il faut apporter un soin et une attention tous particuliers à la sélection et à la maturation des ovocytes issus des mélanges qui sont satisfaisants d'un point de vue morphologique ; de même, la qualité du milieu utilisé doit avoir été testée. Il faut s'abstenir d'utiliser des éléments sériques ou protéiques provenant d'une source non définie ou non testée. L'ajout d'antibiotiques adaptés et sans danger dans les milieux de culture pour empêcher la prolifération de bactéries opportunistes doit être encouragé.

L'application de mesures sanitaires ou de méthodes de *désinfection* adaptées revêt une importance capitale, et doit être privilégiée dans tout laboratoire de fécondation *in vitro* (FIV). La manipulation correcte et le respect des protocoles sanitaires lors de la maturation et de la mise en culture ultérieure des embryons doivent être encouragés.

### 2. Cellules donneuses

Afin de réduire les *risques*, il faut respecter ce qui suit :

- Les cellules donneuses doivent être recueillies comme il convient à partir de l'animal et mises en culture dans les conditions sanitaires appropriées selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- Le cas échéant, le repiquage des cellules utilisées pour la procédure de clonage doit être documenté et un échantillonnage peut s'avérer nécessaire à différentes étapes pour rechercher la présence d'éléments chromosomiques des lignées cellulaires. Si possible, il doit exister des procédures permettant l'échantillonnage régulier des cellules pour mettre en évidence des caractéristiques morphologiques ou autres.
- Les lignées de cellules souches (destinées au clonage à une étape ultérieure) doivent être conservées dans des conditions jugées optimales pour le maintien de leur viabilité. L'absence d'agents étrangers doit être établie en recherchant la présence de bactéries, de champignons, de mycoplasmes ou de virus, à l'aide de tests appropriés (voir Manuel de la Société internationale de transfert d'embryons).

### 3. Techniques de clonage ou reconstruction

La méthode de clonage qui fait appel à l'utilisation d'agents chimiques ou d'autres réactifs doit être soigneusement évaluée en termes de qualité des embryons et d'efficacité globale.

La fusion entre le matériel du receveur et du donneur par des moyens chimiques et physiques exige attention et minutie. Il faut déterminer l'optimisation du mode opératoire sur la base des protocoles de laboratoire ou des rapports publiés pour éviter une mortalité embryonnaire précoce.

Si une co-culture de la cellule est réalisée pour la mise en culture après reconstruction des embryons, un dépistage approprié des cellules de co-culture doit être effectué. On peut rechercher dans un échantillon de chaque lot la présence de bactéries, champignons, mycoplasmes ou virus.

Les embryons doivent être mis en culture et collectés pendant un laps de temps approprié en vue de leur transfert ou de leur cryoconservation pour un usage ultérieur. Il faut suivre les modes opératoires basés sur les normes internationales (Codes d'usages de la Société internationale de transfert d'embryons) pour le lavage et la conservation des embryons.

Il faut veiller à ce qu'un certain nombre de conditions soient respectées concernant la qualité des embryons avant transfert (voir chapitres 4.7. et 4.8.).

#### Article 4.11.6.

### Gestion des risques pour la santé animale liés aux receveurs (mères de substitution)

#### 1. Risques pour la santé animale chez les mères de substitution

Actuellement la gestation dans le cadre du TNCS, comparée aux embryons produits *in vitro*, est associée à un taux élevé d'échecs et, chez certaines espèces, cette technique est à l'origine d'anomalies placentaires. Les pertes dues à des anomalies des embryons ou à l'échec de l'implantation dans l'utérus de la mère de substitution ne représentent pas un danger pour la mère. Dans ces cas, on observe simplement chez la mère de substitution une résorption de tous les tissus embryonnaires et une reprise de ses cycles. Les avortements spontanés en milieu et en fin de gestation peuvent être dangereux pour elle si elle ne parvient pas à expulser le fœtus et ses membranes. La plupart des avortements survenant dans le cadre de gestations naturelles et par insémination artificielle chez les bovins ne sont pas diagnostiqués en raison des coûts de laboratoire et de la faible marge bénéficiaire de la filière bovine et laitière. Les producteurs et les vétérinaires s'inquiètent quand le taux d'avortement dans un troupeau dépasse 3 à 5 pourcent. Il faut prendre en compte l'impact potentiel des influences extérieures pour l'évaluation des gestations utilisant le TNCS ou d'autres techniques de reproduction. On sait que les *maladies*, la sous-nutrition et les mauvaises conditions ambiantes sont des facteurs de stress qui compromettent la fécondité des animaux et la survie des embryons. Dans ces circonstances, le risque est directement lié aux facteurs de stress et non à la technique utilisée.

On observe actuellement des effets spécifiquement liés à l'espèce. Les anomalies touchant les clones peuvent être dues à une reprogrammation incomplète du noyau donneur. La reprogrammation épigénétique se produit chez les embryons de différentes espèces. De nombreuses anomalies signalées dans le cadre de gestations bovines et ovines n'ont pas été observées chez les caprins ou les porcs portant des clones obtenus par TNCS. Les chances de succès de la gestation sont inversement proportionnelles au degré de manipulation *in vitro* de l'embryon. Ce phénomène a été observé à la fois chez les embryons produits par TNCS et chez ceux obtenus par fécondation *in vitro*. Contrairement aux autres types de techniques de reproduction, les pertes de gestation par le TNCS se produisent à tous les stades de la gestation chez les bovins. Les pertes de clones constatées durant le deuxième et le troisième trimestre de gestation ont été associées à une hydropisie, une hypertrophie ombilicale ou une placentation anormale.

#### 2. Risques pour la santé des embryons clonés dus à la mère de substitution

Aucun nouveau *risque* pour le développement du fœtus cloné lié à la mère de substitution n'a été identifié comparativement aux gestations classiques. Les *risques* dans le cadre de ces dernières sont les *maladies* transmises verticalement et les anomalies dues au stress métabolique ou physiologique.

En ce qui concerne les *risques* pour la santé animale liés à la mère de substitution, il est difficile de réunir des informations sur la fréquence relative des pertes à un stade précoce d'embryons obtenus par TNCS comparée à celle des pertes à un stade précoce des autres gestations puisque ces avortements ne sont généralement pas diagnostiqués dans le cas des autres techniques de reproduction. En outre, les facteurs de stress extérieurs ont le même impact sur les gestations par le clonage par TNCS.

Les vétérinaires doivent suivre l'évolution de la gestation étant donné que les anomalies communes de la gestation constatées dans d'autres technologies de reproduction assistée peuvent se manifester et être diagnostiquées pendant l'examen physique. Une base de données contenant les problèmes communément rencontrés dans les gestations par clonage rendrait service aux experts de la santé animale si elle était accessible.

- Il faut veiller à évaluer la santé générale de la mère de substitution avant de la choisir pour qu'elle porte les embryons clonés. L'état de santé général de la mère doit être déterminé en fonction de l'absence d'infection et de maladie, d'une vaccination et d'un suivi adéquats et, si possible, de la preuve de gestations antérieures sans incidents, d'absence de problèmes de parturition, et de rétablissement adéquat après la gestation.
- Les pertes de gestations les plus importantes sont constatées avec les embryons obtenus par TNCS chez les bovins avant 60 jours de gestation. Cela correspond au schéma que l'on observe avec les autres technologies reproductives. Toutefois, dans le cas des clones, les fortes pertes de gestation pendant cette étape de formation placentaire (entre 45 et 60 jours) portent à croire que la mort embryonnaire est peut être due à un défaut de nidation. Une nidation anormale peut déclencher une accumulation de déchets chez le fœtus et dans les membranes qui l'entourent, ou un transfert insuffisant de nutriments et d'oxygène de la mère au fœtus. Il faut suivre de près la mère de substitution pendant la gestation. Dès que la gestation est constatée et confirmée, il convient d'effectuer des examens vétérinaires réguliers et un suivi constant de l'état sanitaire de l'animal jusqu'à la naissance de la descendance.
- Pour s'assurer que l'animal receveur est gravide et pour suivre sa santé pendant les trois premiers mois, il est utile d'effectuer des évaluations par échographie, de déterminer le profil hormonal et d'évaluer les paramètres physiologiques généraux. À partir de ces données, il faut veiller soigneusement au bon déroulement de la gestation en assurant des conditions adéquates d'élevage et de nutrition.
- Les animaux doivent être observés attentivement pour déceler les signes de travail quand le moment de la naissance approche. Chez certaines espèces, un des problèmes les plus fréquents est l'inertie utérine et l'absence de contractions. Cette absence peut provoquer une gestation prolongée avec des séquelles associées qui peuvent nécessiter une assistance à la parturition.
- Si la situation le justifie, il faut avoir recours à une intervention chirurgicale et elle doit être accessible à l'animal proche du terme. On doit employer des procédures adéquates pour garantir une manipulation correcte de la descendance et de la mère de substitution.
- Des problèmes de santé peuvent survenir par suite de l'intervention chirurgicale, de tractions excessives ou d'autres complications comme la rétention des membranes fœtales. Dans ces cas les soins post partum peuvent s'avérer nécessaires.

### 3. Gestion des risques pour la santé animale chez les animaux clonés

Les problèmes de santé des animaux clonés peuvent être observés *in utero* et *post-partum*. Ce sont apparemment les mêmes que ceux observés chez les autres animaux issus des technologies de la reproduction assistée, mais ils peuvent être plus fréquents chez les clones. Il est essentiel de déterminer si les anomalies sont d'origine génétique ou épigénétique. Le syndrome du gros veau (LOS = large offspring syndrome), qui est vraisemblablement associé à des anomalies placentaires plutôt qu'à des anomalies fœtales, ont été fréquemment constatés notamment chez les ovins et bovins clonés, consécutivement à des conditions suboptimales de manipulation *in vitro*. Ces anomalies sont moins courantes chez les petits ruminants.

- Les bonnes pratiques d'élevage sont importantes pour la santé des animaux clonés. Il faut veiller à leur fournir du colostrum et à leur assurer un environnement propre et hygiénique. On doit les surveiller pendant les quelques semaines suivant la naissance.
- On doit rechercher systématiquement chez les animaux clonés les anomalies phénotypiques les plus communes, comme l'atrésie de l'anوس, la hernie ombilicale, les contractions des muscles fléchisseurs, l'insuffisance respiratoire ou cardiaque et l'impossibilité de téter. Ces précautions

permettront de traiter et soigner convenablement le nouveau-né et augmenteront les chances de survie du jeune animal.

- Pour accroître les connaissances actuelles sur le statut sanitaire des animaux clonés, on doit effectuer un examen vétérinaire complet afin de suivre l'évolution du clone, étant donné que l'on a publié des cas de morts inexplicables ou dues à des complications systémiques. Il est recommandé de suivre le profil de santé des animaux au moins jusqu'au stade de maturité reproductive (indice de fertilité).
- Les préoccupations de santé animale qui vont du LOS aux anomalies graves sont très souvent mentionnées dans les débats portant sur la technologie du clonage. Il faut mettre en œuvre des recherches adéquates et constituer des données revues par les pairs. Les animaux clonés doivent faire l'objet d'évaluations simples du *bien-être* spécifiques à l'espèce. Si l'on détecte des inquiétudes en matière de *bien-être*, il faut effectuer une caractérisation plus poussée de ce phénotype pour obtenir des informations sur ce type d'inquiétudes.
- Il faut recueillir des données sur le suivi de la population animale pendant les diverses étapes de la vie, de la naissance à la puberté, afin d'étudier et de valider le potentiel génomique des animaux clonés.

#### 4. Gestion des risques pour la santé animale liés à la progéniture des clones issue d'une reproduction sexuée

Rien ne prouve actuellement que le risque pour la santé est aggravé si l'on utilise la reproduction sexuée pour obtenir une progéniture. Certaines données indiquent que les erreurs de reprogrammation au cours du processus de clonage peuvent en fait être corrigées pendant le processus naturel d'accouplement et de reproduction.

- a) La caractérisation du profil sanitaire, y compris l'état de santé et les données sur le *bien-être animal*, renforcerait les connaissances sur la progéniture issue d'une reproduction sexuée.
- b) Le suivi de la performance reproductive de la progéniture des clones issue d'une reproduction sexuée serait utile pour évaluer leur capacité reproductive par comparaison à celle de leurs équivalents ordinaires.

#### 5. Gestion des risques pour la santé animale liés au reclonage/clones de clones

Les premières informations sur le reclonage commencent seulement à être disponibles. Il est donc nécessaire de suivre la démarche présentée ci-dessous :

- a) Le profil de santé (état de santé et données sur le *bien-être animal*) doit être caractérisé pour renforcer les connaissances.
- b) Il faut suivre la performance reproductive des clones de clones pour évaluer la capacité sexuelle de ces animaux par comparaison à celle de leurs équivalents ordinaires.

Article 4.11.7.

## Examen

Les présentes dispositions ont pour objectif de fournir une base scientifique et des recommandations sur les risques pour la santé et le *bien-être des animaux* qui sont impliqués dans le clonage par TNCS comparés à ceux liés aux autres animaux issus des technologies de la reproduction assistée. Elles se centreront initialement sur la base scientifique sur laquelle reposent les aspects d'*appréciation du risque*, les mesures de prévention et les orientations pour la production de bétail et de chevaux issus du clonage par TNCS. Par ailleurs, elles devront être revues à la lumière des nouvelles informations scientifiques.

