

## Choix du sexe : possibilités et limites chez les animaux domestiques

Corinne Cotinot

### Détermination du sexe des embryons

**F**aire naître à volonté des animaux de sexe désiré est une possibilité aujourd'hui accessible aux éleveurs grâce aux nouvelles techniques de biologie moléculaire, associées aux progrès concernant la maîtrise de la reproduction. Au cours de la dernière décennie, la transplantation embryonnaire a connu un développement important notamment chez les bovins. En France, le nombre d'embryons transférés est passé de quelques dizaines à environ 35 000 en 1991 (8<sup>e</sup> réunion de l'Association européenne de transfert embryonnaire, Lyon, 11 - 12/09/1992). De plus, la possibilité de conserver l'embryon par congélation à - 196° C pour une longue durée a été un facteur supplémentaire de développement des techniques de transfert. Pour les espèces à intérêt zootechnique, trois approches sont envisageables pour choisir le sexe des descendants : déterminer *a posteriori* le sexe d'un embryon, inséminer avec du sperme sexé et trié, modifier le patrimoine génétique des individus femelles par transgénèse, en injectant dans des embryons le fragment du chromosome Y (gène SRY) capable d'induire la différenciation des testicules.

Parmi ces trois approches, seule la première est effectivement utilisable à ce jour ; les deux autres sont encore dans le domaine expérimental, mais ouvrent des perspectives intéressantes.

Les premiers essais de sexage des embryons de mammifères avant leur transfert remontent au début des années 70. Les différentes méthodes de sexage sont toutes soumises aux mêmes exigences : avoir le moins possible d'effets délétères sur la survie embryonnaire, être compatible avec le stade de développement auquel la transplantation et la congélation des embryons sont optimales (stade blastocyste — 7 à 8 jours de gestation chez les bovins), être totalement fiables et reproductibles, être simples, rapides et efficaces sur un grand nombre d'individus, être d'un coût acceptable. En

réalité très peu de techniques se sont révélées capables de satisfaire simultanément ces impératifs, à la fois techniques et physiologiques.

### Analyse cytogénétique

Chez les mammifères, le sexe génétique est déterminé au moment de la fécondation, selon que le spermatozoïde est porteur d'un chromosome sexuel X ou Y. L'embryon résultant sera de sexe femelle XX ou de sexe mâle XY respectivement. Chez pratiquement toutes les espèces d'élevage, le chromosome X est nettement plus grand que l'Y (*tableau 1, photo 1*). Le chromosome X représente environ 5 % du génome haploïde, alors que le chromosome Y correspond à environ 1 % du matériel génétique.

**Tableau 1**

### Morphologie des chromosomes sexuels chez différentes espèces domestiques

Espèces	Nombre de chromosomes	Chromosome X	Chromosome Y
<i>Bos taurus</i> (bovin européen)	60	Grand Submétacentrique	Petit Métacentrique
<i>Ovis aries</i> (mouton)	54	Grand Acrocentrique	Très petit Métacentrique
<i>Capra hircus</i> (chèvre)	60	Grand Acrocentrique	Très petit Métacentrique
<i>Sus scrofa</i> (porc)	38	Moyen Métacentrique	Petit Métacentrique
<i>Equus caballus</i> (cheval)	64	Moyen Submétacentrique	Petit Acrocentrique

Morphology of the sex chromosomes in various domestic species

C. Cotinot : INRA, Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Bâtiment biotechnologies, 78350 Jouy-en-Josas, France.

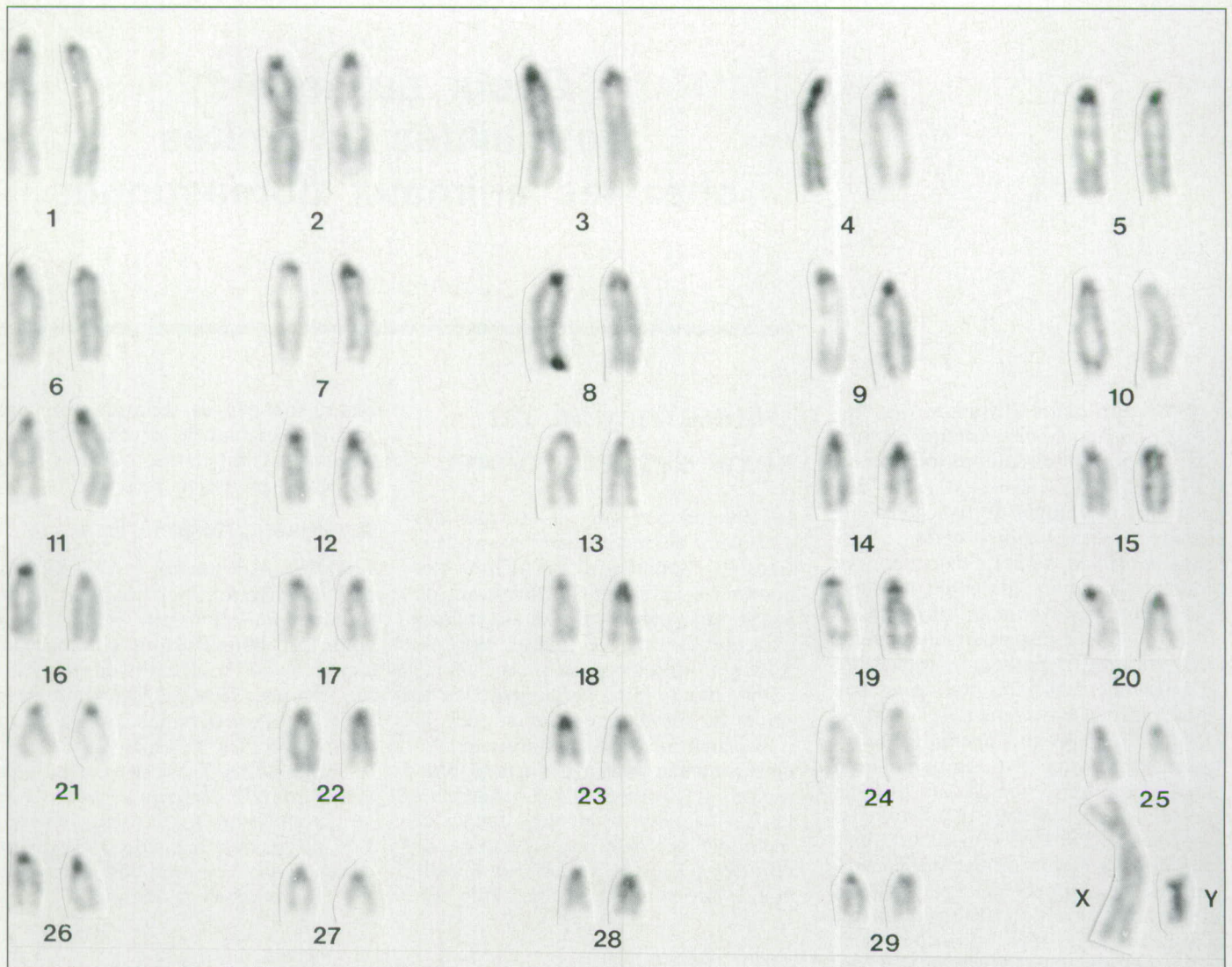


Photo 1. Le caryotype bovin comprend 60 chromosomes. Les autosomes sont tous acrocentriques alors que les chromosomes sexuels X et Y sont submetacentriques. (Cliché P. Popescu, INRA)

Photo 1. Bovine karyotype (60 chromosomes). All the autosomes are acrocentric whereas the X and Y sex chromosomes are submetacentric

L'analyse cytogénétique nécessite des cellules en division pour pouvoir identifier individuellement chaque chromosome. Bien que le pourcentage d'embryons sexés par cette technique soit faible (30 % à partir de biopsies comprenant 10 à 20 cellules embryonnaires), cette méthode fournit des résultats fiables à 100 % et reste la méthode de référence [1].

### Détection de l'antigène H-Y

Cette technique est basée sur la détection immunologique d'une molécule

de surface considérée comme spécifique des cellules mâles. De nombreuses équipes ont essayé de produire des anticorps dirigés contre cet antigène en immunisant des femelles avec des cellules mâles de différentes origines tissulaires, les anticorps servant ensuite à identifier les cellules embryonnaires mâles. Bien que cette technique ait eu du succès pendant une certaine période, elle est aujourd'hui abandonnée car les résultats obtenus depuis 20 ans restent difficiles à reproduire et sont très controversés.

### Approche moléculaire du sexage

Le clonage de séquences d'ADN spécifiques du chromosome Y dans plusieurs espèces a permis de détecter la présence de celui-ci par hybridation moléculaire à partir de très peu de cellules embryonnaires (3 à 10). Ce sont surtout des séquences répétées qui ont été utilisées comme sonde en matière de sexage car les signaux d'hybridation sont plus intenses [2, 3].

Les résultats obtenus quant à l'organi-

sation moléculaire des chromosomes Y humains et murins nous ont conduit à entreprendre le clonage de sondes nucléiques spécifiques de l'ADN de bovin mâle (figure 1). Parmi les diffé-

rents clones obtenus, le clone B.C.1.2 présentait des caractéristiques intéressantes. Cette séquence est entièrement spécifique de l'ADN mâle et correspond à un motif répété environ

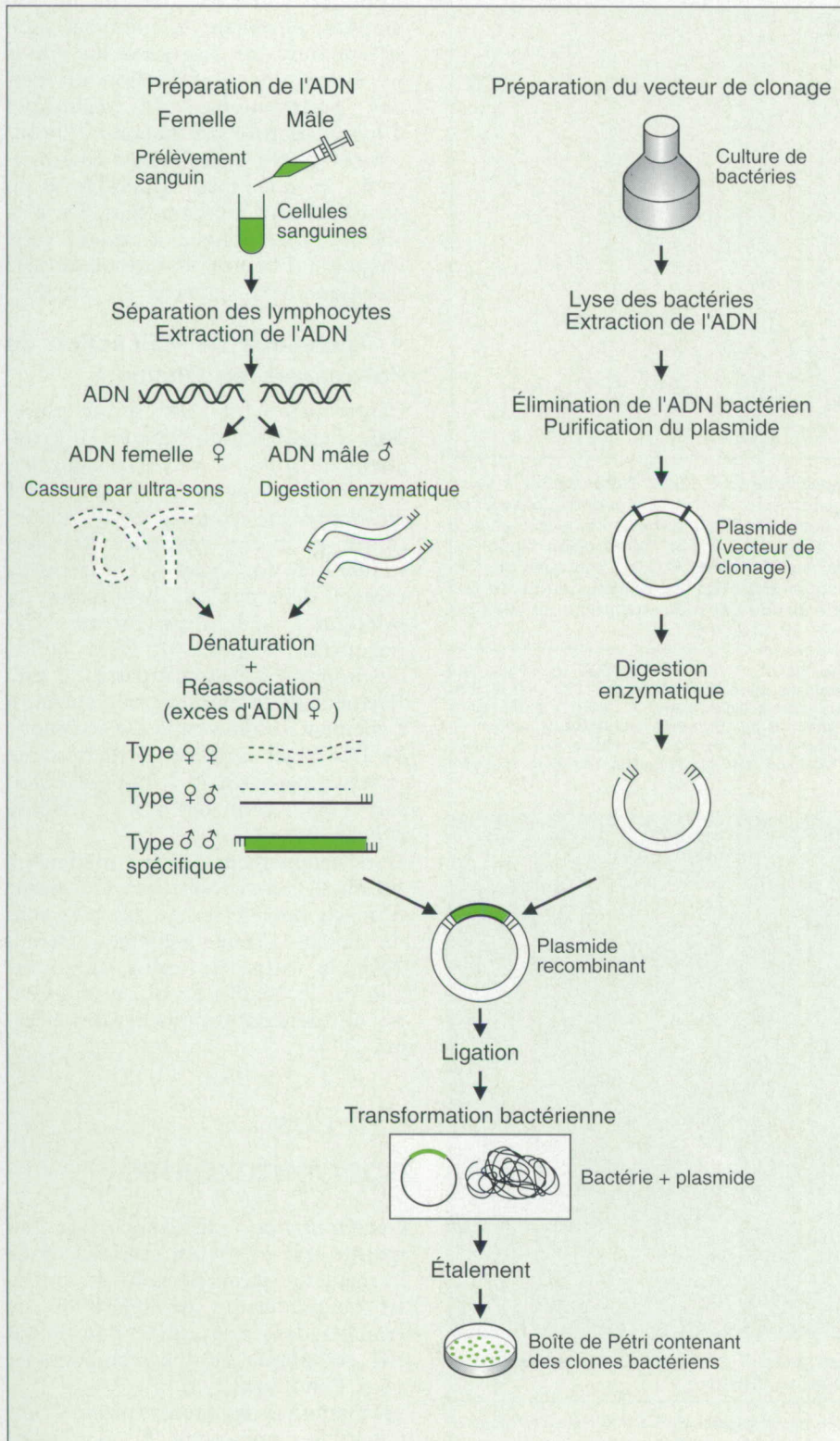
2000 fois [4]. Au point de vue phylogénétique, elle s'hybride spécifiquement avec les individus mâles du genre Bos et Bison mais ne réagit pas avec le génome des autres espèces de ruminants tels que les ovins et les caprins (figure 2, tableau 2). Chez les bovins, trois autres sondes d'ADN spécifique du chromosome Y ont été décrites et sont utilisées par le sexage [5-7]. Il existe également une sonde Y porcine [8].

## Détermination du sexe sur biopsies

### • Technique d'hybridation *in situ*

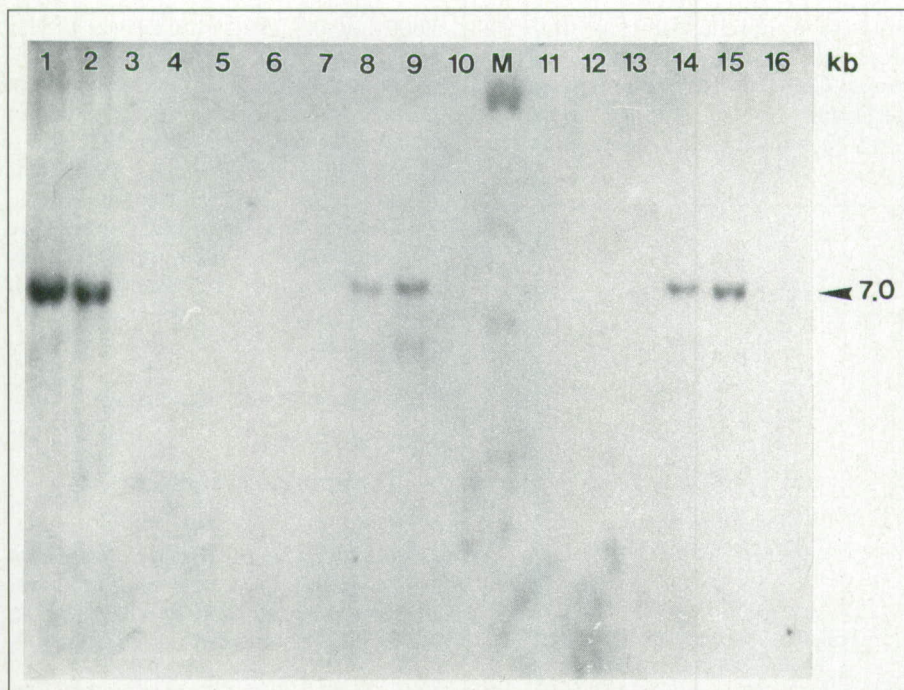
Chronologiquement, cette technique est la première à avoir permis de déterminer le sexe de biopsies embryonnaires à l'aide de sondes moléculaires spécifiques du chromosome Y.

La technique que nous avons développée dérive de celle décrite par J. Burns *et al.* [9]. Il s'agit d'hybridation *in situ* sur noyaux en interphase au moyen de sondes marquées par la biotine, suivie par une série de réactions immunocytochimiques qui ont pour but de révéler la présence de la biotine et d'intensifier le signal. Chez les bovins, cette technique s'effectue sur des biopsies de 10 à 20 cellules prélevées par micro-manipulation sur des embryons âgés de 7 à 8 jours de gestation (photo 2). Le prélèvement est effectué parmi les cellules trophoblastiques dont le rôle



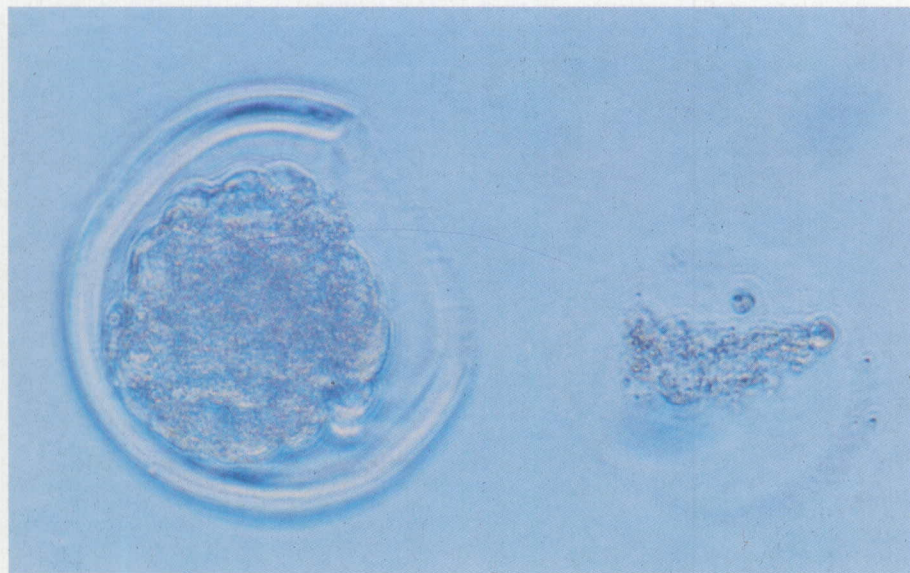
◀ **Figure 1.** Obtention d'une sonde moléculaire d'ADN spécifique du chromosome Y bovin. L'ADN extrait à partir de prélèvements sanguins de bovins mâles et femelles est enrichi en séquences Y spécifiques par élimination des fragments d'ADN génomique communs aux deux sexes. L'ADN enrichi est alors inséré dans un vecteur de clonage. Les plasmides recombinants sont utilisés pour transformer des bactéries. Après étalement sur boîte de gélose et multiplication bactérienne, les colonies contenant un plasmide ayant incorporé un segment de chromosome Y bovin sont recherchées.

**Figure 1.** Production of a molecular probe of DNA specific to the bovine Y chromosome. The DNA extracted from blood samples of male and female cattle is enriched in Y-specific sequences by eliminating the fragments of genomic DNA common to both sexes. The enriched DNA is then inserted into a cloning vector. Recombinant plasmids are used to transform bacteria. Following plating onto an agar dish and bacterial multiplication, a search for colonies containing a plasmid having incorporated a segment of bovine Y chromosome is made.



**Figure 2.** Conservation de la séquence bovine Y spécifique (B.C.1.2) à l'intérieur de la sous-famille des *Bovinae*. Dix microgrammes d'ADN génomique digéré par l'endonucléase *EcoR* I sont déposés par ligne. L'ADN de *Bos taurus* (lignes 1 à 4), *Bubalus bubalis* (lignes 5 à 7), *Bos indicus* (lignes 8 à 10), *Bubalus caffer* (lignes 11 à 13), *Bison bison* (ligne 14) et *Bison bonassus* (lignes 15 à 16) a été hybridé avec la sonde B.C.1.2 marquée au  $^{32}\text{P}$ . Une bande de 7,0 kilobases (Kb) est observée uniquement avec les individus du genre *Bos* (lignes 1, 2, 8, 9) et *Bison* (lignes 11, 12). Cette bande est mâle spécifique et toujours absente des échantillons femelles (lignes 3, 4, 7, 10, 13, 16).

**Figure 2.** Conservation of the bovine Y-specific sequence (B.C.1.2) within the *Bovinae* sub-family. Ten micrograms of genomic DNA digested by *EcoR* I endonuclease are deposited per line. The DNA of *Bos taurus* (lines 1 to 4), *Bubalus bubalis* (lines 5 to 7), *Bos indicus* (lines 8 to 10), *Bubalus caffer* (lines 11 to 13), *Bison bison* (line 14), and *Bison bonassus* (lines 15 to 16), were hybridised with the  $^{32}\text{P}$ -labelled B.C.1.2 probe. A 7.0 kilobase (Kb) band was observed only on those animals of the *Bos* (lines 1, 2, 8 and 9) and *Bison* (lines 11 and 12) genera. This band was male-specific and always absent from female samples (lines 3, 4, 7, 10, 13 and 16).



**Photo 2.** Embryon bovin de 7,5 jours de gestation après microdissection d'une biopsie trophoblastique d'environ 15 cellules. (Cliché P. Chesné, INRA)

**Photo 2.** Bovine embryo of 7.5 days gestation following micro-dissection of a trophoblastic biopsy of approx. 15 cells.

n'est pas vital pour l'embryon. Le diagnostic s'effectue par observation au microscope, les cellules mâles présentant après hybridation une coloration spécifique absente de cellules femelles (*photo 3*).

Appliqué à une série de plus de 500 biopsies provenant d'embryons non sélectionnés, un diagnostic du sexe a pu être établi pour environ un tiers des prélèvements. La technique d'hybridation *in situ* présente l'inconvénient d'être difficilement automatisable, et donc peu applicable à un grand nombre d'échantillons. De plus elle est assez longue à réaliser (une vingtaine d'heures) et surtout difficile techniquement à mettre en œuvre.

### • Technique de « Réaction de Polymérase en Chaîne »

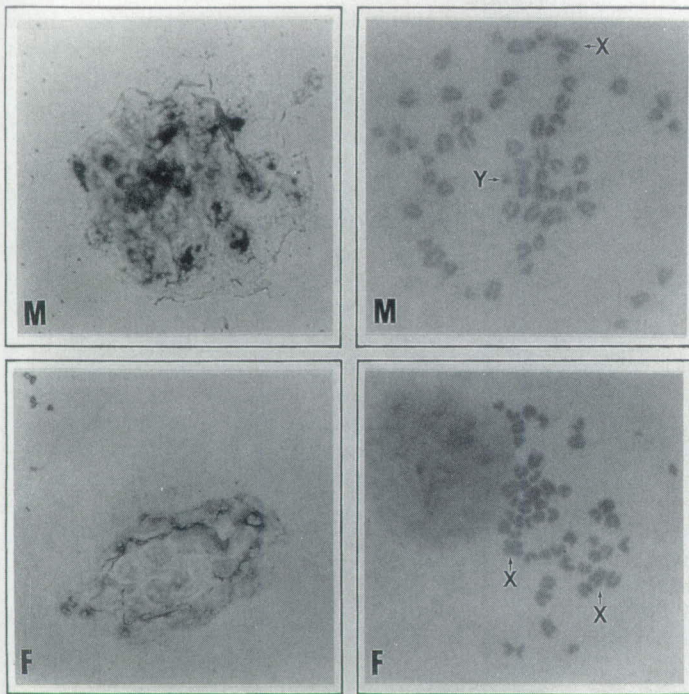
L'introduction en 1985 d'une procédure d'amplification génique [10] relativement simple a ouvert de nouvelles perspectives pour le sexage des embryons. Une séquence d'ADN déterminée peut être amplifiée plusieurs millions de fois grâce à une série de cycles : dénaturation, hybridation et extension à l'aide d'une enzyme ADN polymérase (*figure 3*). Très rapide (environ 3 à 4 heures à partir du prélèvement de la biopsie embryonnaire), facilement automatisable, la technique de PCR nous a permis de déterminer le sexe à partir de 20 à 50 pg d'ADN, soit l'équivalent de 3 à 6 cellules (*photo 4*).

Le développement de cette méthode a permis sa commercialisation sous forme d'un kit pour le sexage des embryons de bovins (Rhône-Mérieux). Depuis 1990, le sexage est réalisé sur le terrain par l'UNCEIA au niveau des Centres d'Insémination proches des éleveurs [11].

### Tri des spermatozoïdes

L'insémination artificielle avec du sperme sexé et trié est sans nul doute la meilleure façon de pouvoir contrôler la production de mâles ou de femelles dans une espèce donnée car elle est simple et non traumatisante pour l'embryon.

La séparation des spermatozoïdes contenant le chromosome X ou Y n'est



**Photo 3.** Hybridation *in situ* sur biopsies embryonnaires. Les biopsies embryonnaires de 10 – 20 cellules ont été déposées sur lames et hybridées avec la sonde B.C.1.2 marquée à la biotine. Le signal d'hybridation est ensuite révélé par immunocytochimie. L'observation des lames révèle la présence d'un précipité noir au niveau des noyaux de chaque cellule mâle (M) porteuse du chromosome Y. Le caryotype effectué à partir du reste de l'embryon confirme les résultats d'hybridation *in situ*. Dans le cas d'embryon femelle (F), il y a absence de marquage confirmé par la présence de deux chromosomes X au niveau du caryotype.

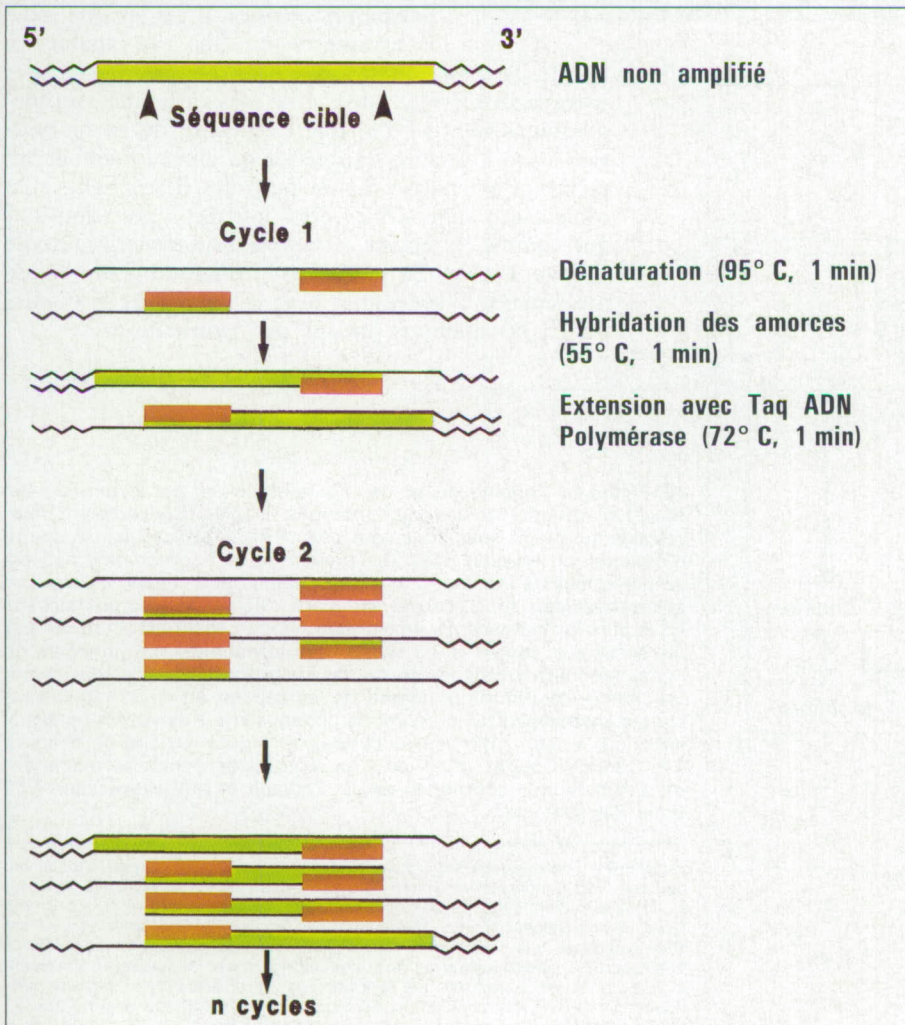
**Photo 3.** *In situ* hybridisation on embryonic biopsies. 10- to 20-cell embryonic biopsies were placed on slides and hybridised with the B.C.1.2. biotin-labelled probe. The hybridisation signal is subsequently shown up by immunocytochemistry. Observation of the slides revealed the presence of a black precipitate on the nucleus of each male cell (M) bearing the Y chromosome. The karyotype performed on the remaining part of the embryo confirmed the results of the *in situ* hybridisation. As concerns the female embryo (F), the lack of labelling was confirmed by the presence of two X chromosomes on the karyotype.

## Tableau 2

### Différence de contenu en ADN entre les spermatozoïdes X et Y

Espèces	Différence X - Y (%)
<i>Capra hircus</i> (chèvre)	3,5
<i>Bos taurus</i> (bovin européen)	3,9
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (lapin)	3,9
<i>Ovis aries</i> (mouton)	4,2

Difference in DNA content between the X and Y spermatozoa

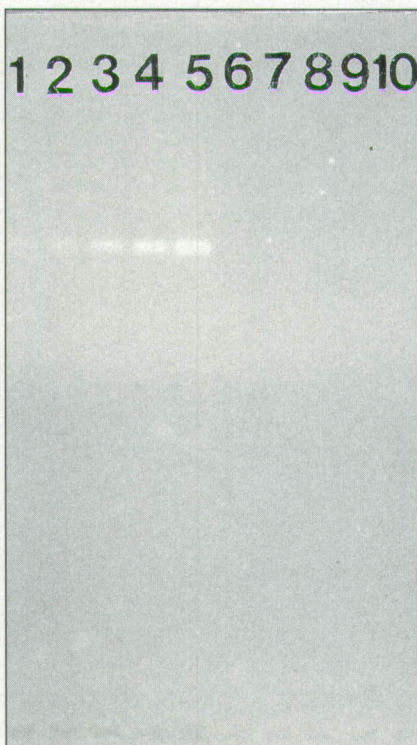


◀ **Figure 3.** Principe du PCR. Une séquence d'ADN cible peut être amplifiée de façon exponentielle ( $2^n$ ) par une succession de cycles comprenant chacun trois étapes : dénaturation par la chaleur des deux brins d'ADN, hybridation d'oligonucléotides d'une vingtaine de bases complémentaires des extrémités de la séquence à amplifier, et recopiage de la matrice d'ADN à partir de ces amorces grâce à l'enzyme thermostable Taq ADN polymérase.

**Figure 3.** PCR strategy. A sequence of target DNA can be amplified exponentially ( $2^n$ ) by a succession of cycles each of three stages : thermal denaturation of the two DNA strands, oligonucleotide hybridization of some twenty complementary bases at the ends of the sequence to be amplified, and recopying of the DNA matrix from these primers by the thermostable Taq DNA polymerase.

**Photo 4.** Résultats de PCR obtenus à partir d'ADN génomique bovin mâle (lignes 1 à 5) et femelle (lignes 6 à 10) ayant subi 30 cycles d'amplification. La séquence amplifiée localisée sur le chromosome Y contient 106 paires de bases. Le résultat de l'amplification est visualisée par électrophorèse dans un gel d'agarose 4 % contenant du bromure d'éthidium. Un dixième de chaque réaction est déposé par ligne. Les quantités d'ADN de départ sont 500 picogrammes (lignes 5 et 10), 250 pg (lignes 4 et 9), 125 pg (lignes 3 et 8), 50 pg (lignes 2 et 7) et 20 pg (lignes 1 et 6). Une bande amplifiée est visible dans l'ADN mâle à partir de 20 pg (équivalent de 2 à 4 cellules).

**Photo 4.** PCR results obtained from male (lines 1 to 5) and female (lines 6 to 10) bovine genomic DNA after 30 amplification cycles. The amplified sequence located on the Y chromosome contained 106 base pairs. The result of the amplification was visualised by electrophoresis in 4 % agarose gel containing ethidium bromide. One tenth of each reaction was deposited per line. The starting DNA quantities were 500 picogrammes (lines 5 and 10), 250 pg (lines 4 and 9), 125 pg (lines 3 and 8), 50 pg (lines 2 and 7), and 20 pg (lines 1 and 6). An amplified band is visible in the male DNA as from 20 pg (equivalent to 2 to 4 cells).



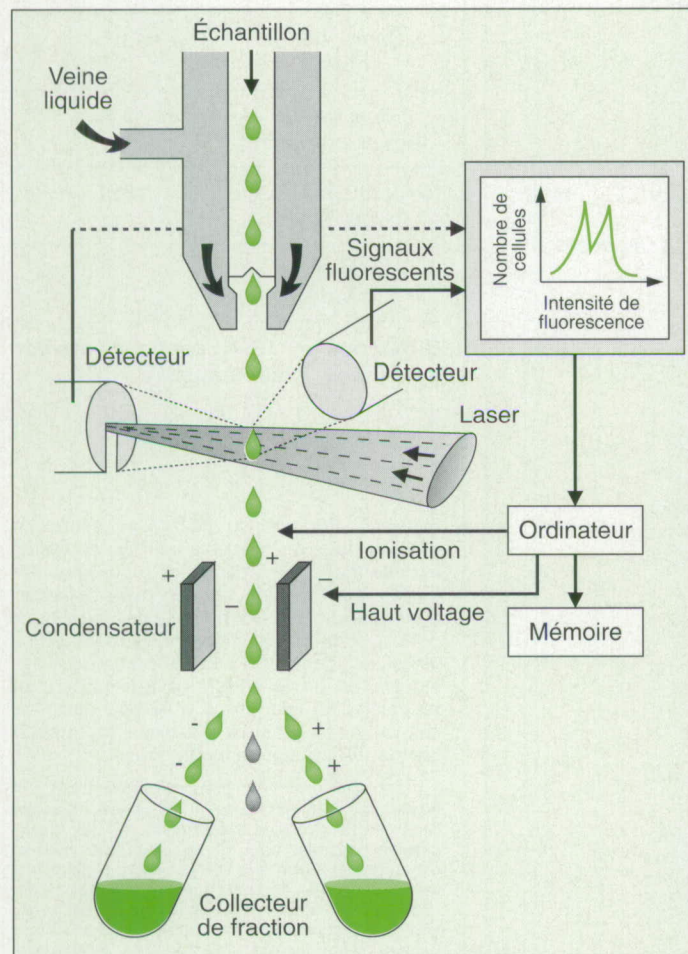
envisageable que s'il existe des différences physicochimiques ou biologiques entre ces deux types de cellules.

Les différences basées sur l'expression sélective de gènes portés par le chromosome Y (antigène H-Y, glycoprotéines de surface) restent non fiables. De plus, la plupart des techniques utilisées pour mesurer les différences de masse ou de densité supposées exister entre les spermatozoïdes X et Y (gradient de sérum albumine bovine, gradient de Percoll, colonne de Sephadex) se sont révélées inefficaces par manque de sensibilité.

A ce jour, seule la différence de contenu en ADN entre les spermatozoïdes X ou Y due au dimorphisme des chromosomes sexuels a été clairement mise en évidence chez la plupart des mammifères.

D'une littérature très abondante et souvent controversée à cause du nombre très limité d'échantillons analysés, de la multiplicité des espèces et des techniques choisies, il ressort que seule la cytométrie en flux est capable de

fournir des résultats satisfaisants en matière de tri des spermatozoïdes [12, 13]. Une des difficultés supplémentaires tient au fait que l'efficacité du tri ne pouvait jusqu'à présent s'apprécier qu'après insémination, gestation et analyse du sex-ratio des descendants. On conçoit que dans des espèces unipares à gestation longue comme les bovins cette approche est très coûteuse et inapplicable. En revanche, l'utilisation d'une sonde moléculaire Y spécifique permet de vérifier la qualité du tri en quelques heures par hybridation.



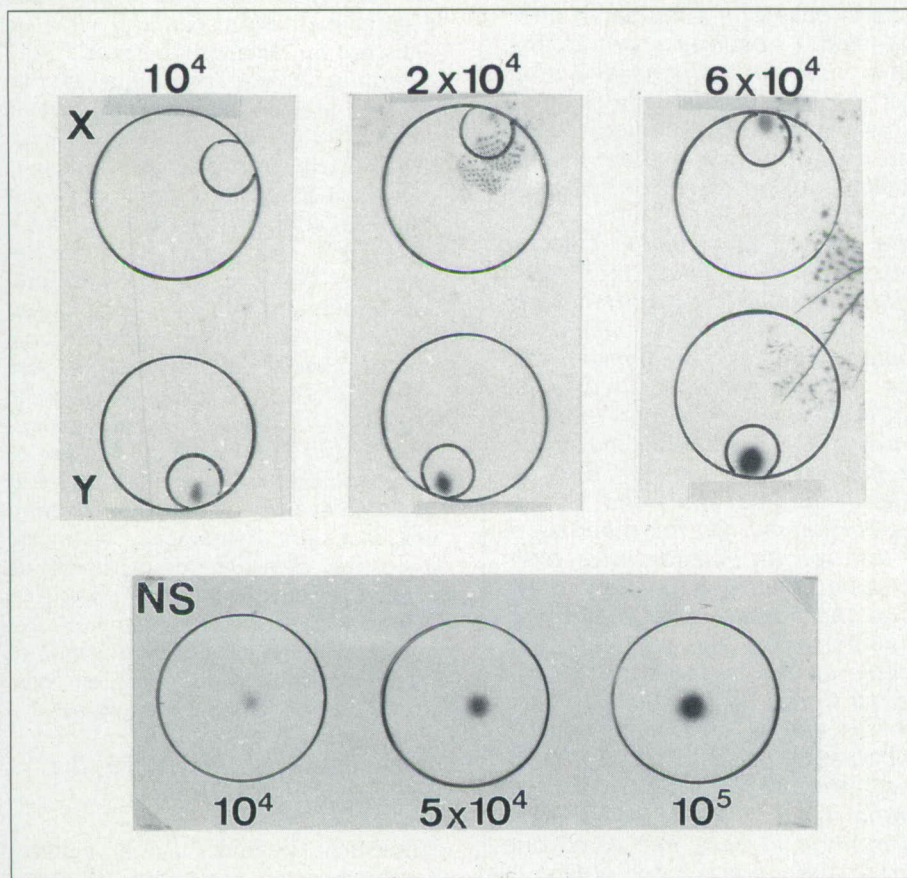
◀ **Figure 4.** Principe du tri des spermatozoïdes par cytométrie en flux. Les spermatozoïdes sont marqués à l'aide d'un colorant fluorescent qui réagit spécifiquement avec l'ADN des cellules (bromure d'éthidium ou Hœchst 33342). La quantité de fluorochrome fixé est proportionnelle à la quantité d'ADN contenu dans chaque cellule. Les spermatozoïdes sont ensuite soumis à l'éclairement d'un faisceau laser puis la fluorescence émise par chaque cellule est analysée par un détecteur couplé à un système informatique. En fonction de l'intensité de fluorescence émise, les spermatozoïdes sont déviés par un champ électrique qui permet de les séparer en deux populations car les spermatozoïdes porteurs du chromosome X émettent un signal supérieur à celui émis par les cellules Y. (figure extraite du chapitre 12, Corinne Cotinot, *et al.* de « La reproduction chez les mammifères et l'homme » coordonné par C. Thibault et M.C. Levasseur, Éditions Ellipses)

**Figure 4.** Spermatozoa separation by flow cytometry. The spermatozoa are labelled with a fluorescent colouring-agent which reacts specifically to cellular DNA (ethidium bromide or Hoechst 33342). The quantity of fluorochrome fixed is proportional to the DNA content in each cell. The spermatozoa are then subjected to a laser beam and the fluorescence emitted by each cell is analysed by a sensor hooked up to a computer system. According to the intensity of fluorescence emitted, the spermatozoa are diverted by a magnetic field enabling the two populations to be separated, since those bearing the X-chromosome emit a greater signal than those of the Y-.

Chez les bovins, la différence de taille entre les chromosomes X et Y se traduit au niveau de l'ADN par une différence du contenu global d'environ 4 %. Le tableau 2 donne quelques exemples pour d'autres espèces. La cytométrie en flux permet d'apprécier cette différence et de séparer les spermatozoïdes en deux populations (figure 4). Afin de tester l'enrichissement de chacune des fractions collectées, nous avons développé une méthode d'hybridation utilisant des sondes spécifiques du chromosome Y ou X bovin (figure 5). Après décon-

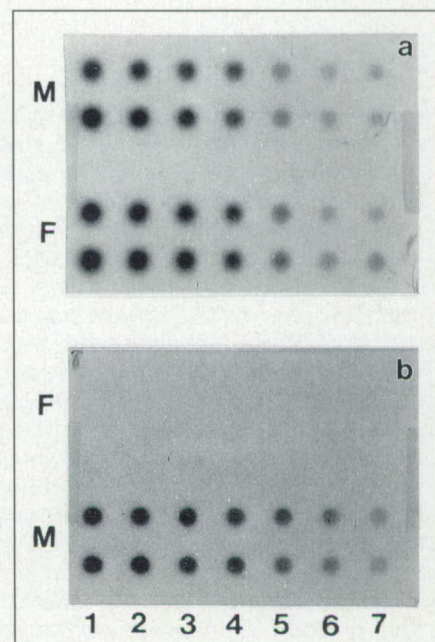
densation des spermatozoïdes, marquage de l'ADN avec le bromure d'éthidium puis tri par cytométrie, le pourcentage d'enrichissement obtenu est de l'ordre de 80 % (figure 6). A partir de spermatozoïdes non décondensés dont l'ADN est marqué par le colorant vital Hœchst 33342, le tri par cytométrie de flux nous a permis d'obtenir un enrichissement de 70 % [14]. Ces résultats sur spermatozoïdes vivants sont encourageants mais non totalement satisfaisants. Chez le lapin, Johnson *et al.* [15] ont partiellement résolu le double problème d'obtenir à

la fois des spermatozoïdes correctement triés et encore féconds. Pour ce faire les spermatozoïdes triés sont déposés chirurgicalement au niveau des cornes utérines chez les femelles. De cette manière le pourcentage de descendants femelles obtenus est de 94 % (n = 16) et 81 % (n = 21) pour les mâles.



▲ **Figure 6.** Contrôle du tri des spermatozoïdes par hybridation moléculaire. Les spermatozoïdes marqués par le bromure d'éthidium sont séparés en deux populations par cytométrie en flux en fonction de la fluorescence émise. Un aliquot ( $10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ) de chacune des populations est déposé sur une membrane de nitrocellulose. Après dénaturation et fixation de l'ADN sur la membrane, l'hybridation est réalisée avec une sonde spécifique du chromosome Y bovin (B.C.1.2) marquée au  $^{32}\text{P}$ . La comparaison des autoradiogrammes entre les populations triées (X et Y) et non triées (NS) révèle un taux d'enrichissement d'environ 80 %.

**Figure 6.** Verification of spermatozoa separation by molecular hybridization. The ethidium-bromide-labelled spermatozoa were separated into two populations by flow cytometry according to the fluorescence emitted. An aliquot ( $10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ) of each population was deposited on a nitrocellulose membrane. After denaturing and fixing the DNA onto the membrane, the hybridization was performed with a  $^{32}\text{P}$ -labelled probe specific to bovine Y chromosome (B.C.1.2). Comparison of the separated (X and Y) and non-separated (NS) population' autoradiograms demonstrated an enrichment rate of about 80 %.



▲ **Figure 5.** Étude de la spécificité et de la sensibilité des sondes moléculaires spécifiques des chromosomes X et Y.  
a - Sonde spécifique du chromosome X (gène DMD humain - Cell 1987 ; 50 : 509-17). Dot blots contenant de l'ADN génomique bovin mâle (M) et femelle (F) à différentes concentrations (1 = 100 ng ; 2 = 75 ng ; 3 = 50 ng ; 4 = 25 ng ; 5 = 10 ng ; 6 = 7,5 ng ; 7 = 5 ng). Après hybridation avec la sonde marquée au  $^{32}\text{P}$ , un signal est visible à partir de 5 ng d'ADN (environ 1 000 cellules).  
b - Sonde spécifique du chromosome Y (séquence répétée du chromosome Y bovin - Genomics 1991 ; 10 : 646-53). L'hybridation du même dot blot avec la sonde B.C.1.2 révèle un signal positif uniquement avec l'ADN mâle à partir de 5 ng. Aucun signal n'est visible avec l'ADN femelle.

**Figure 5.** Specificity and sensitivity of the molecular probes specific to the X and Y chromosome.  
a) Probe specific to the X chromosome (human DMD gene ; Cell 1987 ; 50 : 509-17). Dot blots containing male (M) and female (F) bovine genomic DNA at different concentrations (1 = 100 ng ; 2 = 75 ng ; 3 = 50 ng ; 4 = 25 ng ; 5 = 10 ng ; 6 = 7.5 ng ; 7 = 5 ng). Following hybridization with the  $^{32}\text{P}$ -labelled probe, a signal became visible as from 5 ng DNA (approx. 1000 cells).  
b) Probe specific to the Y chromosome (repeated sequence of bovine Y chromosome ; Genomics 1991 ; 10 : 646-53). Hybridization of the same dot blot with the B.C.1.2. probe only gave a positive signal with male DNA as from 5 ng. No signal was visible with female DNA.

## Summary

### Choice of sex : possibilities and limitations in domestic animals

C. Cotinot

*Preselection of the sex of offspring of agriculturally important species has long been an objective of animal breeders. Separation of male and female determining spermatozoa would be the most advantageous approach because, unlike examination of the embryo, it is a non invasive process. Numerous studies have been based on anticipated differences in physical characteristics of X- and Y- bearing spermatozoa, such as differential mass, volume, density, surface charge and motility. To date, none of these approaches has been consistently successful. Only flow cytometric analysis, which measures the relative DNA content of each cell, enables accurate separation of X- and Y- bearing spermatozoa. The remaining difficulty is to preserve the fertilizing ability of the separated spermatozoa.*

*An alternative approach to preselecting the sex of offspring involves sexing embryos. Criteria of importance in embryo sexing techniques are accuracy of the sexing procedure and pregnancy rate after transfer of a selected embryo. However, to be commercially viable, an embryo sexing procedure must be simple and not too expensive. Very few methods meet all the requirements. Cytogenetic analysis was the first method to produce sexed rabbits, calves and sheep. While the accuracy of this method is nearly always 100 %, adapting the procedure to the embryo transfer industry generates difficulties : i.e. the need for high quality metaphase spreads of chromosomes and for trained cytogeneticists. Even then it is time-consuming. On the other hand, this approach can be used to confirm the results of alternative techniques for embryo sexing. The technology of sexing by way of Y-specific probes evolved from studies on the human testis— determining factor (TDF), which is involved in the initial steps of testicular differentiation. The gene for TDF is located on the Y chromosome. The search for the location of the TDF gene led to the isolation of Y-specific DNA probes. Y-specific detection involves biopsy of a small number of cells from the embryo (3 to 5 trophoblastic cells). The very small amount of material required is the most attractive feature of the procedure. In contrast to cytogenetic testing, no metaphase spreads are required and the Y-specific detection method is easy and rapid due to PCR methodology. Farm trials using a detection kit for bovine Y-repeated sequences reveal that 90-95 % of the biopsies can be sexed with an accuracy greater than 90 %. The pregnancy rate after transfer of the biopsied and sexed embryos is around 60 % compared to that of unbiopsied embryos. Concerning possibilities of changing the sex of female embryos by transgenic procedures involving the TDF gene, experiments in mice have already demonstrated the potential feasibility. However, differentiation of a fully-functional testis in an XX offspring has yet to be achieved. Even with experimentation as elegant as this, it is hard to imagine this approach as having practical appeal.*

*Cahiers Agricultures 1992 ; 1 : 325-34.*

Cependant le taux de gestation par femelle est faible (28 % au lieu de 80 %) et la taille des portées est restreinte (3,9 au lieu de 6 à 8).

## Modification du patrimoine génétique par transgénèse

La détermination du sexe correspond à la différenciation des gonades embryonnaires en testicules ou en ovaires. Chez les mammifères, le sexe génétique est défini par la présence ou l'absence du chromosome sexuel Y qui détermine le sexe gonadique duquel découle le sexe phénotypique par la présence d'organes génitaux de type mâle ou femelle. Le contrôle génétique exercé par le chromosome Y est dominant ; en effet les individus XY, XXY ou XXXY sont mâles alors que les individus XO, XX, XXX ont un phénotype féminin. Il existe donc un ou des gène(s) porté(s) par le chromosome Y contrôlant la détermination du sexe mâle. L'étude du chromosome Y a été difficile en l'absence de carte génétique précise. Ceci est lié au fait que ce chromosome est présent à l'état haploïde et que, ne pouvant recombiner avec un homologue, il a été impossible d'utiliser les méthodes de génétique mendélienne classique. D'autre part le chromosome Y des mammifères est un très petit chromosome dont plus de la moitié est constituée d'hétérochromatine (figure 7).

### Génétique moléculaire du chromosome Y

L'isolement de sondes d'ADN dérivant du chromosome Y a permis d'obtenir plus d'une centaine de marqueurs spécifiques de ce chromosome chez l'homme et la souris. Parmi ceux-ci, environ une dizaine correspondent à des gènes ou pseudo-gènes. L'isolement du gène essentiel de la détermination primaire du sexe a été réalisé par la génétique inverse. Un gène dénommé SRY (Sex Region of Y chromosome) présente un certain nombre de caractéristiques qui en font un bon candidat pour être le facteur primaire du déterminisme du sexe : il est conservé dans l'évolution, il est exprimé



au moment de la différenciation des gonades chez plusieurs espèces de mammifères (souris, mouton), il est muté chez la plupart des individus XY femelle et enfin point capital, il est capable de faire reverser le sexe d'une souris femelle dans laquelle ce gène a été injecté au début de son embryogénèse [16, 17].

Le gène SRY est donc capable, chez un individu génétiquement XX, de faire se différencier les gonades en testicules, lesquels par leurs sécrétions de stéroïdes et d'hormone anti-müllérienne entraîneront la différenciation des organes génitaux internes puis externes de type mâle. Cependant ces individus sont stériles car ils sont dépourvus des gènes localisés sur le chromosome Y contrôlant la spermatogénèse. On peut donc envisager à la suite de ces expériences de microinjecter cette séquence d'ADN contenant le gène SRY dans les embryons femelles afin de n'obtenir que des mâles. Cependant, lorsque l'on sait qu'un

bovin transgénique a un prix de revient d'environ 2,5 millions de francs, on comprend qu'aujourd'hui cette approche n'est pas envisageable en ce qui concerne la possibilité de produire à volonté des mâles. Bien que théoriquement réalisable, cette approche de sélection du sexe est actuellement exclue par sa complexité technologique, son faible rendement et son coût exorbitant.

## Conclusion

Les possibilités de choix du sexe se sont développées par l'apport de connaissances fondamentales acquises en biologie moléculaire sur l'organisation du chromosome Y. En effet, c'est grâce à l'obtention des sondes spécifiques de ce chromosome qu'il est maintenant possible de déterminer de façon fiable le sexe des embryons de bovins avant leur transfert.

Des essais en ferme réalisés par

l'UNCEIA, montrent que le pourcentage de biopsies qui peuvent être sexées est maintenant de l'ordre de 95 %, avec un taux de gestation après transfert cervical des embryons biopsés proche de 60 % soit équivalent à celui des embryons non biopsés. L'exactitude du sexage établi par comparaison avec le sexe phénotypique observé sur les veaux-nés est supérieure à 90 % [18].

En matière de tri des spermatozoïdes, il existe toujours une antinomie entre obtenir des spermatozoïdes correctement triés et obtenir des spermatozoïdes ayant conservé leur pouvoir fécondant. Cependant, la possibilité de tester l'efficacité des méthodes de tri sans passer par l'insémination, en faisant appel à l'hybridation avec des sondes moléculaires spécifiques de chacun des chromosomes sexuels, réduit considérablement les coûts et le temps de ces expérimentations. Ceci permet de tester de nombreux paramètres affectant la qualité du tri et surtout de pouvoir quantifier le pourcentage d'enrichissement en chacune des populations X ou Y. A ce jour, cette approche n'est pas encore satisfaisante, d'autant que le nombre de cellules triées par les cytomètres en flux est trop faible pour être applicable en insémination artificielle (vitesse de tri =  $3,5 \times 10^5$  cellules/heure — 1 paillette de sperme pour 1 IA =  $20 \times 10^6$  cellules soit 57 heures de tri par paillette). Cette technique sera dès lors réservée à l'insémination *in utero* ou à la fécondation *in vitro*.

Enfin, dans un avenir plus ou moins lointain, lorsque les rendements seront devenus suffisamment élevés et les coûts abordables, il sera possible de faire naître des animaux mâles en ajoutant au patrimoine génétique des femelles, le gène SRY ■

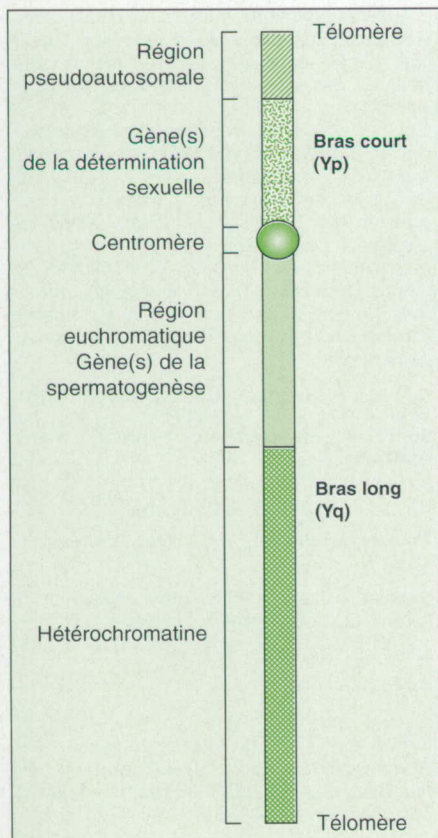


Figure 7. Modèle d'organisation du chromosome Y humain. Sur le bras court proche du télomère se trouve la région d'appariement avec le chromosome X à l'intérieur de laquelle se produit un crossing-over obligatoire. Ce phénomène implique l'existence d'une homologie entre ces régions des chromosomes X et Y. Cette région homologue est appelée pseudoautosomale, car les gènes qui y sont localisés recombinent et se comportent comme des gènes autosomaux. A proximité se trouve la région où est localisé le gène qui gouverne le déterminisme du sexe (gène SRY). Sur le grand bras en partant du centromère, on trouve un ou plusieurs gènes impliqués dans la spermatogénèse. Les 2/3 restants du grand bras sont constitués d'hétérochromatine qui renferme des séquences répétées non codantes.

Figure 7. Model of human Y chromosome organisation. Close to the telomere on the short arm there is a region of pairing with the X chromosome within which obligate crossing-over occurs. This phenomenon implies the existence of homology between these regions on the X and Y chromosomes. This homologous region is called pseudoautosomal because the genes recombine and behave like autosomal genes. Nearby is another region where the gene governing sex-determination (SRY gene) is found. On the long arm, starting from the centromere, there are one or more genes involved in spermatogenesis. The remaining two thirds of the long arm are made up of heterochromatin containing non-coding repeated sequences.

## Références

1. Picard L, King WA, Betteridge KJ. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet Rec* 1985 ; 117 : 603-8.
2. Jones KW, Singh L, Edwards RG. The use of probes for the Y-chromosome in preimplantation embryo cells. *Hum Reprod* 1987 ; 2 : 439-45.
3. West JD, Gosden JR, Angell RR, et al. Sexing whole human pre-embryos by *in situ* hybridization to a Y-chromosome specific DNA probe. *Hum Reprod* 1988 ; 3 : 1010-9.

4. Cotinot C, Kirszenbaum M, Leonard M, Gianquinto L, Vaiman M. Isolation of bovine Y-derived sequence : potential use in embryo sexing. *Genomics* 1991 ; 10 : 646-53.

5. Bondioli KR, Ellis SB, Pryor JH, Williams MW, Harpold MM. The use of male specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 1989 ; 31 : 95-103.

6. Miller JR, Koopman M. Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from the bovine gene. *Anim Genet* 1990 ; 21 : 77-82.

7. Perret J, Chao Shia Y, Fries R, Vassart G, Georges M. A polymorphic satellite sequence maps to the pericentric region of the bovine Y chromosome. *Genomics* 1990 ; 6 : 482-90.

8. McGraw RA, Jacobson RJ, Akamatsu M. A male specific repeated DNA sequence in the domestic pig. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 10389.

9. Burns J, Chan VTW, Jonasson JA, et al. Sensitive system for visualising biotinylated DNA probes hybridised *in situ* : rapid sex determination of intact cells. *J Clin Pathol* 1985 ; 38 : 1085-92.

10. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of  $\alpha$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 ; 230 : 1350-4.

11. Thibier M, Nibart M. Bovine embryo sexing by a DNA probe on the field. *Reprod Dom Anim* 1992 ; 27 : 29-33.

12. Johnson LA, Flook JP, Look MV, Pinkel D. Flow cytometry of X and Y chromosome bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Res* 1987 ; 16 : 1-9.

13. Gledhill BL. Selection and separation of X and Y chromosome bearing mammalian sperm. *Gamete Res* 1988 ; 20 : 377-95.

14. Metzzeau P, Cotinot C, Colas G, et al. Improvement of flow cytometry analysis and sorting of bull spermatozoa by optical monitoring of cell orientation as evaluated by DNA specific probing. *Mol Reprod Dev* 1991 ; 30 : 250-7.

15. Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits : live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 1989 ; 41 : 199-203.

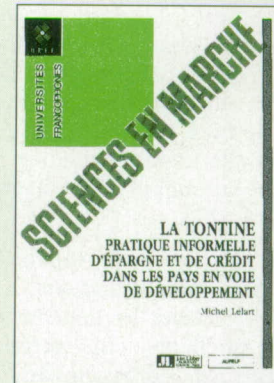
16. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex determining during mouse testis differentiation. *Nature* 1990 ; 348 : 450-2.

17. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature* 1991 ; 351 : 117-21.

18. Nibart M, Kohen G, Esposito L, Baudu P, Thuard JM, Desmettre P, Thibier M. Rapid bovine embryo sexing by DNA probe : field results. *12th International Congress on Animal Reproduction*, August 23 - 27th 1992.

## Résumé

Maîtriser la reproduction pour la rendre plus efficace et contrôler le sex-ratio chez les mammifères domestiques constituent de nouveaux enjeux en matière d'élevage. La détermination du sexe des embryons fait partie des technologies nouvellement introduites qui suscitent par ailleurs chez l'Homme des problèmes éthiques graves. Chez les bovins, où il a été mis au point, le sexage à partir d'un très petit nombre de cellules embryonnaires par amplification de séquences localisées sur le chromosome Y est passé avec succès du laboratoire à la ferme dans un délai de 2 à 3 ans. En ce qui concerne l'intervention avant la fécondation par tri des spermatozoïdes X et Y, le problème n'est pas totalement résolu entre trier correctement et conserver le pouvoir fécondant des spermatozoïdes après tri. Reste la possibilité de modifier le patrimoine génétique des femelles par transgénèse ce qui, jusqu'à présent, est encore du domaine expérimental vu la difficulté technologique, les faibles rendements et les coûts exorbitants chez les gros animaux tels que les bovins.



## LA TONTINE Pratique informelle d'épargne et de crédit dans les pays en voie de développement M. Lelart

La mobilisation de l'épargne dans les pays en voie de développement est devenue un problème lancinant. La plupart de ces pays se sont endettés au-delà de toute mesure et les systèmes bancaires africains sont en pleine décomposition. Cet échec est celui des modèles et des politiques de développement fondés sur les grands projets et sur « l'industrie industrialisante ».

La prise de conscience qui s'impose aujourd'hui confère un intérêt grandissant au secteur informel, notamment à ces pratiques d'épargne et de crédit que sont les tontines. Il y en a dans la plupart des pays en voie de développement, surtout africains, elles sont pratiquées par toute la population, elles sont d'une souplesse extraordinaire et elles drainent des sommes qui sont parfois considérables.

Cet ouvrage décrit le phénomène tontinier : des monographies effectuées au Bénin et auprès de populations chinoises en soulignent la richesse et la diversité. Il mesure ce phénomène au Niger et au Togo. Enfin, il analyse ce phénomène sous quelques-uns de ses aspects micro- et macro-économiques, et amorce une réflexion sur le rôle que pourraient jouer les tontines face aux banques comme sur les raisons d'un attrait qui ne se dément pas.

Co-édition John Libbey Eurotext/AUPELF-UREF  
1990 - 376 pages - 160 FF  
80 FF - prix préférentiel : Afrique, Asie, Amérique du Sud, Haïti.

### BON DE COMMANDE

Veillez m'adresser ( ) exemplaire(s) de .....

Veillez trouver ci-joint mon règlement à l'ordre de John Libbey Eurotext

Nom ..... Prénom .....

Adresse .....

Ville ..... Pays .....

À retourner à : John Libbey Eurotext - 6, rue Blanche - 92120 Montrouge - France.  
Tél. : 47.35.85.52 - Fax : 46.57.10.09