ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année **2005** - Thèse n° 62

L'intersexualité en espèce équine (Equus caballus) : mise au point d'un test de diagnostic moléculaire.

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 27 Juin 2005
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

MATEOS Hervé
Né le 24 Avril 1980
à Epinay Sur Seine

DEPARTEMENTS ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Directeur : Stéphane MARTINOT

Au 1er Janvier 2006

Département	PR EX	PR 1	PR 2	MC	Contractuel, Associé, IPAC et ISPV	AERC	Chargé de consultations et d'enseignement
DEPART SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE							
Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale	Y. RICHARD			V. GUERIN-FAUBLEE 90 % A. KODJO D. GREZEL			
Pathologie infectieuse			A. LACHERETZ M. ARTOIS	J. VIALARD			
Parasitologie & Maladies parasitaires	MC. CHAUVE	G. BOURDOISEAU		MP. CALLAIT CARDINAL L. ZENNER			
Qualité et Sécurité des Aliments		G. CHANTEGRELET	P. DIMONT C. VERNOZY	A. GONTHIER	S. COLARDELLE ISPV		
Législation & Jurisprudence			A. LACHERETZ				
Bio-Mathématiques				P. SABATIER M.L. DELIGNETTE 80 % K. CHALVET-MONFRAY			
DEPART DES ANIMAUX DE COMPAGNIE							
Anatomie		E. CHATELAIN	T. ROGER	S. SAWAYA	R. DA ROCHA CARARO MCC		
Chirurgie et Anesthésiologie		J.P GENEVOIS	D. FAU E. VIGUIER D. REMY		G. CHANOIT MCC S. JUNOT MCC K. PORTIER MCC C. DECOSNE-JUNOT MCC	C. CAROZZO	BENREDOUANE K. N. GAY I. GOUJON
Anatomie-pathologique/Dermatologie-Cancérologie/ Hématologie		J.P. MAGNOL C. FOURNEL	C. FLEURY	T. MARCHAL	D. WATRELOT-VIRIEUX MCC P. BELLI MCA D. PIN MCA		I. BUBLOT C. GALET
Médecine interne		J.L. CADORE		L. CHABANNE F. PONCE	M. HUGONNARD MCC		C. ESCRIOU
Imagerie médicale				E. CAUVIN	J. SONET MCC		F. DURIEUX
DEPART DES PRODUCTIONS ANIMALES							
Zootechnie, Ethologie & Economie rurale		M. FRANCK		P. LETERME		L. MOUNIER	
Nutrition et Alimentation				D. GRANCHER L. ALVES de OLIVEIRA G. EGRON-MORAND			
Biol & Patho de la Reproduction		F. BADINAND	M. RACHAIL-BRETIN	S. BUFF P. GUERIN			
Patho Animaux de Production		P. BEZILLE	T. ALOGNINOUWA	R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND	D. LAURENT MCA		N.GIRAUD P. DEBARNOT D. LAURENT
DEPART SCIENCES BIOLOGIQUES							
Physiologie Thérapeutique	R. BOIVIN			J.J. THIEBAULT J.M. BONNET-GABIN 50 % T. BUROMFOSSE V. LAMBERT			
Biophysique /Biochimie Génétique et Biologie moléculaire		F. GARNIER	E. BENOIT F. GRAIN				
Pharmacie / Toxicologie Législation du Médicament		G. KECK	P. JAUSSAUD P. BERNY				
Langues					C. FARMER IPAC R. SULLIVAN IPAC		
DEPART EQUINE							
Pathologie équine Clinique équine		JL. CADORE O. LEPAGE		A. LEBLOND A. BENAMOU-SMITH			
Expertise nécropsique			C.FLEURY				

A Monsieur le Professeur GUERIN,
De l'Hôpital Edouard Herriot (Lyon),
qui nous a fait l'honneur de juger ce travail et d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Hommages respectueux.

A Madame le Professeur GRAIN,
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,
qui a eu l'amabilité de me confier ce travail, de m'accorder son aide et sa confiance. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

A Madame le Docteur VIALARD,
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,
qui a permis la réalisation de cette étude au sein du Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône et qui nous fait l'honneur de participer au jury de cette thèse. Veuillez recevoir nos sincères remerciements.

A Madame Karine KROUG,
qui m'a encadré sur le plan technique et a su rester disponible pour m'aider dans cette étude. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude.

A mes Parents,
Que j'aime et que j'admire.

***A mon grand frère**,*
En souvenir de tous ces moments de joie passés à tes côtés. Puissions nous en avoir tant d'autres à partager.

A toute ma famille, et en particulier ma nièce Julia.

***A Cécile**,*
Mon cœur et ma joie de vivre. J'espère t'apporter autant si ce n'est plus, que tu as su me donner.

***A Annie et Bernard David**,*
Mes seconds parents, en qui je peux aussi trouver réconfort et conseils dans les moments les plus difficiles. Je ne saurai jamais assez vous remercier.

A mes ami(e)s, pour tous ces merveilleux moments passés ensemble, et aussi pour ceux à venir !
En souvenir de nos débuts en clinique (Elise, Nambio, Caro, Loïc et surtout ma super mère de clinique Agnès F.), en souvenir de nos péripéties de 4ème année (Agnès B., Laurence, Céline, Julie et Nico) ! Hommages à la plus grande équipe de boulets : Juju, Béton, Freek, sans oublier Bertrand! Merci, aussi à Emilie, Brasse et bien entendu Sandrine…

A tous ceux (et Dieu sait combien la liste est longue) qui ont participer à faire ce que je suis et notamment:
- ***Monsieur Chapelle**, enseignant des sciences de la vie et de la terre au lycée Jacques Brel à La Courneuve. Pour sa méthode antipédagogique et néanmoins si enrichissante d'enseigner la biologie!*
- ***Monsieur Imokrane**, enseignant de mathématiques au lycée Jacques Brel à La Courneuve, pour ses leçons de philosophie collectives !*

Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude.

A la sale Mycke et la pov'Nioute…

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures 13
Liste des tableaux 14
Listes des annexes 15
Liste des abréviations 16
Introduction 19

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :
Développement, différenciation et déterminisme du sexe des Mammifères

I. **DEVELOPPEMENT ET DIFFERENCIATION DU SEXE** **25**
A. MISE EN PLACE DES CARACTERES SEXUELS PRIMAIRES 27
1. Formation des gonades *27*
2. Développement des tractus génitaux *29*
3. Développement et différenciation de l'appareil génital externe *30*
4. Migration des gonades *30*
B. MISE EN PLACE DES CARACTÈRES SEXUELS SECONDAIRES 31
1. La puberté *31*
2. Caractères morphologiques et comportementaux *31*

II. **DÉTERMINISME DU SEXE** **33**
A. DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE PRIMAIRE 33
1. Les gènes de la différenciation du sexe *33*
2. La cascade du déterminisme sexuel *40*
B. DÉTERMINISME HORMONAL SECONDAIRE 40
1. La testostérone *40*
2. L'hormone antimüllérienne *41*

Chapitre II :
Anomalies du développement sexuel des équidés

I. **ETUDE CLINIQUE DES ETATS INTERSEXUÉS** **45**
A. L'HYPOGONADISME 45
B. L'HERMAPHRODISME VRAI 46
C. LE PSEUDOHERMAPHRODISME 47
1. Le pseudohermaphrodisme mâle *47*
2. Le pseudohermaphrodisme femelle *48*

II. **ETUDE CYTOLOGIQUE DES ÉTATS INTERSEXUÉS** **50**
A. LES ANEUPLOÏDIES GONOSOMIQUES SIMPLES (UNE SEULE POPULATION CELLULAIRE) 50
B. LES ANEUPLOÏDIES GONOSOMIQUES AVEC PLUSIEURS POPULATIONS CELLULAIRES 52
C. LES EUPLOÏDIES GONOSOMIQUES AVEC PLUSIEURS POPULATIONS CELLULAIRES 54

III. **ETUDE GÉNÉTIQUE DES ÉTATS INTERSEXUÉS** **55**
A. LES RÉVERSIONS DU SEXE XY 55
1. Classification des cas XYSR *55*
2. Réversion du sexe XY avec insensibilité à la testostérone *56*
3. Réversion du sexe XY avec dysgénésie gonadique *57*
B. LES RÉVERSIONS DU SEXE XX 58
1. Expression phénotypique *58*
2. Physiopathologie *58*
3. Etiologie *59*

Chapitre III :
Etude du chromosome Y équin

I. **STRUCTURE DU CHROMOSOME Y** **63**

II. **MISE EN ÉVIDENCE DU CHROMOSOME Y** **65**

A. MISE EN ÉVIDENCE DIRECTE 65

B. MISE EN ÉVIDENCE INDIRECTE 65

1. Détection de l'antigène H-Y. *65*

2. Détection de gènes portés par le chromosome Y. *65*

ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I :
Objectifs de l'étude expérimentale

I. **PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE L'ÉTUDE** **73**

II. **OBJECTIFS ET CONTRAINTES** **73**

A. L'ÉTAPE DE CONCEPTION 73

B. L'ÉTAPE EXPÉRIMENTALE 73

C. L'ÉTAPE DE MISE AU POINT DU TEST DIAGNOSTIQUE 73

Chapitre II :
Matériels et méthodes

I. **MATÉRIEL** **77**

A. MATÉRIEL BIOLOGIQUE 77

B. KITS D'EXTRACTION D'ADN 77

C. LES AMORCES DE PCR 77

1. Conception générale des amorces *77*

2. Présentation des amorces *78*

3. Conservation et préparation des solutions d'amorces *83*

D. CONTRÔLE INTERNE 83

E. AUTRES MATÉRIELS DE PCR ET D'ANALYSE DES RÉSULTATS 83

1. Les réactifs. *83*

2. Le thermocycleur *83*

3. Matériel d'analyse des produits amplifiés *83*

II. **MÉTHODES** **85**

A. EXTRACTION D'ADN 85

1. Kit d'extraction Nucleospin®blood quickpure *85*

2. Kit d'extraction papier Whatman® *85*

B. RÉALISATION DES PCR 85

1. Le milieu réactionnel *85*

2. Programmes d'amplification *86*

3. Analyse des produits amplifiés *86*

C. RESPECT DES BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE 87

1. Définition du plan HACCP *87*

2. Définition du danger *87*

3. Définition des points critiques *87*

4. Plan de prévention des contaminations *88*

5. Contrôle des contaminations *88*

Chapitre III :
Résultats

I. **PCR CIBLANT LE LOCUS AMEL** **95**
1. Rappel des conditions expérimentales *95*
2. Signaux obtenus *95*

II. **PCR CIBLANT LE LOCUS SRY** **95**
1. Rappel des conditions expérimentales *95*
2. Signaux obtenus *95*

III. **PCR CIBLANT LE LOCUS SMC** **97**
A. COUPLE D'AMORCES SMC S1/ SMC AS2 97
1. Rappel des conditions expérimentales *97*
2. Signaux obtenus *97*
B. COUPLE D'AMORCES SMC S1/ SMC XAS4 99
1. Rappel des conditions expérimentales *99*
2. Signaux obtenus *99*
C. COUPLE D'AMORCES SMC S1/ SMC YAS6 101
1. Rappel des conditions expérimentales *101*
2. Signaux obtenus *101*
D. COUPLE D'AMORCES SMC XS3/ SMC AS2 103
1. Rappel des conditions expérimentales *103*
2. Signaux obtenus *103*
E. COUPLE D'AMORCES SMC YS5/ SMC AS2 105
1. Rappel des conditions expérimentales *105*
2. Signaux obtenus *105*
F. COUPLE D'AMORCES SMC S7/ SMC AS2 107
1. Rappel des conditions expérimentales *107*
2. Signaux obtenus *107*
G. COUPLE D'AMORCES SMC S7/ SMC YAS6 107
1. Rappel des conditions expérimentales *107*
2. Signaux obtenus *107*
H. COUPLE D'AMORCES SMC S9/ SMC AS2 109
1. Rappel des conditions expérimentales *109*
2. Signaux obtenus *109*
I. COUPLE D'AMORCES SMC S9/ SMC YAS6 110
1. Rappel des conditions expérimentales *110*
2. Signaux obtenus *110*
J. PCR AVEC 3 AMORCES SMC S9/ SMC YAS6/SMC AS2 111
1. Rappel des conditions expérimentales *111*
2. Signaux obtenus *111*
K. PCR AVEC LES 3 AMORCES SMC XS3/ SMC YS5/ SMC AS2 114
1. Rappel des conditions expérimentales *114*
2. Signaux obtenus *114*
3. Qualité des résultats *115*
L. PCR AVEC LES 3 AMORCES SMC S9 / SMC YS5/ SMC AS2 118
1. Rappel des conditions expérimentales *118*
2. Signaux obtenus *118*
3. Qualité des résultats *119*

Chapitre IV :
Discussion

I. **MATÉRIEL BIOLOGIQUE** **123**

II. **MÉTHODE** **123**
A. KITS D'EXTRACTION D'ADN 123
1. Quantité d'ADN extrait *123*
2. Méthode d'extraction *123*
B. AMPLIFICATION PAR PCR ET ÉLECTROPHORÈSE 127
1. Variation de la stringence *127*
2. Nombre de cycles d'amplification *129*
3. Séparation des produits amplifiés par électrophorèse *129*
C. NUMÉRISATION ET TRAITEMENT DES RÉSULTATS PHOTOGRAPHIQUES 129

III. **RÉSULTATS** **130**
A. RÉPÉTABILITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ 130
1. Répétabilité *130*
2. Reproductibilité *130*
B. SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ 130
1. Amorces Amel s1 et Amel as2 ..... *130*
2. Amorces SRY s1 et SRY as2 ..... *131*
3. Amorces SMC *131*
C. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS 136

IV. **PROPOSITION D'UN TEST DIAGNOSTIQUE** **137**
A. DÉTERMINATION DES RÉACTIONS DE PCR 137
1. Rôle des couples d'amorces *137*
2. Evaluation des PCR avec trois amorces SMC *137*
3. Conditions optimales de réaction *142*
B. CONCEPTION DU TEST 144
1. Les étapes du test *144*
2. Outils de contrôle et témoins de réaction *145*
3. Présentation des résultats du test *147*
C. INTERPRÉTATION DU TEST 149
1. Possibilités d'interprétation *149*
2. Interprétation en comparaison des autres examens complémentaires *151*

V. **INTÉRÊT DU TEST PCR DANS LE CADRE DE L'INTERSEXUALITÉ EQUINE** **152**
A. EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE 152
1. Diagnostic individuel d'intersexualité *152*
2. Etude de l'intersexualité au sein d'une population *152*
B. EN RECHERCHE FONDAMENTALE 152
1. Compréhension du mécanisme de réversion du sexe. *152*
2. Compréhension des phénomènes de remaniement du chromosome Y équin *153*
C. PERSPECTIVES 153

Conclusion 155
Annexes 157
Bibliographis 181

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma en coupe transversale d'embryon de souris. *28*

Figure 2 : Schéma chronologique de la différenciation sexuelle mâle. *28*

Figure 3: Schéma de la structure du gène SRY *34*

Figure 4 : Conformation spatiale de la protéine SRY *34*

Figure 5 : Hypothèse de régulation du développement sexuel mâle à partir de gènes portés par le locus DSS du chromosome X *36*

Figure 6 : Schéma des interactions entre les gènes SRY, Dax-1, WT-1, SF-1 et AMH *38*

Figure 7 : Modèle de régulation de l'expression des gènes SRY et Sox9 ..... *38*

Figure 8 : Cartographie physique du chromosome Y de différentes espèces de Mammifère dont le cheval. *64*

Figure 9 : Résultats théoriques de la PCR avec le logiciel Amplify® : *79*

Figure 10 : Résultats théoriques de la PCR avec le logiciel Amplify® : *81*

Figure 11 : Résultats des PCR Amel s1/Amel as2 et SRY s1/SRY as2. ..... *94*

Figure 12 : Résultats des PCR SMC s1/SMC as2. ..... *96*

Figure 13 : Résultats des PCR SMC s1/SMC Xas4. ..... *98*

Figure 14 : Résultats des PCR SMC s1/SMC Yas6. ..... *100*

Figure 15 : Résultats des PCR SMC Xs3/SMC as2. ..... *102*

Figure 16 : Résultats des PCR SMC Ys5 / SMC as2. ..... *104*

Figure 17 : Résultats des PCR SMC s7/ SMC as2 et SMC s7 / SMC Yas6. ..... *106*

Figure 18 : Résultats des PCR SMC s9 / SMC as2. ..... *108*

Figure 19 : Résultats des PCR SMC Xs3 / SMC Ys5 / SMC as2 à la température de 59 et 60°C. *112*

Figure 20 : Résultats des PCR SMC Xs3 / SMC Ys5 / SMC as2 à la température de 58°C. *113*

Figure 21 : Résultats des PCR SMC s9/ SMC Ys5 / SMC as2 à la température de 60°C. *116*

Figure 22 : Résultats des PCR SMC s9 / SMC Ys5 / SMC as2 à la température de 59 et 58°C. *117*

Figure 23 : Comparaison des résultats des PCR Amel s1/ Amel as2 avec extraction Nucleospin® et Whatman®. *124*

Figure 24 : Comparaison des résultats des PCR SRY s1/ SRY as2 avec extraction Nucleospin® et Whatman®. *126*

Figure 25 : Positionnement de SMC Xas4, SMC Yas6 et SMC as2 par rapport à SMC s1. ..... *132*

Figure 26 : Positionnement de SMC Xs3, SMC Ys5 et SMC as2 par rapport à SMC as2. ..... *133*

Figure 27 : Comparaison des résultats obtenus entre les PCR SMC Xs3/SMCYs5/SMCas2, SMCXs3/SMCas2 et SMCYs5/SMCas2 ..... *138*

Figure 28 : Schéma des résultats du test obtenus chez un mâle XY. *147*

Figure 29 : Schéma des résultats du test obtenus chez une femelle XX. *148*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Aneuploïdies gonosomiques simples.....51
Tableau 2 : Aneuploïdies gonosomiques avec plusieurs lignées cellulaires et motif de base XO 52
Tableau 3 : Aneuploïdies gonosomiques avec plusieurs lignées cellulaires et motif de base XXY.....53
Tableau 4 : Aneuploïdies gonosomiques rencontrés dans les cas de chimérisme. 54
Tableau 5: Euploïdies gonosomiques avec myxoploïdie.....54
Tableau 6 : Cas de réversion du sexe XY décrits dans la littérature. 56
Tableau 7 : Amorces publiées pour amplifier une partie de la séquence du gène SRY ….....78
Tableau 8 : Amorces utilisées pour amplifier une partie de la séquence du gène SRY.....79
Tableau 9 : Amorces publiées pour amplifier une partie de la séquence du gène Amel.....80
Tableau 10 : Amorces utilisées pour amplifier une partie de la séquence du gène Amel. 80
Tableau 11 : Tailles des fragments amplifiés du gène SMC obtenus avec les différents couples d'amorces..82
Tableau 12 : Récapitulatif des conditions expérimentales testées pour chaque PCR.....90
Tableau 13 : Tableau récapitulatif de la taille des fragments attendus pour les différentes PCR.....91
Tableau 14 : Détermination des températures d'hybridation optimales. 128
Tableau 15 : Présentation des amorces fonctionnelles selon leur spécificité chromosomique.....136
Tableau 16 : Fonction des différents couples d'amorces utilisables. 137
Tableau 17 : Conditions optimales des PCR 143
Tableau 18 : Fragments obtenus pour chaque PCR. 144
Tableau 19 : Interprétations du test diagnostique. 150

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Hermaphrodites vrais équins recensés dans la littérature. *159*
Annexe 2 : Pseudo-Hermaphrodites mâles équins (avec apparence générale de mâle): *160*
Annexe 3 : Pseudo-Hermaphrodites mâles équins (avec apparence générale de femelle) *161*
Annexe 4 : Pseudo-Hermaphrodites mâles équins (avec apparence générale de femelle) suite. *162*
Annexe 5 : Pseudo-Hermaphrodites femelles équins. *163*
Annexe 6 : Pseudo-Hermaphrodites femelles equins (suite). *164*
Annexe 7 : Protocole d'extraction du kit NucleoSpin® Blood QuickPure. *165*
Annexe 8 : Protocole d'extraction avec le papier Whatman. *166*
Annexe 9 : Références des réactifs *167*
Annexe 10 : Composition du milieu réactionnel. *168*
Annexe 11 : Séquence du gène SRY équin *169*
Annexe 12 : Séquence du gène AmelY équin *170*
Annexe 13 : Séquence du gène AmelX équin. *171*
Annexe 14 : Séquence du gène SMCY équin *172*
Annexe 15 : Séquence du gène SMCX équin. *173*
Annexe 16 : Alignement des séquences SMCX et SMCY (logiciel Mc Vector®). *174*

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyrobonucléique

AHC : Adrenal hypoplasia congenital

AmelX : locus X du gène codant pour l'amélogénine.

AmelY : locus Y du gène codant pour l'amélogénine

AMH : Hormone anti-müllérienne.

Dax : DSS-AHC critical region on the X.

DDX3Y : DeaD Box polypeptide 3 Y-linked

DHT : DiHydroTestostérone

dNTP : désoxy N TriPhosphate où N=A (Adénosine), N= G (Guanine), N=T(Thymidine), N=C (Cytosine).

DSS : Dosage Sensitive Sex-reversal.

EDTA : Ethylene Dinitro Tetracetic Acid

Gata-4 : Gaba transporter transcription factor 4.

hCG : human Chorionic Gonadotrophine.

HMG : High Mobility Group.

JARID1D : Jumonji AT-rich interactive domaine 1D

LH : Luteinizing hormone

Mb : mégabase (10^9 paires de base)

pb : paire de base.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

SF-1 : Steroidogenic Factor 1.

SMCX : Small Mouse cDNA on the X chromosome.

SMCY : Small Mouse cDNA on the Y chromosome.

Sox : SRY-related HMGbox.

SRY : Sex determining Region of the Y chromosome

TSPY : Testis Specific Protein Y encoded

UTY : Ubiquitously transcribed Tetratricopeptide repeat gene on the Y chromosome

USP9Y : Ubiquitin Specific Protease 9 gene on the Y.

Wnt : Winglesstype MMTV integration site family.

WT-1 : Wilm's Tumor 1.

Introduction

L'intersexualité résulte d'une anomalie du développement sexuel correspondant à la présence conjointe au sein d'un même animal de caractéristiques phénotypiques mâles et femelles. Différentes formes ont été définies, en fonction de la nature des gonades. C'est ainsi que l'on distingue, les hermaphrodites vrais qui possédent à la fois un tissu testiculaire et ovarien, des pseudohermaphrodites qui ne possèdent qu'un seul type de gonade. Parmi ceux-ci, on discerne les pseudohermaphrodites mâles et femelles, suivant que leurs gonades correspondent respectivement à des testicules ou des ovaires.

Ces anomalies du développement ont été décrites chez plusieurs espèces de Mammifères, parmi lesquelles l'espèce equus caballus. L'intersexualité équine a fait l'objet de publications dès les années 1960 et le nombre de cas décrits a augmenté grâce aux progrès technologiques réalisés. La prévalence des aberrations chromosomiques responsables de troubles de la reproduction atteindrait 3% des juments en clientèle courante. Mais bon nombre de chevaux intersexués ne présentent pas d'anomalies morphologiques ni anatomiques suffisamment perceptibles pour le propriétaire ou le vétérinaire praticien, ce qui explique que la réalisation du caryotype comme examen complémentaire lors de troubles de la fertilité chez les chevaux reste peu fréquente.

L'analyse cytogénétique a permis d'identifier et d'étudier plusieurs cas. Les chevaux intersexués présentent soit :

- *une seule population cellulaire avec un nombre de chromosomes sexuels anormal ;*
- *un mélange de plusieurs populations cellulaires de constitution chromosomique différente (associée parfois à un nombre anormal de chromosomes sexuels) ;*
- *une inversion du sexe par rapport à celui fourni par les gonosomes.*

Parmi ces anomalies, viennent en tête de liste les monosomies X et les réversions du sexe XY. Les causes de l'intersexualité équine seraient donc aussi bien d'ordre chromosomique (perte ou addition d'un ou plusieurs chromosomes sexuels) que d'ordre génétique. Dans ce dernier cas les gènes impliqués vont favoriser une différenciation sexuelle contraire à ce qu'elle devrait être ; c'est plus particulièrement le cas du gène SRY (Sex determining Region of the Y chromosome), initiateur de la détermination sexuelle mâle.

Ainsi, les récentes études des cas de réversions du sexe XX et XY font appel à la PCR (Polymerase Chain Reaction) pour identifier la présence du gène SRY, mais seulement après détection d'anomalies du caryotype.

Bien qu'étant complémentaires, la PCR est une technique plus sensible et plus simple d'emploi que ne l'est la réalisation du caryotype. Elle pourrait être utilisée pour dépister la présence du chromosome Y et de gènes impliqués dans la différenciation sexuelle mâle, entre autres le gène SRY, permettant ainsi l'étude d'un plus grand nombre de cas.

Nous avons ainsi été amené à proposer un test diagnostique permettant de détecter la présence du gène SRY et du chromosome Y. Associée à la PCR SRY, la présence du chromosome Y peut être attestée par la mise en évidence de deux autres séquences spécifiques de ce gonosome mais éloignées du gène SRY. L'interprétation n'est en effet possible que si au moins un de ces gènes n'est pas affecté par les

translocations de la région contenant SRY. Les deux gènes candidats choisis sont AmelY (locus Y du gène codant pour l'amélogénine) et SMCY (Small Mouse cDNA on the Y chromosome) dont les séquences équines ont été publiées.

La réalisation de ces trois PCR permettrait donc non seulement de détecter les animaux avec présence du chromosome Y et d'un phénotype femelle, mais aussi d'identifier les cas d'anomalies génétiques avec réversion du sexe XY déficients en SRY, et les réversions du sexe XX ayant subi une translocation de SRY sur un autosome ou sur l'un des chromosomes X.

La première partie de ce travail est constituée d'un rappel des étapes du développement, de la différenciation et de la détermination du sexe des Mammifères. Après une présentation clinique des cas d'intersexualité équine rapportés dans la littérature, une étude rétrospective des anomalies chromosomiques et génétiques de ces cas a été réalisée. Enfin, sont exposées plus brièvement, une étude du chromosome Y équin et une présentation des outils d'investigation jusqu'à présent utilisés.

La seconde partie de ce travail comporte l'ensemble des étapes expérimentales de mise au point d'un test diagnostique basé sur la PCR. Suite à la détermination des séquences cibles des gènes SRY, AmelY et SMCY, nous avons défini plusieurs couples d'amorces. Ces différents couples ont fait l'objet d'un nombre important d'essais afin de garantir une parfaite sensibilité et spécificité de nos réactions. Au vu des résultats obtenus, des conditions de PCR, spécifiques pour chaque gène, ont été selectionnées afin de fournir un test de dépistage de grande fiabilité.

Etude Bibliographique

Chapitre I

Développement, différenciation et déterminisme du sexe des Mammifères

I. DEVELOPPEMENT ET DIFFERENCIATION DU SEXE

L'appareil sexuel des Mammifères est constitué par les gonades et les tractus génitaux. Les gonades, ovaires chez la femelle et testicules chez les mâles, sont le lieu de production des cellules reproductrices : les ovocytes et les spermatozoïdes.

Les gonades présentent également une fonction endocrinienne nécessaire au développement et à la différenciation des tractus génitaux mâles et femelles.

A. MISE EN PLACE DES CARACTERES SEXUELS PRIMAIRES

1. Formation des gonades

a- Stade indifférencié

Chez les Mammifères, les cellules germinales primordiales ou gonies, d'origine ectoblastique, se regroupent au niveau de la région endodermique du segment postérieur de l'intestin embryonnaire. Elles se multiplient et migrent pour venir coloniser une région mésoblastique adjacente à la zone de formation des ébauches rénales. Ces zones, symétriques de part et d'autre du plan médian, prennent une forme de crête (figure 1)et sont de ce fait dénommées, les crêtes génitales [119].

Ces crêtes génitales, vont s'organiser en gonade indifférenciée présentant [94] :

- un cortex, issu de l'épaississement des crêtes et contenant donc l'ensemble des gonies
- un mésenchyme médullaire d'origine mésonéphrotique au sein duquel se forment les cordons épithéliaux.

On observe alors une nouvelle multiplication puis une différenciation des gonies : c'est le début de la différenciation gonadique.

b- Stade différencié

♦ Différenciation en Testicule [56, 94, 119]

La différenciation en testicule est caractérisée par la formation de cordons séminifères. Ces cordons sont formés à partir de cellules nouvellement différenciées, les cellules de Sertoli qui englobent les gonies. Ces gonies colonisent les cordons séminifères au cours de nombreuses divisions mitotiques et prennent la dénomination de spermatogonies primordiales.

Les cellules de Sertoli ont un rôle de soutien et un rôle trophique pour ces spermatogonies. De plus, elles produisent un facteur hormonal, l'hormone antimüllerienne, orientant l'organogenèse du tractus génital en appareil mâle.

On observe également l'apparition de cellules spécialisées dans le territoire interstitiel mésenchymateux, entre les cordons séminifères ; ce sont les cellules de Leydig, responsables de la fonction androgénique du testicule. L'origine embryologique de ces cellules et les mécanismes responsables de leur différenciation ne sont pas encore connus.

Les spermatogonies sont à l'origine des cellules reproductrices : les spermatozoïdes. A la puberté, les cellules germinales, qu'elles soient de sexe génétique mâle ou femelle, sont programmées pour entrer en méiose. C'est donc à cette période que les spermatogonies évoluent en spermatozoïdes.

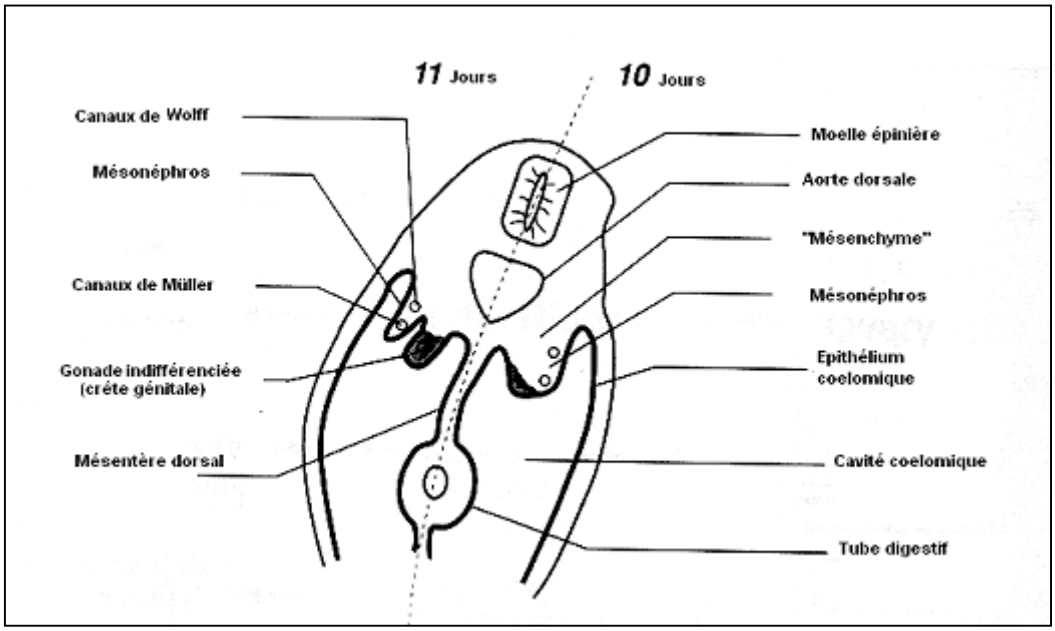


Figure 1 : Schéma en coupe transversale d'embryon de souris [74].

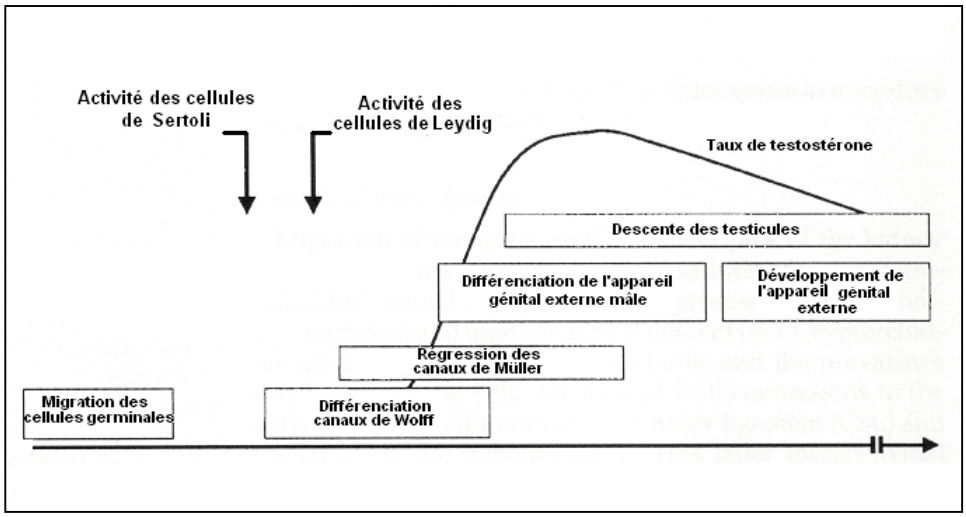


Figure 2 : Schéma chronologique de la différenciation sexuelle mâle [56].

♦ Différenciation en ovaires[56, 94, 119]

Le développement de la gonade indifférenciée en ovaire, débute par l'entrée en méiose précoce (au cours du développement embryonnaire) des gonies. On observe alors la formation d'ovocytes, qui dans la majorité des espèces, dont l'espèce équine, subissent un arrêt dans leur évolution au stade diplotène (2n chromosome) de la prophase de la première division méïotique. La reprise de l'évolution des ovocytes (de type I) s'effectue lors de la puberté. Ce n'est en effet que dans les heures précédant l'ovulation (lors de la libération de l'hormone lutéotrope), que s'achèvera cette première division méïotique.

Au cours de la différenciation en ovaire, se forment les cordons ovariens. Ceux-ci ont une structure épithéliale constituée de cellules somatiques associées aux ovocytes. Ces cordons ovariens, se fragmentent alors au cours de la folliculogénèse pour produire des follicules primordiaux. Ceux-ci sont ainsi constitués d'une assise cellulaire délimitant un ovocyte.

Suite à la régression des cordons ovariens, sont retrouvés ainsi en région corticale de l'organe, les follicules primordiaux, qui sont mis en contiguïté avec le tissu médullaire vascularisé.

2. Développement des tractus génitaux

a- Stade indifférencié

A l'instar de ce qui a été observé pour la formation des gonades, les tractus génitaux mâle et femelle sont formés à partir de la différenciation d'un tractus génital fœtal primitif commun aux deux sexes.

Ce tractus génital est constitué par [119] :

● le canal excréteur de Wolff, au sein duquel débouchent les néphrons du rein mésonéphrotique. Après avoir longé ce rein, il s'abouche au sinus urogénital du fœtus.

● le canal de Müller, formé par invagination de l'épithélium cœlomique de la région apicale du mésonéphros. Il se prolonge en direction caudale avant de s'aboucher au sinus urogénital, médialement à l'orifice du canal de Wolff.

● le sinus urogénital caudal à la vessie et débouchant sous le tubercule génital.

b- Différenciation en tractus génital mâle [94, 119]

On observe au cours de cette différenciation (figure 2):

- la régression des canaux de Müller
- la persistance et le développement des canaux de Wolff.

La partie proximale du canal de Wolff se développe pour former l'épididyme. On observe également une différenciation des canalicules mésonéphrotiques, qui vont former les canaux déférents des testicules. Ceux ci se prolongent jusqu'au centre des gonades, via un réseau de tubes droits, le rete testis, mettant en communication, les canaux déférents avec les tubes séminifères.

Dans la portion plus distale du canal de Wolff, on remarque le développement de bourgeons qui formeront ultérieurement les glandes séminales.

Les deux canaux de Wolff rejoignent la base de la vessie. La vessie se prolonge par l'urètre prostatique formé à partir d'un bourgeonnement du sinus urogénital. Enfin, à partir de cet urètre se développent les glandes prostatiques, bulbo-urétrales et urétrales.

c- Différenciation en tractus génital femelle

On observe au cours de celle-ci :
- le développement et la différenciation des canaux de Müller
- la régression des canaux de Wolff conjointement à celle du mésonéphros.

Les canaux de Müller se différencient dans leur partie proximale en trompes puis plus caudalement en cornes utérines. Les deux canaux viennent alors fusionner ensemble pour former suivant les espèces un ou plusieurs utérus (avec un ou plusieurs cols), et produire également la partie antérieure du vagin. La partie postérieure du vagin est formé quant à elle par la différenciation du sinus urogénital.

La jument présente un utérus de type bicorne, avec la présence de cornes utérines et d'un corps utérin de même longueur.

3. Développement et différenciation de l'appareil génital externe [119]

On observe au stade indifférencié la présence au niveau du périnée, d'un tubercule encadré par des bourrelets génitaux.

- **Chez les mâles**, il y a un développement important du tubercule génital, qui se creuse en gouttière en formant deux plis urogénitaux. Ces plis se referment sur le plan médian en formant le phallus creusé d'un canal. Ce canal va constituer la partie pénienne de l'urètre et permettre la communication de l'urètre prostatique avec l'environnement extérieur. Le phallus quant à lui est soutenu suivant les espèces (dont le cheval) le long de la paroi ventrale. Dans le même temps, les bourrelets génitaux se développent en plis labioscrotaux et fusionnent également sur le plan médian pour former des bourses qui contiendront ultérieurement les testicules.

- **Chez les femelles**, il n'y a qu'un développement discret du tubercule génital en clitoris. Le sillon urogénital s'abouche à la partie postérieure du vagin pour former le vestibule du vagin tandis que la vulve est formée par la persistance des plis urogénitaux. Les plis labioscrotaux disparaissent chez la plupart des Mammifères dont la jument sans laisser de vestiges.

4. Migration des gonades

Les gonades sont maintenues pour chacun des deux sexes par deux ligaments :
- un ligament suspenseur reliant les gonades aux pôles caudaux des reins,
- un ligament, nommé *gubernaculum testi* ou *ovari*, qui se prolonge depuis le pôle caudal de la gonade jusqu'à la paroi interne des bourrelets génitaux en traversant le canal inguinal.

- **Chez le mâle**, on observe conjointement à la croissance fœtal un allongement homogène du ligament suspenseur tandis que la longueur du *gubernaculum testis* reste constante. Ceci a pour conséquence de produire une migration passive des testicules vers la région inguinale. Dans un second temps, on observe la disparition du ligament suspenseur et la rétraction active du *gubernaculum testis*, entraînant une migration active des testicules au travers des foramens inguinaux. Ils se logent alors dans les bourrelets génitaux qui prennent le nom de scrotum.

Chez le cheval, la traversée du canal inguinal a lieu précocement à la naissance, mais les testicules ne seront présentés dans leur emplacement définitif que tardivement entre le 6^{e} et 18^{e} mois post natal.

- **Chez la femelle**, on observe une régression du *gubernaculum ovari*. Les ovaires restent donc en position abdominale, attachés aux pôles caudaux des reins par les ligaments suspenseurs.

B. MISE EN PLACE DES CARACTERES SEXUELS SECONDAIRES

1. La puberté [94]

Les appareils reproducteurs mis en place au cours de la vie fœtal, sont inactifs jusqu'à la puberté. Au cours de celle-ci, on observe la mise en place d'une régulation endocrinienne, via les hormones gonadotropes, du fonctionnement reproducteur.

La puberté se réalise chez les chevaux entre le 10^{e} et le 24^{e} mois avec une moyenne située vers le 18^{e} mois [25].

On constate ainsi chez les mâles, le déclenchement d'une production continue de spermatozoïdes tandis que chez les femelles s'opère une ovulation régulière (avec l'évolution des ovocytes de type I des follicules primordiaux en ovocytes II fécondables) à chaque œstrus.

Conjointement à l'activation des fonctions gonadiques, un certain nombre de modifications morphologiques s'opèrent.

2. Caractères morphologiques et comportementaux

A partir de la puberté, on observe des modifications de l'appareil génital externe. Ainsi chez les mâles, le phallus et les testicules se développent tandis que chez les femelles (autre que la femme) peu de modifications sont notées [94].

Par ailleurs, les mâles ont de manière générale un gabarit plus conséquent avec une musculature très développée au regard de ce qui est observé chez les femelles. Ainsi, on remarque chez les jeunes chevaux entiers, un important développement de l'avant main, contrairement aux jeunes chevaux castrés dont l'aspect général s'apparente davantage (à l'exception bien entendu des organes génitaux externes) à une jument.

Enfin, il est à noter que la puberté s'accompagne de l'acquisition de comportement reproducteur :

- continu chez les mâles
- discontinue chez les femelles qui a lieu au cours de l'œstrus.

II. DETERMINISME DU SEXE

Le déterminisme du sexe correspond à l'ensemble des mécanismes conduisant à la différenciation des gonades en testicule ou en ovaire. Il s'agit chez les Mammifères, d'un mécanisme génétique impliquant notamment des gènes portés par le chromosome Y. En effet, la différenciation mâle se produit dès lors qu'est présent au sein de la garniture chromosomique un chromosome Y et ceci quelque soit le nombre de chromosomes X présents [5, 84].

Le testicule joue un rôle déterminant dans la différenciation de l'appareil génital des Mammifères [59]. Le testicule est le lieu de production d'hormones dont certaines participent à la différenciation des structures de Wolff en appareil génital mâle et d'autres sont responsables de la régression des structures de Müller et ainsi de l'absence de développement d'un appareil génital femelle. La différenciation des canaux de Müller est indépendante de la présence d'ovaires [1, 5, 59, 84].

Le testicule fœtal est consituté de différentes populations cellulaires parmis lesquelles :
- les cellules de Sertoli, synthétisant l'hormone anti-müllérienne (AMH) responsable de la régression des canaux de Müller
- les cellules de Leydig sécrètant la testostérone (et son dérivé la DiHydroTestostérone [DHT]) aboutissant au développement et à la différenciation des canaux de Wolff [1, 5, 84]

La différenciation de l'appareil sexuel des Mammifères est ainsi le fruit :

● d'un déterminisme génétique primaire, correspondant à l'expression de gènes pour la différenciation de la gonade en testicule ou en ovaire

● d'un déterminisme hormonal secondaire, qui correspond à la différenciation et au développement de l'appareil génital en fonction de la présence des hormones produites par le testicule fœtal.

A. DETERMINISME GENETIQUE PRIMAIRE

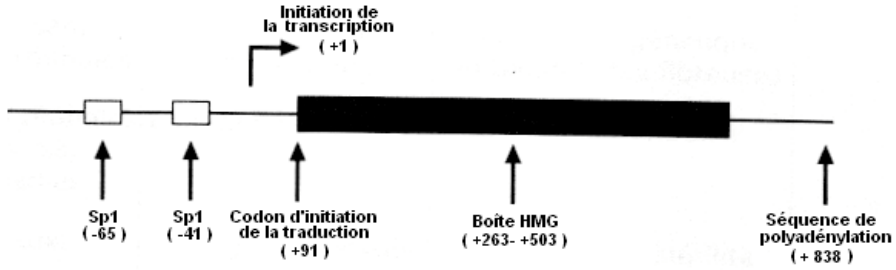
L'étude des cas de réversions du sexe XX et XY chez l'Homme, a permis d'identifier le facteur TDF (Testis Determining Factor) porté par le chromosome Y. L'analyse de la séquence du chromosome Y portant ce facteur a montré qu'il correspond à une zone au sein de laquelle s'inscrit le gène initiateur de la différenciation sexuelle mâle, le gène *SRY*[9].

1. Les gènes de la différenciation du sexe

a- Gène porté par le chromsome Y : le gène *SRY*

♦ Expression d u gène *SRY*

Le gène *SRY* de l'Homme est constitué d'un exon de 850 pb situé au sein d'un fragment de 35 kb de la partie terminale du bras court du chromosome Y (figure 3) [5, 84].



Sp1 : Séquence consensus de fixation du facteur de transcription Sp1.
HMG : High Mobility Group.

Figure 3: Schéma de la structure du gène SRY [5].

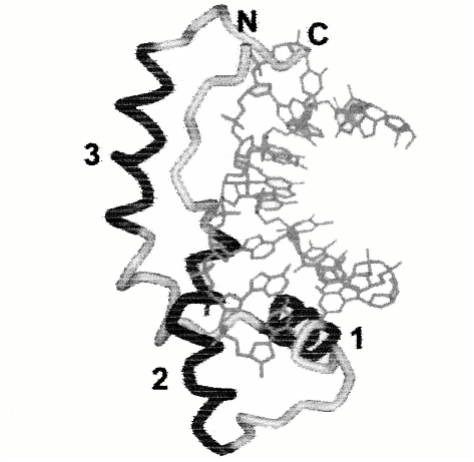


Figure 4 : Conformation spatiale de la protéine SRY [48].

L'expression du gène *SRY* se produit précocément lors de la formation des crêtes urogénitales mâles (entre le 10,5 et 12,5 jours après le coït chez la Souris [84, 106, 108] ; vers la 6ème semaine chez l'homme). Cette expression se poursuit sur une durée variable (quelques jours à quelques semaines) en fonction des espèces [68]. La Souris domestique, présente comme particularité d'avoir une première phase d'expression (lors de la formation des crêtes urogénitales) de très courte durée, suivie d'une seconde phase d'expression (à l'âge adulte) au sein des cellules germinales du testicule [68].

L'expression du gène *SRY* peut également se produire dans différents tissus. Des transcrits SRY sont ainsi retrouvés de manière encore inexpliquée, au sein des tissus cérébraux, du cœur ou encore du pancréas [68].

La régulation de l'expression du gène *SRY* ferait intervenir différents facteurs de transcription. Cette régulation dépend notamment d'un facteur de transcription ubiquiste, le facteur Sp1, qui agit lui même avec les facteurs de transcription SF-1 (Steroidogenic Factor 1) et WT-1 (Wilm's Tumor 1). Bien qu'aucun site promoteur n'ait pu être mis en évidence, d'autres facteurs, GATA-4 (Gaba Transporter transcription factor 4) et Fog-2 (Friend of gata 2) serait également impliqués dans cette régulation.

♦ Structure et fonction de la protéine SRY

Le gène *SRY* code pour une protéine de 204 à 223 acides aminés contenant une boite HMG (Hight Mobility Group) de 80 acides aminés [95, 117]. Cette boite HMG place la protéine SRY comme chef de file de la famille des gènes *SOX* (SRY-related HMG box).

La conformation de la protéine SRY est due à la présence de trois hélices α (figure 4) [46]. On a identifié à chacune des extrémités de la protéine SRY, deux signaux de localisation nucléaire (domaine de fixation à la calmoduline à l'extrémité N terminale et au facteur d'importation importin-β pour l'extrémité C terminale). Après sa production dans le cytoplasme, la protéine SRY est ainsi introduite dans le noyau cellulaire.

Le domaine HMG permet à la protéine de se lier en un site spécifique à l'ADN et d'en modifier la conformation spatiale. Cette modification de conformation favoriserait un réarrangement de la chromatine pour faciliter la fixation de la machinerie de transcription sur l'ADN. La protéine SRY agirait ainsi comme un facteur de transcription assurant l'activation d'autres gènes responsables du développement sexuel mâle [1, 27, 47, 48, 57, 68].

♦ Mécanismes cellulaires initiés par l'expression du gène *SRY*

En dépit du fait, que la cible exacte de la protéine SRY ne soit pas encore déterminée, celle-ci semble avoir plusieurs rôles dans la différenciation du sexe.

Cette protéine intervient ainsi en activant la phase de multiplication des cellules pré-Sertoliniennes et en favorisant leur différenciation en cellules de Sertoli [48, 68].

La protéine SRY serait également à l'origine de migrations cellulaires lors de l'organisation du testicule fœtal. Elle induirait la synthèse de facteurs de migration pour la formation des cordons testiculaires ainsi que pour la réalisation d'un système artériel spécifique aux testicules (influençant la distribution locale des facteurs hormonaux sécrétés) [68].

b- Les autres gènes du déterminisme sexuel.

♦ Gène porté par le chromosome X : le gène *DAX-1*

L'étude de certains patients présentant une hypoplasie des organes génitaux ont révélé comme anomalie chromosomique une duplication de la région Xp21-Xpter. Il semble qu'un double dosage des gènes de cette portion du chromosome X puisse entrainer une réversion du sexe. Cette région a été nommée zone DSS (dosage-sensitive sex reversal) [109].

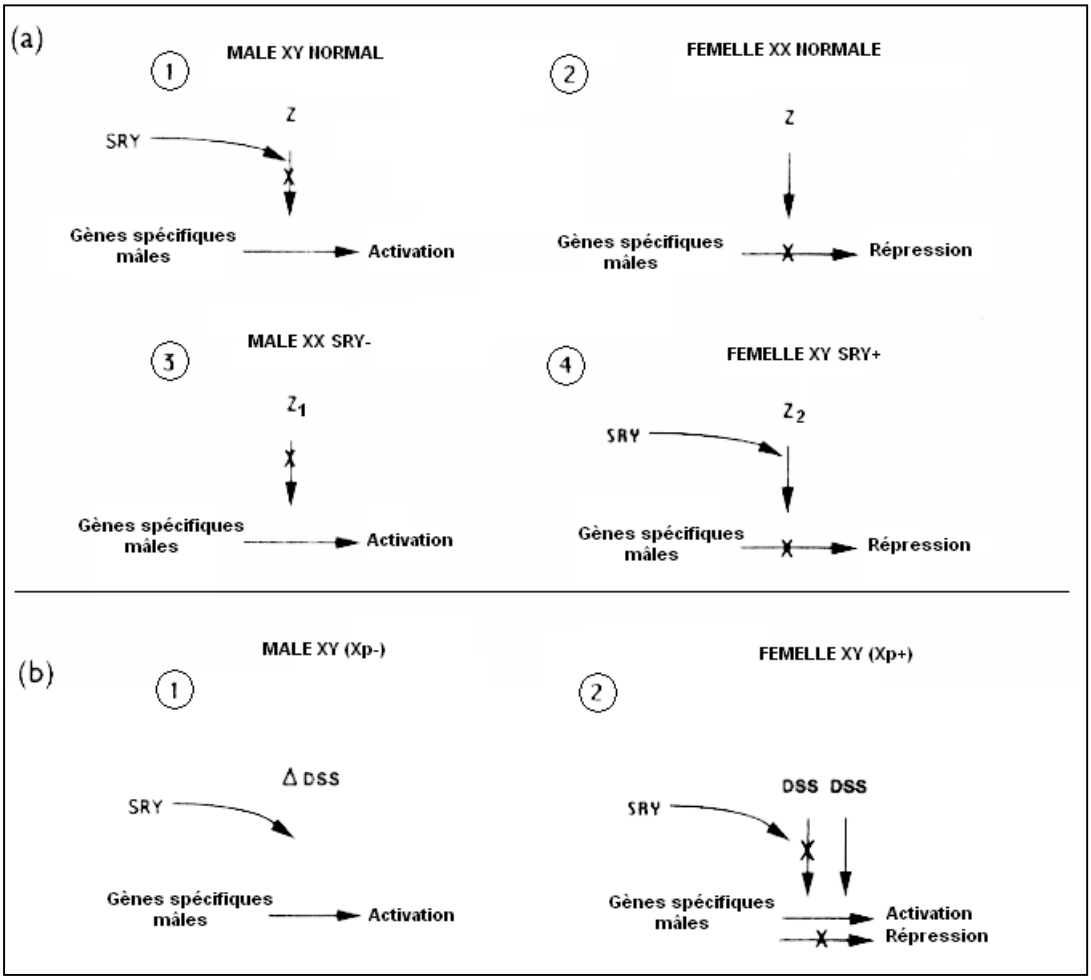


Figure 5 : Hypothèse de régulation du développement sexuel mâle [5, 84].
DSS : Dosage Sensitive Sex reversed (locus contenant le gène Dax-1)

Des hommes XY (SRY positif) ayant une délétion de cette région ont un développement sexuel mâle normal. Les gènes contenus dans la zone DSS ne sont donc pas essentiels au développement testiculaires. Néanmoins, lorsque cette région est dupliquée, on constate le développement d'ovaires [109].

Un mécanisme de différenciation du sexe impliquant un gène *Z* localisé au sein de cette zone DSS a été proposé [5, 83, 84]. La protéine issue de l'expression de ce gène *Z*, agirait comme répresseur des gènes induisant la différenciation mâle. Ce mécanisme de régulation pourrait expliquer (figure 5) :

- les cas de réversion du sexe XX (SRYnégatif) qui présentent une mutation du gène *Z* (noté Z1) à l'état homozygote rendant la protéine non fonctionnelle ;
- les cas de réversion du sexe XY (SRY positif) avec une mutation du gène *Z* (noté Z2) rendant la protéine insensible à l'inhibition de SRY ;
- les cas de développement mâle normal des individus présentant une délétion du bras Xp du chromosome X (XY(Xp-)) puisque l'absence de la protéine Z n'influence pas la différenciation sexuelle mâle.
- les cas de réversion du sexe XY avec duplication du bras Xp (XY(Xp+)) où la quantité de protéine SRY n'est pas suffisante pour inhiber la totalité des protéines Z ;

Le gène *Dax-1*(DSS-AC critical region on the X) a été isolé à partir de la zone DSS. Il code pour une protéine de la famille des récepteurs hormonaux nucléaires présentant un domaine en doigt de zinc permettant sa fixation à l'ADN [100]. La protéine Dax-1 agirait comme represseur des gènes impliqués dans la différenciation sexuelle mâle et serait inhibée dans la gonade mâle du fait de l'action de la protéine SRY. Cette protéine joue ainsi un rôle important dans la différenciation sexuelle femelle. Il semble également qu'elle intervienne chez les mâles en stimulant la gamétogénèse [112].

L'expression de la protéine Dax-1 est elle-même soumise à un mécanisme de régulation impliquant différents facteurs (figure 6). Ainsi, le promoteur du gène *Dax-1* possède un site de fixation pour le facteur SF-1, ce qui montre que celui-ci régulerait l'expression du gène *Dax-1* [117]. Ce facteur est issu de l'expression d'un gène porté par les autosomes. Ainsi, les gonosomes ne seraient pas les seuls chromosomes porteurs de gènes impliqués dans la différenciation du sexe.

♦ Gènes portés par les autosomes

▸ *Le gène SF-1*

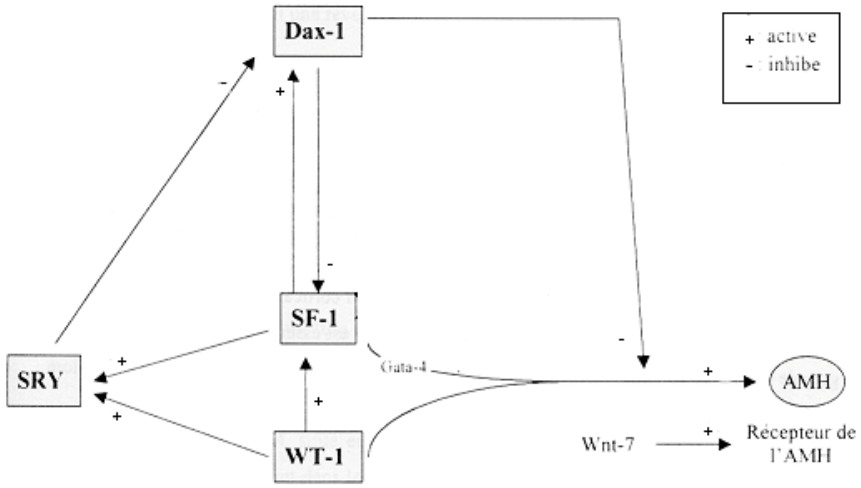
Le gène *SF-1* (porté par le chromosome 9 chez l'homme) code pour un membre orphelin de la superfamille des récepteurs nucléaires, impliqué dans la régulation de l'expression des gènes de la stéroïdogénèse [82, 103, 114, 117].

Son expression a lieu précocément (dès le 9eme jour chez la souris) au sein de la gonade indifférenciée au niveau des cellules pré-Sertoliennes foetales [5, 102, 117]. Cette protéine jouerait de multiples rôles dans la différenciation gonadique et serait indispensable pour le développement des gonades et des glandes surrénales [5, 82].

Le facteur SF-1 présente des sites de liaison aux promoteurs des gènes *SRY* et *Dax-1* et semblerait réguler l'expression de ces gènes [5]. Il a également été montré que la protéine Dax-1 pouvait inhiber l'activité du facteur SF-1 [68]. Il semble ainsi que ce facteur intervienne pour la régulation de l'expression de différents gènes (figure 6 et 7).

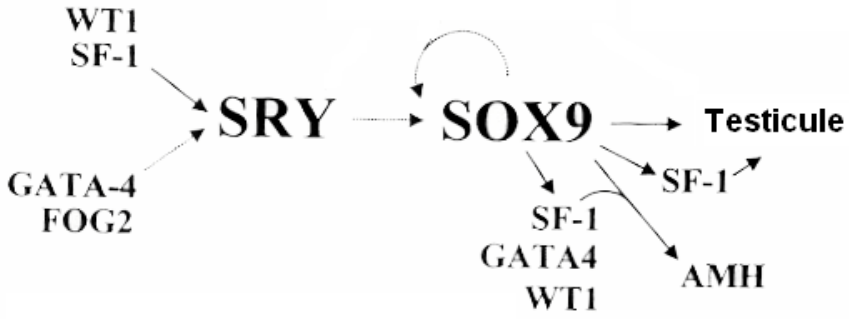
▸ *Le gène WT-1*

Le gène *WT-1* (porté par le chromosome 11 chez l'homme [103]) est exprimé chez les embryons mâle et femelle où il code pour un facteur de transcription possédant une structure en doigt de zinc [117]. Son expression est précoce, dès le 9ème jour du développement embryonnaire de la souris et se localise au sein du rein en formation et de la gonade primitive[5]. Ce facteur participerait à la formation et au maintien des crêtes génitales et induirait le développement des structures primaires rénales et gonadiques [5, 114].



AMH : Hormone anti-müllérienne.
Dax-1 : DSS-ACH critical region on the X-1.
Gata-4 : Gaba transporter transcription factor 4.
SF-1 : Steroidogenic Factor 1.
SRY : SRY determining Region of the Y chromosome.
Wnt-7 : Winglesstype MMTV integration site family - 7.
WT-1 : Wilm's Tumor 1.

Figure 6 : Schéma des interactions entre les gènes SRY, Dax-1, WT-1, SF-1 et AMH [100].



AMH : Hormone anti-müllérienne.
FOG2 : Friend of GATA2
GATA4 : Gaba transporter transcription factor 4.
SF-1 : Steroidogenic Factor 1.
SOX9 : SRY-related HMGbox 9
SRY : SRY determining Region of the Y chromosome.
WT1 : Wilm's Tumor 1.

Figure 7 : Modèle de régulation de l'expression des gènes SRY et Sox9 [68].

Le facteur WT-1 agirait avec le facteur SF-1 pour induire (figure 6 et 7) :
- l'expression d'une protéine SP1intervenant dans l'expression du gène *SRY* [68]
- l'expression du gène *AMH*, codant pour l'hormone antimullérienne responsable de la régression des canaux de müller [100]

Le facteur WT-1 interviendrait également dans l'expression du gène *Sox-9* [68].

▸ *Le gène Sox-9*

Le gène *Sox-9* est très bien conservé parmi les vertébrés [68]. Il pourrait bien être de ce fait un facteur important du déterminisme du sexe. Certaines mutations affectant ce gène sont responsables chez l'homme, de la dysplasie campomélique et d'une réversion du sexe.

Ce gène (porté par le chromosome 17 chez l'Homme) code pour une protéine présentant un domaine HMG identique à celle identifiée chez SRY. Cette protéine présente des signaux de passage intranucléaire et agirait donc probablement comme un facteur de transcription. Elle se lierait ainsi de manière spécifique à une séquence génomique et modifierait l'architecture de l'ADN [82, 114].

La protéine Sox9 est synthétisée à l'état embryonnaire au niveau des crêtes génitales pour chacun des deux sexes puis ultérieurement uniquement chez les embryons mâles. Cette expression se poursuit également à l'état adulte au niveau des cellules de Sertoli [68, 48].

La protéine Sox-9 intervient dans le déclenchement de la différenciation des cellules de Sertoli et participe également (sous la forme de dimère) à la formation de l'appareil squelettique des individus mâles et femelles. Elle intervient également dans l'activation de la transcription des gènes *SF-1* et *AMH* (la régulation de celui-ci faisant probablement intervenir les facteurs SF-1 et également Gata-4) (figure 7) [68].

L'expression du gène *Sox-9* serait régulée soit par SRY, soit par d'autres facteurs intervenant précocément lors de la différenciation des cellules de Sertoli tel que le facteur WT-1. Il n'est pas exclu qu'il soit régulé par sa propre expression (figure 7). L'action de SRY sur la transcription de *Sox-9* n'est pas clairement prouvée. Il est par ailleurs probable que SRY puisse intervenir en tant que répresseur d'une protéine, qui elle-même aurait un rôle dans l'inhibition de la transcription de *Sox-9* [68].

L'accumulation de protéine Sox-9 nucléaire conduit à l'expression du gène codant pour l'hormone antimullérienne. Cette accumulation est sous le contrôle de signaux de transports nucléaires dont l'expression modifierait l'action de Sox9 [38].

▸ *Les gènes Wnt-4 et Wnt-7*

Les gènes *Wnt-4* (Winglesstype MMTV integration site family 4) et *Wnt-7* (Winglesstype MMTV integration site family 7) portés respectivement par les chromosomes 4 et 3 chez l'Homme, produisent différents signaux intervenant dans les mécanismes du développement.

Ainsi, la protéine Wnt-4 inhibe la mise en place de la vascularisation mâle et le recrutement de cellules de Leydig dans les gonades de constitution cellulaire XX. Le gène *Wnt-4* semble être un facteur intervenant non pas dans la différenciation sexuelle mâle mais dans le différenciation femelle. [58].

La protéine Wnt-7 régule l'expression du recepteur de l'hormone antimullérienne AMH. Elle sensibilise ainsi le mésenchyme des dérivés mulleriens à l'action de cette hormone et participe à leur régression (figure 6) [100].

2. La cascade du déterminisme sexuel

La différenciation du sexe fait intervenir un nombre important de facteurs (dont certains n'ont pas encore été découverts) ne pouvant être décrits de manière exhaustive dans cette étude. Le déterminisme du sexe est le résultat d'une activation d'une cascade de gènes portés par le chromosome Y mais aussi le chromosome X et les autosomes. Les mécanismes de régulations sont relativement complexes et divers modèles ont été proposés au fur et à mesure des avancées scientifiques.

Il a été décrit un modèle simplifié centré sur l'action de SRY et de Sox9 qui sont les deux principaux gènes actuellement étudiés (figure 7).

L'expression de SRY dépendrait principalement de l'action des facteurs SF-1 et WT-1 mais aussi des facteurs GATA-4 et Fog-2. La protéine SRY interviendrait dans différents évènements cellulaires en régulant l'expression d'autres facteurs. Néanmoins, le rôle principal qui lui est actuellement accordé est d'amplifier l'expression du gène *Sox-9.* La protéine Sox9 est normalement exprimée chez les embryons mâle et femelle par l'action du facteur SF-1. L'intervention de la protéine SRY augmenterait l'expression du gène *Sox-9* chez les individus mâles ce qui permettrait l'activation d'autres gènes de la différentiation mâle dont le gène *AMH* codant pour l'hormone antimüllérienne (figure 7).

B. DETERMINISME HORMONAL SECONDAIRE

Les expériences réalisées par Jost dans les années 1940 *[in 84]* ont permis de mettre en évidence l'évolution spontanée vers un type femelle de l'appareil sexuel indépendamment du sexe génétique. Ce n'est que par l'influence hormonale secondaire des testicules que se produit la régression de cet appareil, au profit de la mise en place des structures génitales mâles [94].

Les facteurs hormonaux intervenant ainsi dans le développement de l'appareil génital mâle sont la testostérone et l'hormone antimüllérienne (AMH).

1. La testostérone [94, 119]

La testostérone est un stéroïde synthétisé principalement par les cellules testiculaires de Leydig ainsi que par les glandes surrénales en quantité plus réduite. Elle résulte d'un processus de biotransformation du cholestérol en faisant intervenir quatre enzymes distinctes (P-450scc, 3β-HSD, P-450C17 et 17β-HSD) [119].

Cette synthèse est déclenchée au cours de l'ontogenèse par le gène *SF-1* (intervenant dans l'expression des différentes enzymes de la stéroïdogenèse) puis est entretenue au cours de la vie fœtale par différentes hormones gonadotropes. Ainsi, cette sécrétion est permise dans un premier temps par l'hormone chorionique maternelle hCG (human Chorionic Gonadotropine) puis par l'hormone hypophysaire du fœtus LH (Luteinizing hormone) synthétisée une fois la maturation de l'antéhypophyse réalisée. La synthèse de testostérone s'accroît ultérieurement, au moment de la puberté au moment de la mise en place des caractères sexuels secondaires et de l'activation des fonctions de reproduction [119].

La testostérone synthétisée se fixe sur les récepteurs protéiques cytosoliques des cellules cibles pour être transloquée au sein du noyau de la cellule. Elle intervient alors à ce niveau en se liant de manière spécifique en certaines régions de l'ADN pour favoriser la transcription et par suite la synthèse de facteurs de croissance.

Pour la majorité des structures sexuelles, la testostérone est, préalablement à son transport nucléaire, activée en 5α-dihydrostérone (DHT) par une enzyme cytosolique la 5α-réductase. La DHT intervient ainsi dans le développement des canaux de Wolff, dans le développement de la prostate, ainsi que dans la masculinisation des organes génitaux externes. Seule la stabilisation des canaux de Wolff dépendrait de la testostérone propre.

Il convient de remarquer que l'action de la testostérone d'origine surrénalienne est inhibée chez les femelles par l'action de la progestérone [119].

2. L'hormone antimüllérienne [94, 119]

L'hormone antimüllerienne (AMH) est une glycoprotéine synthétisée par les cellules de Sertoli. Elle est le résultat de l'expression d'un gène autosomal porté chez l'homme par le chromosome n°19.

Plusieurs facteurs sont impliqués dans le déclenchement de sa synthèse avec notamment les facteurs Sox9, SF-1, WT-1 et Gata-4 [96]. Cette synthèse débute dès le stade de différenciation de la gonade primitive en testicule, s'accroît au moment de la régression des dérivés mülleriens puis s'atténue jusqu'à s'arrêter au moment de la puberté. L'AMH est également synthétisée au niveau de l'ovaire par les cellules de la granulosa. Cette synthèse qui s'effectue après la naissance et durant toute la vie adulte interviendrait dans le contrôle de la croissance folliculaire.

Pour être active, l'AMH subit un clivage de sa région C-terminale par une enzyme exprimée chez les cellules cibles uniquement. Son action est médiée par deux récepteurs transmembranaires à activité serine thréonine kinase. L'un des récepteurs (type II) lie l'hormone tandis que le second (type I) transmet le signal en phosphorylant des protéines de type Smad cytoplasmiques. Ce sont enfin ces protéines, qui vont avoir une action de régulation de certains gènes.

Il a été remarqué chez l'homme que les taux d'AMH et de testostérone étaient étroitement liés. En effet, il semblerait que la testostérone puisse avoir un effet inhibiteur sur l'AMH au cours de la puberté et occasionnerait ainsi la diminution de son taux circulant. Il a néanmoins été prouvé chez les rongeurs, que l'AMH pouvait à l'inverse avoir un rôle de stimulation de la stéroïdogenèse.

La mise en place du sexe résulte ainsi d'un processus de développement progressif, au cours duquel interviennent de nombreux facteurs que ce soit au niveau du déterminisme primaire génétique comme au niveau du déterminisme secondaire hormonal. Ces facteurs interviennent au sein de mécanismes de régulation qui bien que partiellement élucidés, dénotent une remarquable complexité.

Les causes d'anomalies de développement du sexe peuvent ainsi être nombreuses et concerner aussi bien par exemple la séquence d'un gène fonctionnel (d'une enzyme de synthèse ou d'un récepteur) ou de régulation. Ceci explique également la diversité des cas cliniques rencontrés et la difficulté à établir un diagnostic étiologique pour un certain nombre d'entre elles, particulièrement lorsque les moyens d'étude sont relativement réduits comme c'est le cas chez le cheval.

Chapitre II

Anomalies du développement sexuel des équidés

I. ETUDE CLINIQUE DES ETATS INTERSEXUES

● Les aberrations du développement sexuel, qui peuvent intervenir à différents niveaux, lors du déterminisme primaire génétique ou bien lors du déterminisme secondaire hormonal, aboutissent parfois à la réalisation d'un état intersexué.

L'état intersexué est caractérisé par la présence simultanée au sein d'un même animal de caractéristiques mâles et femelles.

● On définit **l'hermaphrodisme** comme la mise en place chez un même individu, de tissus testiculaire et ovarien. On différencie les cas où il y a présence d'un ovaire et d'un testicule (**hermaphrodisme latéral**), des cas où les deux tissus sont présents au sein d'un même organe : *l'ovotestis*. *L'ovotestis* peut être bilatéral (**hermaphrodisme bilatéral**) ou unilatéral avec la présence conjointe d'un testicule ou d'un ovaire (**hermaphrodisme unilatéral**) [94].

● On a également des cas où l'on observe une discordance entre le développement de la gonade (qui est en accord avec la composition chromosomique) et celui de l'appareil génital. C'est ainsi que l'on définit les **pseudohermaphrodites mâles**, individus présentant un tissu testiculaire et un phénotype féminin, et *a contrario*, **les pseudohermaphrodites féminins**, qui malgré la présence de tissu ovarien, ont eu une différenciation sexuelle masculine.

Cette classification n'apparaît toutefois pas toujours adaptée en fonction des cas rencontrés, c'est pourquoi la définition de l'intersexualité sera étendue à tous les cas présentant une aberration du développement du sexe [28]. Ceci permet ainsi d'y inclure, certains cas de réversion du sexe forts intéressants.

Par ailleurs, nous avons également choisi d'inclure dans cette étude, les cas d'hypogonadisme qui résultent d'une anomalie chromosomique. Ceux-ci sont effectivement souvent associés à d'autres anomalies (lors de mosaïcisme cellulaire par exemple) en relation avec l'intersexualité.

A. L'HYPOGONADISME

L'hypogonadisme se manifeste par une déficience du développement des gonades et de l'appareil reproducteur. Il existe néanmoins une véritable concordance entre les sexes chromosomique et phénotypique. L'altération phénotypique est variable suivant les cas et les espèces [94].

● L'hypogonadisme est l'une des principales anomalies du développement sexuel chez le cheval [94]. Il est souvent associé à la perte de l'un des gonosomes X de la jument, équivalent au syndrome de Turner défini chez la femme. Néanmoins, il n'apparaît pas chez le cheval de modifications phénotypiques externes aussi importante que chez la femme (taille réduite, déformation des oreilles, anomalies du palais, etc.) si ce n'est éventuellement un gabarit pouvant être réduit par rapport à un animal de race et d'âge identiques [21, 33, 53]. Cette modification morphologique n'est cependant pas généralisable.

● L'hypogonadisme se traduit par une absence de cycle sexuel, avec une infertilité qui est le principal motif de consultation. A l'examen clinique, on constate des ovaires de petite taille (avec absence de follicules) et un appareil génital interne généralement moins développé que la normale [11, 18, 20, 22, 24, 29, 33, 53, 54, 73, 76, 79, 86, 110, 115]. Un cas d'hypogonadisme a été rapporté chez une jument présentant un caryotype XX avec un isochromosome Xq (chromosome X formé par la duplication du bras Xq et perte du bras Xp) [75]. Du fait du phénomène d'inactivation de l'un des chromosomes X, une partie des cellules possèderait uniquement cet isochromosome i(Xq) activé. L'hypogonadisme associé peut être expliqué par le fait que cet isochromosome ne joue pas le rôle d'un chromosome X complet.

● On a constaté, chez des rats et des souris présentant une monosomie X, qu'ils restaient contrairement à la jument ou la femme, capables de procréer. Il a été avancé comme hypothèse que l'absence de l'un des deux gonosomes entraîne une diminution de la viabilité du pool d'ovocytes acquis *in utero*. Les rongeurs ayant un cycle de développement court, présentent un pool d'ovocytes suffisant pour se reproduire, chose qui n'est pas permise chez les espèces à cycle de développement long comme la jument et la femme [11].

Néanmoins, la littérature rapporte des cas de patientes atteintes du Syndrome de Turner ayant pu procréer [11]. On a constaté que 50% des patientes atteintes de ce syndrome présentaient deux populations cellulaires mosaïques XO/XX [94]. Plusieurs cas d'hypogonadisme XO/XX ont ainsi également été rapportés chez la jument et, certaines d'entre elles, présentaient non seulement un utérus de taille normal [18], mais aussi étaient fertiles. Néanmoins cette fertilité reste transitoire, puisqu'elle est limitée à la première année de monte [45]. Conformément à l'hypothèse qui avait été émise, la mosaïcité compenserait en partie l'absence de l'un des chromosomes X. Ces données montrent donc qu'il est possible d'avoir une jument ayant pouliné avec une anomalie de son caryotype.

B. L'HERMAPHRODISME VRAI

Six cas d'hermaphrodisme vrai équins sont décrits à ce jour dans la littérature. On peut distinguer parmi ceux-ci :

- 2 cas d'hermaphrodisme latéral [22, 105]
- 3 cas d'hermaphrodisme bilatéral [35, 87]

Il semble difficile de statuer sur le type d'hermaphrodisme correspondant au dernier cas [85], car bien qu'il soit fait mention de la présence de tissu testiculaire et ovarien à droite comme à gauche aucune véritable relation anatomique n'a été constatée. Il est néanmoins, possible de suggérer pour les tissus trouvés en région inguinale droite, qu'il s'agisse d'un éventuel ovotestis (avec une partie ovarienne ayant franchi l'anneau inguinal et une partie testiculaire en localisation abdominale). Cette hypothèse reste plus discutable pour les tissus trouvés à gauche.

Aucun cas d'hermaphrodisme unilatéral n'a été rapporté à ce jour en espèce équine.

Les caractéristiques comportementales, morphologiques et anatomiques sont variables suivant les cas (annexe 1) et il est impossible d'établir une corrélation entre les anomalies morphologiques, comportementales et chromosomiques. Les suspicions d'hermaphrodisme reposent donc sur la présence de signes d'appel qui sont avant tout comportementaux et/ou morphologiques.

Les anomalies morphologiques les plus fréquentes correspondent :

-pour les chevaux de type femelle à une hypertrophie clitoridienne

-pour les chevaux de type mâle à une atrophie du pénis accompagnée d'une cryptorchidie éventuelle.

C. LE PSEUDOHERMAPHRODISME

1. Le pseudohermaphrodisme mâle

Le pseudohermaphrodisme mâle a été décrit chez 24 chevaux [4, 6, 13, 14, 15, 22, 23, 26, 28, 34, 37, 39, 41, 43, 52, 65, 69, 79, 88, 91, 93, 94, 98, 118].

Au cours de l'étude des cas rapportés dans la littérature, nous avons pu nous rendre compte qu'en dépit de l'absence de certaines données, apparaissent plusieurs caractéristiques comportementales, morphologiques et anatomiques communes (annexes 2, 3 et 4).

On trouve ainsi 3 catégories phénotypiques différentes :

- les chevaux de phénotype apparenté mâle avec un pénis atrophié (5 cas)
- les chevaux de phénotype apparenté femelle avec :
  - un clitoris hypertrophié (10 cas)
  - un micropénis (4 cas)
- les chevaux de phénotype femelle sans anomalie de l'appareil génital externe (5 cas)

La localisation des testicules qu'ils soient eutopiques ou non, ainsi que le degré de développement des dérivés des canaux de Wolff et de Müller, sont très variables au sein d'une même catégorie.

De même, les examens complémentaires entrepris, ne montrent aucune corrélation entre l'anomalie chromosomique (ou génétique) et le degré de masculinisation de l'animal.

En revanche, il est possible de remarquer comme point commun pour la très grande majorité des cas, un trouble du comportement, qui se traduit le plus souvent par l'acquisition de séquences comportementales propre à l'étalon à savoir, une attirance pour les femelles en œstrus et parfois une certaine agressivité.

De manière quelque peu simpliste, il est possible de définir les principales caractéristiques morphologiques qui accompagnent le pseudohermaphrodisme mâle comme étant une ambiguïté génitale avec le développement de plis vulvaires en région périnéale, et la présence d'un clitoris hypertrophié ou d'un micropénis.

Nous avons également recensé les anomalies du caryotype, par catégorie, en fonction de la présence ou non au sein de la garniture chromosomique, d'un gonosome Y. Nous avons ainsi :

- 11 cas pour lesquels le chromosome Y a été identifié
- 10 cas avec une population cellulaire portant exclusivement le gonosome X
- 3 cas pour lesquels aucune étude du caryotype n'avait été entreprise.

Il convient d'être prudent sur l'interprétation des cas où aucun chromosome Y n'est présent. En effet, celle-ci doit tenir compte de la nature des prélèvements, ainsi que du nombre de métaphases observées.

Par exemple, on a retrouvé chez un de ces cas (cheval belge de 2 ans [34]) au moins deux populations cellulaires distinctes avec :

- pour les prélèvements de peau, les chromosomes XX (50 métaphases)
-pour les prélèvements testiculaires et sanguins, un caryotype XY/XYY (respectivement 5 et 4 métaphases).

L'hypothèse d'un mosaïcisme XX/XY/XYY peut être avancée mais ne peut être confirmée au vu du faible nombre de métaphases présentant le chromosome Y [34].

2. Le pseudohermaphrodisme femelle

De nombreux cas de juments présentant des troubles fonctionnels de la reproduction (absence de cycle œstral associé ou non à une stérilité) sont décrits dans la littérature (annexes 5 et 6), et nous retrouvons parmi ceux-ci les cas d'anomalie chromosomique et génétique.

Contrairement, au pseudohermaphrodisme mâle, il semble qu'il soit plus difficile de catégoriser de manière certaine ces cas et ceci pour diverses raisons.

D'une part, les cas recensés sont cliniquement très semblables aux cas d'hypogonadisme. Il s'agit effectivement de juments, ne présentant aucune anomalie morphologique ou comportementale, et qui se caractérisent principalement par une atrophie des ovaires et parfois de l'appareil génital interne, utérus et vagin. Il est donc souvent difficile de distinguer entre eux les cas de dysgénésie gonadique XY (fréquemment retrouvés dans notre étude), et des syndromes XO et XXX (et assimilés) [97].

D'autre part, les moyens mis en œuvre pour l'étude de ces cas est relativement limité. En effet, dans les cas de pseudohermaphrodisme mâle, il est relativement aisé de proposer une intervention chirurgicale qui vise à écarter une hypothèse tumorale et à réduire le caractère agressif de l'animal [51]. Ces interventions permettent alors de faire analyser les gonades et d'attester de leur nature testiculaire. Ceci explique qu'en l'absence d'indication chirurgicale spécifique, rares sont les cas de pseudohermaphrodisme femelle recensés qui ont pu faire l'objet d'une analyse histologique des gonades atrophiées. De même cette absence d'intervention chirurgicale, ne permet pas d'obtenir d'information sur les dérivés des canaux de Wolff et il faut se contenter pour la description des dérivés des canaux de Müller d'un examen par palpation transrectale (associé parfois à un examen vaginoscopique).

Ainsi a été exclu de ce chapitre, le cas d'un andalou de 1 an présentant une hypertrophie clitoridienne, un utérus, l'absence de l'ovaire droit et un caryotype XX [22]. Il n'est pas improbable d'ailleurs, que ce cas puisse correspondre davantage à un pseudohermaphrodite mâle ou encore à un hermaphrodite vrai.

Il en a été fait de même, pour le cas décrit par Chandley en 1975 [24], d'un pur-sang de conformation femelle avec des ovaires atrophiés et dont le caryotype est XY. La distinction entre un syndrome de « testicule féminisant » (donc classé parmi les pseudohermaphrodites mâles) et une dysgénésie gonadique n'a pu être réalisée. Un dosage de la testostérone après stimulation à l'hCG aurait été un élément de réponse fort intéressant dans ce cas [97].

L'absence d'analyse histologique a d'ailleurs conduit quelques praticiens à réaliser ces dosages de testostérone associée à une stimulation à l'hCG. Ces dosages permettent de confirmer l'absence de tissu testiculaire sécrétant et donc de supposer qu'il s'agisse de pseudohermaphrodisme femelle [2].

Il convient enfin, de remarquer qu'un certain nombre de cas ne sont pas décrits dans la littérature quand bien même, ils ont pu être traités au sein d'institut de référence (31 cas examinés au laboratoire de cytogénétique de New Bolton Center entre 1980 et 1988 et n'ayant pas l'objet de publication [67]).

L'ensemble de ces remarques, nous ont conduit à présenter les cas de pseudohermaphrodisme femelle, non pas de manière exhaustive, mais en faisant apparaître les points communs et certaines particularités (annexes 5 et 6).

Nous remarquons ainsi que l'ensemble des cas rapportés ont fait l'objet d'un examen, pour cause d'une apparente infertilité. Ce sont des juments n'ayant aucune anomalie morphologique, ni même généralement comportementale (un cas présente une agressivité marquée [30]). Certaines présentent un cycle œstral régulier contrairement à d'autres et l'appareil anatomique interne est soit normal soit décrit comme étant flasque à la palpation transrectale. Le point commun fondamental entre ces cas correspond à une atrophie des ovaires qui sont de ce fait parfois imperceptibles.

Concernant les anomalies chromosomiques ou génétiques associées, il est impossible d'établir une corrélation stricte entre les signes cliniques et les aberrations chromosomiques

ou génétiques rencontrées. Le seul constat qui peut être fait est le nombre important de cas de réversion du sexe.

Enfin, nous pouvons remarquer :

- la présence d'un caryotype complexe XO/XX/XXX/XXY/XXXY/XXYY et pour lequel il est avancé une hypothèse de chimérisme [67], c'est à dire d'un mélange de cellules réalisé avec un jumeau hétérogamétique par communication allantochoriale au cours de la gestation.
- le cas d'une jument XY, ayant mis bas, une pouliche (caryotype XX) [104].

Les signes d'appels qui doivent conduire à réaliser des examens complémentaires sont identiques à ceux rencontrés pour l'hypogonadisme : ce sont des juments ayant des troubles de la fertilité avec une atrophie ovarienne [97]. Bien que décrits comme relativement rare, l'importance de ces cas d'aberration chromosomique et génétique peut bien être sous évaluée. Une étude cytogénétique conduite sur 204 juments (avec ou sans trouble de reproduction, de races variées, âgées de 1 à 17 ans) a été menée en 1993 afin d'évaluer la prévalence de ces anomalies [92]. Trois cas ont été identifiés :

- une jument de 4 ans au caryotype XXX
- une autre jument de gabarit «important» avec un caryotype XY
- une jument pur-sang de 9 ans mosaïque au caryotype XO/XX

L'étude a donc montré l'apparition de 1,5% de cas d'anomalie chromosomique, ce qui porte à moins de 3% la prévalence estimée (avec un indice de confiance de 95%) au sein de la population équine [92]. Ces résultats sont concordants avec les précédentes études réalisées en 1979 par Walker et Bruere [115] et en 1986 par Hayes [51].

La prévalence d'anomalies chromosomiques chez des juments présentées pour infertilité est estimée à 68 % bien qu'une étude statistique rigoureuse telle que précédemment décrite soit nécessaire pour confirmer cette valeur [11, 17].

L'intersexualité équine semble dominée par les cas de pseudohermaphrodisme mâle, suivi par les hermaphrodites vrais et enfin les pseudohermaphrodites femelles [94]. Il faut néanmoins tenir compte de l'absence d'une étude statistique aléatoire, ce qui nous interdit toute évaluation de la prévalence de chacune de ces catégories. Les signes cliniques morphologiques et comportementaux quelque peu surprenants des cas de pseudohermaphrodisme mâles ainsi que des hermaphrodites, pourraient effectivement expliquer leur importance relative dans la littérature. Ces aberrations seraient donc peu fréquentes certes, mais pas aussi rares qu'il y paraît De la même manière aucune prédisposition raciale ne peut être établie.

Ces aberrations rendent difficile la détermination du sexe de l'animal, ce qui est préjudiciable aux inscriptions aux différents Studbooks [71, 72]. Le monde turfiste n'est pas non plus épargné ; il faut citer le cas décrit par Cammaert [23], d'une jument pseudohermaphrodite mâle (XX) ayant eu un résultat positif à un contrôle antidopage, du fait d'un taux anormalement élevé de testostérone plasmatique et urinaire.

Enfin, au sein de chacune des catégories décrites, il n'a jamais été possible de réaliser une corrélation entre l'expression phénotypique et l'aberration chromosomique ou génétique. Ceci, nous amène alors à tenter une analyse transversale de ces cas au travers cette fois d'une étude cytologique et génétique comparative.

II. ETUDE CYTOLOGIQUE DES ETATS INTERSEXUES

Une étude comparative des différents caryotypes de la littérature a été réalisée. A cette fin, deux phénomènes conduisant à une anomalie caryotypique ont été dissociées :

- une modification du nombre de chromosome : l'aneuploïdie
- la présence de plusieurs populations cellulaires de composition chromosomique différente : la myxoploïdie.

Bien que certaines anomalies affectant les autosomes aient été identifiées chez le cheval (trisomies 23,26,28, 30 et 31), celles ci sont peu décrites au regard de celles qui affectent les chromosomes sexuels (90% des cas rapportés), et c'est pourquoi notre étude sera centrée sur les anomalies affectant les gonosomes uniquement [17].

La myxoploïdie trouve son origine dans un mélange cellulaire issu soit :
- d'un échange entre deux individus différents au cours de l'ontogenèse : c'est le chimérisme
- de l'acquisition ou l'apparition au cours du développement à partir d'un même et unique œuf : c'est le mosaïcisme.

A. LES ANEUPLOÏDIES GONOSOMIQUES SIMPLES (UNE SEULE POPULATION CELLULAIRE)

● Un constat (tableau 1) peut être fait quant à l'importance des monosomies X qui représenteraient 36 % des cas d'aberration chromosomique [17]. L'autre anomalie pouvant également être associée à un hypogonadisme est la trisomie X.

● En 1989, huit cas de trisomie X avait été décrits dans la littérature et en exceptant un cas d'hypoplasie gonadique, cette anomalie était supposée n'altérer aucunement le phénotype et la fonction reproductrice des juments [24, 91]. Néanmoins, deux autres cas d'hypogonadisme (avec stérilité associée) ont depuis été décrits [92, 107]. Ceci permet de supposer que les chevaux trisomiques XXX puissent, à l'instar de chez la femme, être ou non stériles selon les cas [92].

● Nous remarquerons que :
- le cas de pseudohermaphrodisme mâle XXX, pourrait présenter d'autres anomalies n'ayant pas été détectées [91].
- l'un des étalon au caryotype XXY est stérile [78].

● Un test diagnostique basé sur l'utilisation de marqueurs microsatellites a été récemment mis au point afin de révéler la présence d'anomalies du nombre des gonosomes [61]. Le test est effectué sur des familles constituées d'un poulain et de ses deux géniteurs. Ainsi, 17471 familles ont été testées, et ont permis de mettre en évidence 13 poulains de caryotype XO, 4 poulains de caryotype XXY et 1 poulain de caryotype XXX [60]. Aucune étude morphologique et/ou anatomique n'a été réalisée.

La prévalence des cas de caryotype XO, XXY et XXX a ainsi été estimée respectivement à 0,15%, 0,02 % et 0,01 % . Néanmoins, l'utilisation d'un seul marqueur microsatellite comme « sentinelle » pour détecter ces cas (marqueurs LEX003 porté par le chromosome X), sous estime vraissemblablement ces prévalences [61].

L'utilisation de ces microsatellites présente pour avantage d'indiquer l'origine parentale des gonosomes. Ainsi, dans les cas de monosomie X, le gonosome a préférentiellement une origine maternelle (13 cas sur 14). Pour les cas de caryotype XXY, les chromosomes X sont soit d'origine exclusivement maternelle (2 cas), soit d'origine maternelle et paternelle (2 cas). Enfin pour les cas de caryotype XXX, les gonosomes proviennent de chacun des deux parents [61]. Ces données concorderaient avec ce qui est décrit chez l'Homme. Ainsi, pour 74 % des patients de caryotype XO le gonosome X est d'origine maternelle tandis que pour les patients au caryotype XXY, la non-disjonction chromosomique peut aussi bien être d'origine maternelle que paternelle (même probabilité) [*in* 61].

	CARYOTYPE	TYPE D'ANOMALIE PHENOTYPIQUE	REFERENCES
Absence de Y	**XO**	Hypogonadisme	[18] [20] [21] [24] [29] [33] [41] [54] [55] [76] [86]
	XXX	Normal ou Hypogonadisme	[24] [29] [77] [91] [107]
		Pseudohermaphrodite mâle	[91]
Présence de Y	**XXY**	Phénotype comportemental et morphologique normal d'étalon. Stérilité associée pour [78]	[70] [78]
	XXXY	Pseudohermaphrodite mâle	[41]

Tableau 1: Aneuploïdies gonosomiques simples

B. LES ANEUPLOÏDIES GONOSOMIQUES AVEC PLUSIEURS POPULATIONS CELLULAIRES

● Un nombre important de cas de chevaux mosaïques sont recensés dans la littérature (tableaux 2, 3 et 4) et notamment ceux avec un caryotype XO/XX, qui se traduisent par un hypogonadisme. Certaines de ces juments restent partiellement fertiles [40].

● En l'absence de chromosome Y dans la garniture chromosomique, les juments présentent toute une infertilité, qui peut être associée à un hypogonadisme (ovaires atrophiés et appareil génital peu développé) pour les cas de caryotype XO/XX. En présence du chromosome Y, apparaissent un cas de stérilité chez un étalon et un cas de pseudohermaphrodisme mâle.

● Le cas d'hypogonadisme relaté par Stewart-Scott *et al.*[108], est une jument dont le caryotype (XO/XY) fait apparaître un chromosome Y de longueur anormalement augmentée. Malgré une population XY présente en majorité (80% des métaphases examinées), il est intéressant de constater qu'elle présente des signes cliniques semblables au cas de juments XO, ce qui pourrait laisser suggérer la présence de remaniements chromosomiques importants du chromosome Y [108].

	CARYOTYPE	TYPE D'ANOMALIE PHENOTYPIQUE	REFERENCES
Absence de Y	**XO** /XX	Hypogonadisme	[24] [29] [54] [55] [67] [91] [92] [101] [107]
	XO / XXX	Grande taille. Infertile malgré ovulation (ovaires petite taille) et insémination.	[17]
	XX /XXX *	Ovaires atrophiés. Comportement sexuel normal et appareil génital normal	[40]
	XO /XX/XXX	Ovaires atrophiés. Absence d'œstrus.	[67]
Présence de Y	**XO** /XY	Hypogonadisme	[108]
	XO /XYY	PSH mâle	[52] [93]
	XO /XY/XX	- *(Cas cité non publié)*	[67]

Tableau 2 : Aneuploïdies gonosomiques avec plusieurs lignées cellulaires et motif de base XO *(XX pour un cas *)*.

	CARYOTYPE	TYPE D'ANOMALIE PHENOTYPIQUE	REFERENCES
Y en simple dose	**XXY** / XX	Pseudohermaphrodisme mâle	[14] [15]
	XXY / XX / XO?	Pseudohermaphrodisme mâle	[37]
Y en double dose	**XXY** / XY	Phénotype comportemental et morphologique normal d'étalon mais stérile.	[77]
	XXY / XY / XO	Pseudohermaphrodisme mâle	[37]
	XXY? / XY? / XX	Pseudohermaphrodisme mâle	[34]
	XXY / XY / XX / XO	Pseudohermaphrodisme mâle	[6] (considéré ultérieurement comme chimère XX/XY [7])

Tableau 3 : Aneuploïdies gonosomiques avec plusieurs lignées cellulaires et motif de base XXY.

● Il semble au vu de la présentation des cas qui est faite ici, que nous ayons affaire à un certain degré de développement mâle, dès lors que le chromosome Y est présent (en exceptant le cas d'hypogonadisme XO/XY précédemment mentionné où ce chromosome était remanié). Néanmoins, ceci reste à moduler en fonction des proportions relatives de chaque population cellulaire, qui peuvent varier en fonction du tissu analysé. Ainsi, par exemple, il a été suggéré, pour expliquer la faible proportion de cellules lymphoïdes sanguines XXY chez un cas de chimérisme XX/XXY, que cette triploïdie était défavorable à la multiplication lymphocytaire et produisait, du fait de son turn-over rapide, une sélection des cellules diploïdes. Cette sélection n'est pas retrouvée au sein des autres tissus, car ils présentent une multiplication cellulaire moins intense [98]. Ainsi, il convient de réaliser une analyse du caryotype sur une seconde population cellulaire (culture des fibroblastes en général), lorsque le caryotype issu des cultures lymphocytaires ne permet pas de comprendre la présentation clinique du cas [98].

● Une autre raison justifiant l'analyse du caryotype sur différentes populations cellulaires, est de permettre la distinction entre les cas de mosaïcisme et de chimérisme et d'avancer des hypothèses sur les mécanismes engendrant ces altérations. Quelques cas de chimérisme ont été décrits ([7] [35] [67] [98]). Contrairement aux cas des mosaïques, le chimérisme ne concernerait pas toutes les cellules de l'organisme mais uniquement les cellules sanguines [94]. Ce chimérisme sanguin serait liée à une anastomose vasculaire issue de la fusion des chorions lors d'une gestation gémellaire hétérosexuée. La gemellité reste relativement rare en espèce équine car elle est mal supportée [10]. D'autres mécanismes conduiraient également à l'apparition de « chimères », tels qu'une double fécondation (de l'ovocyte et du globule polaire secondaire [30]) ou encore la fusion de deux blastocytes. La myxoploïdie concernerait l'ensemble de l'organisme (rein, muscles, peau), pour peu qu'aucun phénomène de sélection ne se produise [7, 35, 98]. Malgré la réalisation d'examens complémentaires au caryotype tel que l'analyse cytologique (analyse morphologique des neutrophiles au caryotype XX) ou encore l'analyse sérologique (par utilisation d'agglutinine et d'hémolysine pour typer les marqueurs cellulaires érythrocytaires), la distinction

entre mosaïcisme et chimérisme reste donc difficile et certains cas apparemment mosaïques ont été considérés comme chimères après réalisation d'études complémentaires [6, 7]. C'est pourquoi, dans un souci de clarté, nous avons exclu de ce travail, la recherche des mécanismes mis en cause dans l'apparition de myxoploïdie chez le cheval.

	CARYOTYPE	TYPE D'ANOMALIE PHENOTYPIQUE	REFERENCES
Absence de Y	**XXY** / XY / XX / XO et considéré chimère **XX/XY**	Croisé Clydestale/Percheron 4 ans Type Pseudohermaphrodisme mâle	[6] [7]
	Eventuelle Chimère XO/XY	Hermaphrodisme vrai	[35]
	Eventuelle Chimère XO/XX/XXX/XXY/XXXY/XXYY?	Dysgénésie gonadique (ovaires atrophiés) avec cycles irréguliers	[67]
	Chimère XX/XXY	Type Pseudohermaphrodisme mâle	[98]

Tableau 4 : Aneuploïdies gonosomiques rencontrés dans les cas de chimérisme.

C. LES EUPLOÏDIES GONOSOMIQUES AVEC PLUSIEURS POPULATIONS CELLULAIRES

Les cas de myxoploïdie avec euploïdie gonosomique sont peu fréquents dans la littérature (tableau 5). Les cas présentés correspondent tous à la présence simultanée d'une population cellulaire de type mâle XY et femelle XX.

Les myxoploïdies XX/XY résultent soit [32]:

- d'un échange de tissu hématopoïétique entre les co-jumeaux dizygotes hétérosexués pendant le développement utérin,
- d'une fertilisation dispermique d'un ovule et de son globule polaire ou de deux ovocytes suivi de leur fusion
- d'une succession de non-disjonctions mitotiques chez un zygote XY

CARYOTYPE	TYPE D'ANOMALIE PHENOTYPIQUE	REFERENCES
Chimère XY/XX	Hermaphrodite vrai	[35]
XY/XX	Grande taille, agressivité et petits ovaires *(Cas cité non publié)*	[67]
XY/XX	Hermaphrodite vrai	[85]

Tableau 5: Euploïdies gonosomiques avec myxoploïdie.

Un cas de myxoploïdie XY/XX avec délétion du long bras de l'un des chromosomes X des cellules XX a été décrit [43]. Il s'agit d'une jument de phénotype normal présentant pour seule anomalie un comportement agressif. Aucune analyse précise du chromosome Xdelq n'a été réalisée.

Vu le faible nombre de cas rapportés, nous nous garderons de supposer que ce type de myxoploïdie est associé préférentiellement à un état d'hermaphrodisme vrai.

Au cours de cette étude, nous nous sommes rendu compte de la difficulté qui existait parfois à établir et analyser le caryotype d'un cheval.

Ceci tient notamment du fait que cette espèce présente non seulement un nombre de chromosomes important (64 chromosomes), mais aussi du fait qu'il n'est pas si évident de distinguer le chromosome Y équin, des 18 autres paires d'autosomes acrocentriques [14] [30]. Divers outils, tels les colorations en bandes G et C rendent cependant plus aisée cette distinction [42].

D'autre part, les proportions relatives de chacune des populations cellulaires (lors de myxoploïdie) ne reflètent pas nécessairement la répartition présente in vivo [14]. En effet, il n'est pas exclu que se produise une sélection d'un type cellulaire particulier, au cours de la mise en culture pour obtenir le caryotype [14].

Ceci ne nous empêche pas toutefois de faire le constat de l'importante diversité des aberrations chromosomiques chez le cheval. L'anomalie la plus souvent rencontrée dans les dysgénésies gonadiques de la jument est la monosomie X , suivie par les cas de juments présentant un caryotype XY [16]. Ces cas, dits de réversion du sexe, conduisent naturellement à rechercher les anomalies à l'échelle du gène.

III. ETUDE GENETIQUE DES ETATS INTERSEXUES

La réversion du sexe est définie comme étant une anomalie congénitale caractérisée par une incohérence entre le sexe chromosomique et son expression phénotypique [113]. On retrouve ainsi :

-l'expression d'un phénotype mâle en présence d'un caryotype XX (XXSR)

-l'expression d'un phénotype femelle en présence d'un caryotype XY (XYSR)

Le département d'obstétrique et de gynécologie de l'université du Wisconsin a recensé durant 18 années, pas moins de 317 cas de juments XY et 86 cas de chevaux mâles XX [65]. Parmis les 290 cas de juments avec réversion du sexe XY ayant fait l'objet d'analyses chromosomiques détaillées, 90% d'entre elles ont montré une délétion de la partie du chromosome Y portant le gène *SRY* (les 10% restant présentant une délétion n'affectant pas le gène *SRY*). De même 69 cas de chevaux avec réversion du sexe XX ont fait l'objet d'analyses complémentaires et 88% de ces cas ont présenté une séquence du chromosome Y transloqué sur le chromosome X. L'incidence élevée des réversions du sexe chez le cheval serait due à la présence de points chauds de recombinaison au voisinage du gène *SRY* [65]. Bien que prédominant, les remaniements chromosomiques entre les chromosomes X et Y n'expliquent pas tous les cas de réversion du sexe détéctés.

A. LES REVERSIONS DU SEXE XY

1. Classification des cas XYSR

Les cas de réversion du sexe XY (tableau 6) sont les cas d'aberrations chromosomiques les plus fréquemment rencontrés après les cas de monosomie X [17]. Il faut tenir compte d'ailleurs, qu'un nombre non négligeable de ces cas demeure non détecté [77]. En effet, l'expression phénotypique est très variable, pouvant être réduite parfois à une expression clinique semblable à la monosomie X, c'est à dire une simple dysgénésie gonadique [77].

Ainsi, l'étude de 38 cas de jument XYSR a permis de créer 4 catégories d'expression phénotypique différentes [64] :

Classe I : les femelles d'apparence normale (et parfois fertiles)

Classe II : les femelles avec dysgénésie gonadique mais un développement normal des dérivés mülleriens

Classe III : les femelles intersexuées avec dysgénésie gonadique et développement anormal des dérivés mülleriens.

Classe IV : les intersexués d'aspect mâle avec un taux de testostérone sérique élevé.

	Apparence générale	Gonades	Appareil génital interne	Références	Classe
PSH femelle	Apparence de femelle normale	Dysgénésie gonadique (ovaires de petite taille sans follicules)	Dérivés des canaux de Wolff jugés normaux	[2]* [19]* [30] [77] [97]	**II**
			Dérivés des canaux de Wolff jugés anormaux (atrophiés ou/et flasques)	[55] [92] [104] [107]* [110]	**III**
PSH mâle	Apparence de femelle normale	Dysgénésie gonadique (ovaires de petite taille sans follicules)	Présence d'un utérus et/ou d'un vagin borgne	[28] [66]	**IV**

Tableau 6 : Cas de réversion du sexe XY décrits dans la littérature.
*(*Cas non décrits dans les parties précédentes)*

Nous n'avons pas à notre connaissance de cas rapporté correspondant à la classe I. Il s'agirait des cas, qui de part l'absence d'anomalie relevée à l'examen, échappent à la réalisation de caryotype et donc demeureraient peut-être non détectés.

Pour les cas de pseudohermaphrodisme mâle XYSR les animaux sont capables de synthétiser de la testostérone à un taux plasmatique suffisamment important. Bien que le dosage n'ait été réalisé que pour l'un d'eux ([28]), cette synthèse a été supposée présente dans le second cas du fait du développement des dérivés wolffiens [66].

Les cas de réversions du sexe XY ont également été regroupés en fonction de la nature de la gonade et ont permis de distinguer deux catégories [29]:
- les cas présentant une gonade différenciée en testicule.
- les cas présentant une dysgénésie gonadique

2. Réversion du sexe XY avec insensibilité à la testostérone

Ces cas qui étaient autrefois dénommés « syndrome du testicule féminisant », sont relativement rares [73]. Deux d'entre eux ont été décrits dans la littérature [28] [66].

Ce syndrome est caractérisé chez le cheval par une insensibilité des tissus cibles à la testostérone et ses métabolites [28]. En effet, on observe une différenciation de la gonade en testicule et une synthèse de testostérone à des taux sériques compris dans les valeurs usuelles pour un mâle [28]. Les testicules sont présents en région abdominale ou inguinale [28] [73].

On observe ainsi, un cheval présentant un phénotype de type femelle du fait de l'absence de différenciation mâle de l'appareil génital externe. Par ailleurs, du fait de la synthèse de l'hormone antimüllérienne par les cellules de Leydig, il se produit une régression des dérivés des canaux de Müller [66]. C'est pourquoi les animaux affectés ont un appareil génital absent ou très peu développé [73]. On constatera également le développement d'un pseudovagin qui est un territoire insensible à l'action de l'hormone antimüllérienne [66].

Un gène porté par le chromosome X a été identifié comme étant responsable de cette anomalie [73]. Les animaux atteints étant stériles, la transmission ne peut s'effectuer que par les femelles [66].

Ce syndrome est également décrit chez l'homme, le rat et la souris. La seule différence clinique entre ces espèces et le cheval, concerne le comportement sexuel mâle, qui persiste chez ce dernier [28] [66].

3. Réversion du sexe XY avec dysgénésie gonadique

Ces cas correspondent à des chevaux de phénotype femelle, présentant un appareil reproducteur constitué d'un cervix flasque, d'un utérus normal voire parfois infantile et des ovaires atrophiés ou absents [32]. A l'exception d'un cas, toutes les femelles XYSR sont infertiles bien que certaines puissent présenter des cycles sexuels [32] [73]. Dans le cas de la jument XYSR ayant mis bas une pouliche (XX), l'hypothèse de la présence d'une lignée cellulaire cachée XO ou XX au sein des ovaires justifiant cette fertilité n'a pas pu être exclue [73] [104].

Cette réversion du sexe, est liée à l'absence de différenciation de la gonade primitive en testicule et impliquerait une défaillance des gènes déterminant le sexe [64]. C'est pourquoi, dans les cas les plus récents de jument XYSR, une recherche par PCR du gène *SRY* a été effectuée et s'est révélée pour les trois cas étudiés négative [2] [19] [77].

Plusieurs hypothèses ont alors été proposées [2] :
- une perte de gène durant une translocation entre les chromosomes X et Y
- une délétion de matériel du bras court du chromosome Y
- une translocation avec un autosome

Aucune modification de la structure du chromosome Y (après coloration CBG) n'est rapportée pour les cas précédemment cités [2] [19] [77].

Chez l'homme, certains cas de réversion du sexe XY seraient reliés à des mutations du gène *SRY* [94]. Aucune mutation de ce gène n'a pour l'heure été rapportée dans l'espèce équine. Néanmoins, l'analyse des pédigrees suggérerait la présence de différents modes de transmission suivant que l'anomalie provient du géniteur mâle ou femelle :

- les juments XY ayant reçues l'anomalie par la lignée maternelle. Cette anomalie peut correspondre soit à un allèle récessif porté par le chromosome X soit à un alllèle dominant porté par un autosome mais lié au sexe [63, 64].
- les juments XY ayant reçues l'anomalie par la lignée paternelle. Il s'agit soit d'un allèle dominant porté par un autosome et lié au sexe (le père ayant un mosaïcisme gonadique avec production de gamètes porteuses de l'allèle délétère), soit d'une mutation génétique d'un gène du chromosome Y avec pénétrance variable [2, 63, 64].

L'hypothèse d'une délétion d'une portion très réduite du chromosome contenant le gène *SRY* a été de nouveau émise récemment [19]. Afin, d'écarter la possibilité qu'une mutation du gène *SRY* puisse entraîner un défaut d'amplification lors de la réalisation des PCR, deux paires d'amorces différentes ont été utilisées et ont permis de confirmer l'absence de ce gène. De plus, une amplification de la séquence du gène *ZFY*, situé distalement au gène *SRY* par rapport au centromère, a été obtenue. L'hypothèse d'une double translocation entre les chromosomes X et Y a été avancée. Ainsi, lors de la réalisation de la spermatogenèse chez l'étalon, se produirait [19] :
- une translocation située entre les locus des gènes *ZFY* et *SRY*
- une translocation située entre *SRY* et le centromère.

Ces deux hypothèses, de mutation et de microdélétion, ne s'excluent pas mutuellement et les deux phénomènes ont ainsi été identifiés conjointement chez l'homme [94].

Dans l'hypothèse où se produise une translocation de la séquence SRY sur un chromosome autre que le chromosome Y, nous pouvons nous demander, si celle-ci ne pouvait pas entraîner à son tour une réversion du sexe pour les chevaux de caryotype XX ayant hérité du chromosome X ou de l'autosome modifié.

B. LES REVERSIONS DU SEXE XX

1. Expression phénotypique

Les réversions du sexe XX sont décrites chez plusieurs espèces de Mammifères : homme, souris, chèvre, porc, chien et cheval [89].

Il existe une importante variation phénotypique des cas, avec des degrés de masculinisation très variables. Ceci est fonction de la quantité de tissu testiculaire sécrétant la testostérone et expliquerait en partie pourquoi la masculinisation reste incomplète chez le cheval [22] [87].

A l'instar de ce qui a été réalisé chez l'homme, il est possible de classer ces cas en trois catégories [22] :

- les chevaux mâles XX qui sont des testicules de petite taille et généralement non descendus. Ils ne sont pas fertiles et ont une libido réduite.
- les chevaux pseudohermaphrodites mâles XX, qui est la forme intersexuée la plus fréquente. Ils présentent des testicules inactifs en position abdominale ou inguinale, un clitoris hypertrophié et un comportement de mâle (cas rapportés : [13] [22] [23] [26] [39] [88] [94]).
- les vrais hermaphrodites XX qui correspondent à un phénotype femelle avec la présence des deux types de gonades, une hypertrophie clitoridienne et éventuellement un comportement masculin (cas rapportés : [22] [87] [105]).

Il est par ailleurs important de reconnaître que les mâles XX peuvent être des chevaux de phénotype mâle normal avec une éventuelle cryptorchidie associée ou encore des testicules atrophiés [26].

2. Physiopathologie

Le mécanisme génétique exact par lequel se produit la différenciation de la gonade primitive en testicule n'est pas connu à l'heure actuelle [87].

On retrouve de manière paradoxale, la présence de cornes utérines vestigiales associée à l'absence des autres dérivés müllériens. Il semble ainsi, que l'hormone antimüllérienne n'ait été sécrétée que durant certains moments de la période critique embryonnaire au cours de laquelle se produit normalement la régression des canaux de Müller [87].

De la même manière, alors que l'on n'observe qu'un développement partiel de certaines structures androgénodépendantes (à l'origine d'hypospadias et de vagin clos), le développement de pénis hypoplasiques démontre la présence et la capacité de réaction à la testostérone et son métabolite, la dihydrotestostérone. La capacité de sécrétion de testostérone par le testicule à la puberté est également démontrée par les analyses réalisées après stimulation à l'hCG [87].

Il semble donc que se produisent à l'état embryonnaire une sécrétion insuffisante d'hormone antimüllérienne et de testostérone et/ou une synchronisation inappropriée de ces sécrétions au regard des périodes critiques de sensibilité des tissus cibles. Ainsi, ces anomalies phénotypiques de réversion du sexe, peuvent être attribuées à une anomalie du développement gonadique [87].

3. Etiologie

● Face à ce tableau clinique, il semble évident de supposer qu'une partie du matériel génétique du chromosome Y (comprenant le gène *SRY*) puisse être transféré au chromosome X durant la spermatogenèse du mâle [22]. C'est en effet, ce que l'on retrouve pour 90% et 100 % des cas de réversion du sexe XX chez respectivement l'homme et la souris [87].

Il n'est d'ailleurs, pas exclu que cette translocation puisse chez les chevaux concerner un autosome [88].

Les degrés variables de différenciation testiculaire pourraient alors s'expliquer par [88] :

- une inactivation sélective du chromosome X ayant subi une translocation de la séquence du chromosome Y portant le gène *SRY*
- une inhibition variable de l'expression du gène *SRY* transloqué au voisinage de gènes régulateurs du chromosome X (ou d'un autosome).
- une mutation de la séquence du gène *SRY* survenant lors de la translocation et responsable d'une pénétrance variable.

Chez l'homme néanmoins, la majorité des vrais hermaphrodites sont porteurs du caryotype XX avec un test SRY négatif [89]. Les cas de réversion du sexe XX équins qui ont fait l'objet d'une recherche par PCR du gène *SRY* se sont tous révélés négatifs quand bien même il ne s'agissait pas de vrais hermaphrodites [22] [87] [113]. Ainsi, bien que l'hypothèse d'un échange génétique entre les gonosomes soit la plus probable à l'heure actuelle, nous sommes amenés à considérer d'autres hypothèses [88].

● On peut supposer l'intervention de mutation de gènes portés par les autosomes ou le chromosome X qui produiraient une différenciation testiculaire mâle en l'absence de *SRY* [22].

C'est ainsi que les études de réversions du sexe XX SRY négatif chez l'homme ont montré que cette anomalie était héréditaire et correspondait à une mutation récessive d'un gène autosomal dont le produit remplace la fonction d'initiateur de SRY dans la cascade du déterminisme sexuel [22].

On a retrouvé de la même manière cette anomalie (transmise de manière récessive par voie autosomale) chez d'autres espèces comme le chien porc sans que ne puisse être établie qu'il s'agisse d'une mutation d'un seul gène ou d'un groupe de gènes [87] [89]. Des cas de réversion du sexe XX sont rencontrés également en espèce porcine et caprine [95, 111]. Chez le porc, cette intersexualité serait due à une mutation transmise au sein de lignée de Large White [95]. Chez la chèvre, l'intersexualité est liée à la présence d'un gène recessif situé près du gène dominant « motte » (absence de corne) en région distale du chromosome 1 [111].

Si cette transmission était également chez les chevaux de type autosomale récessive, seuls ceux porteurs de deux chromosomes mutés exprimeraient l'anomalie, ce qui permet donc de penser qu'une prévalence plus élevée serait retrouvée au sein des lignées de race pure [22] [87]. Afin de conforter cette hypothèse, il serait ainsi nécessaire de réaliser des études de pédigrees [22].

L'intersexualité équine est la conséquence d'anomalies chromosomiques (présence d'un nombre anormal de gonosomes au sein d'une population cellulaire ou de plusieurs populations cellulaires aux caryotypes différents) et génétiques (inversion du sexe fourni par rapport à celui des gonosomes).

L'utilisation de marqueurs microsatellites pour diagnostiquer les aberrations chromosomiques a été récemment proposée [61]. Ce test permet de quantifier et d'établir l'origine parentale des gonosomes. Néanmoins son utilisation pour un usage de routine s'avère difficile. En effet, celui-ci fait appel à un nombre important de réactions de PCR (40 loci identifiés au total en cas d'anomalie) qui plus est, doivent être réalisées également pour les deux géniteurs.

Les cas de réversion du sexe XY sont les plus fréquents après les cas de monosomie X. Ainsi, il pourrait être envisagé de mettre au point un test plus simple d'emploi pour mettre en évidence non seulement la présence du chromosome Y mais aussi et avant tout la présence du gène SRY, initiateur de la cascade du déterminisme sexuel mâle. Il serait ainsi intéressant d'évaluer au regard des particularités du chromosome Y équin, les moyens de détection actuellement disponibles.

Chapitre III

Etude du chromosome Y équin

Le caryotype du cheval est constitué de 64 chromosomes répartis en [32] :
- 13 paires de chromosomes méta et submétacentriques,
- 18 paires de chromosomes acrocentriques
- 1 paire de gonosome X et Y

Le chromosome Y équin présente une morphologie acrocentrique comme chez la Souris, et le Rat tandis que ceux de l'Homme, le Taureau, le Chien, le Chat et le Porc sont d'allure méta/submétacentrique [99].

Comme pour la plupart des Mammifères, le chromosome Y du cheval est le chromosome le plus petit et le plus atypique dans son organisation par rapport aux autres chromosomes [99]. En dépit des recherches actuellement menées pour cartographier le génome équin, ce gonosome n'a jusqu'à présent fait l'objet que d'un nombre restreint d'études. Celles-ci s'avèrent être néanmoins un préalable nécessaire pour étudier l'infertilité et les mécanismes de régulation du sexe chez les chevaux [99].

Le chromosome X aurait été l'homologue du chromosome Y avant que ce dernier ne soit progressivement modifié au cours de l'évolution [1, 80, 81, 116]. Ainsi, les chromosomes X et Y sont aujourd'hui morphologiquement et génétiquement très différents. La mise en évidence de leur appariement au cours de la méïose suggère la présence d'une portion homologue aux deux chromosomes [32]. Cette région qui a été dénommée région pseudoautosomique (PAR), se comporte de manière identique aux autosomes et est suceptible d'être affectées par des remaniements chromosomiques. Les régions PAR des chromosomes sexuels des différentes lignées de Mammifères sont ainsi issues des multiples phénomènes d'additions, délétions et réarrangements chromosomiques [80].

I. STRUCTURE DU CHROMOSOME Y

Le chromosome Y équin est long d'environ 45 à 50 Mb, ce qui représente 1,62% des 3000 Mb qui composent le génome équin. Il est constitué à l'instar des autres Mammifères, d'une grande partie d'hétérochromatine. La portion d'euchromatine qui correspond à la séquence des gènes codants serait longue de 15 Mb et s'étendrait distalement à la zone 1.3 du bras long du chromosome [99].

Il semblerait que la région pseudoautosomique (contenue dans la partie euchromatique du chromosome) soit localisée dans la partie terminale du bras long du chromosome Y. Le gène *AmelY* présent à la limite de la région pseudoautosomique chez plusieurs espèces de primates, chez les bovins, les porcs et les chevaux [*in* 99] est situé en région télomérique du chromosome (figure 8). Ceci conforterait l'hypothèse d'une localisation distale de la région pseudoautosomique, bien qu'une cartographie de plusieurs autres gènes soit nécessaire pour l'attester [99].

Un faible nombre de gènes a pu être identifié au sein de la région euchromatique du chromosome Y équin (figure 8). En comparant le positionnement des gènes entre les différentes espèces, nous pouvons nous rendre compte que le chromosome Y équin ressemble étroitement à celui du Porc. Pour ces deux espèces, nous retrouvons bien les gènes *ZFY* (Zinc Finger Proein Y-linked) et *AmelY* en position distale tandis que le gènes *SRY* et *JARID1D* (Jumonji AT-rich interactive domaine 1D) sont en position proximale (centromérique). De plus, nous retrouvons entre ces deux groupes de gènes, la succession dans un ordre presque similaire des loci *TSPY* (Testis Specific Protein Y encoded), *UTY* (Ubiquitously transcribed Tetratricopeptide repeat gene on the Y chromosome), *DDX3Y* (DeaD Box polypeptide 3 Y-linked) et *USP9Y* (Ubiquitin Specific Protease 9 gene on the Y). En dépit de ces quelques éléments, aucune véritable conservation dans le positionnement et l'ordre des génes étudiés n'est retrouvée entre les différentes espèces [99].

Nous avons recensé six gènes dont la séquence est disponible (au moins partiellement) pour notre étude. Ce sont les gènes *SRY* [121], *TSPY* (Testis Specific Protein Y encoded) [128], *ZFY* [129], *AmelY* [122], *SMCY* [124] et *AdlicanY* [131]. Les gènes *ZFY*, *AmelY* et *SMCY* présentent des séquences homologues portés par le chromosome X (respectivement *ZFX* [Zinc Finger Protein X-linked] [130], *AmelX* [123] et *SMCX* [Small Mouse cDNA on the X chromosome] [125]) [120].

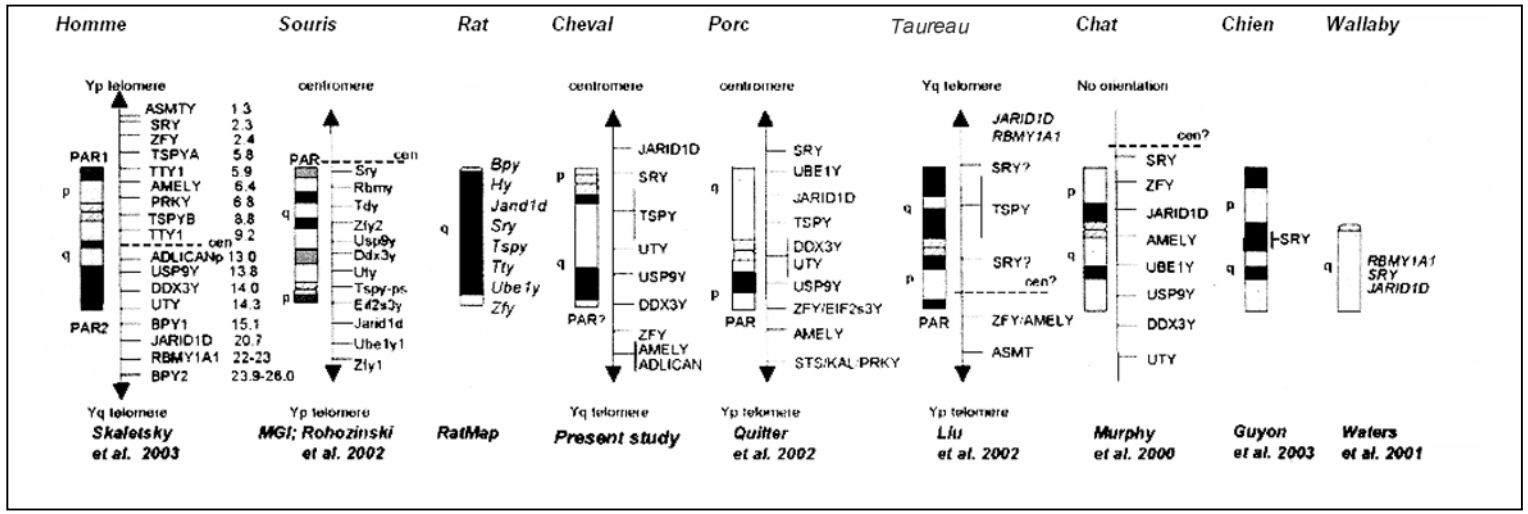


Figure 8 : Cartographie physique du chromosome Y de différentes espèces de Mammifère dont le cheval (modifié d'après [97]). L'ordre des loci en italique n'est pas déterminé**.**

II. MISE EN EVIDENCE DU CHROMOSOME Y

A. MISE EN EVIDENCE DIRECTE

La mise en évidence de la présence du chromosome Y passe par la réalisation du caryotype. Il permet également de mettre en évidence les anomalies qualitatives et quantitatives de tous les chromosomes [32].

Cette analyse présente plusieurs inconvénients parmi lesquels un long délai de réalisation (nécessité de mise en culture de cellule) et un manque de précision des résultats parfois observé. En effet, des artéfacts apparaissent parfois à la suite des étapes de mise en culture et de préparation des lames altérant l'interprétation des résultats [93].

Il est possible d'utiliser plusieurs techniques de coloration chromosomique parmi lesquelles la coloration en bandes G et C [32]. Cette coloration permet de détecter les remaniements chromosomiques de grande taille uniquement [93] Ceci s'avère ainsi insuffisant pour identifier des remaniements chromosomiques de tres petite taille et c'est pourquoi on a recours aux techniques de biologie moléculaire [93].

B. MISE EN EVIDENCE INDIRECTE

La présence du chromosome Y peut être certifiée de manière indirecte par la mise en évidence de :

- marqueurs cellulaires issus de l'expression de gènes portés par ce chromosome
- de séquences génétiques propres au chromosome Y.

1. Détection de l'antigène H-Y.

L'antigène H-Y est un antigène d'histocompatibilité mineur présent à la surface des membranes des cellules porteuses du chromosme Y. Cet antigène est issu de l'expression du gène *SMC* qui a bien été conservé au cours de 300 millions d'années d'évolution [100]. Ce gène qui intervient dans l'organisation tissulaire des gonades a fait l'objet d'un grand nombre d'étude dans les années 1980 [100].

Détecter la présence du chromosome Y par l'analyse des antigènes cellulaires ne présente pas d'intérêt majeur en comparaison des moyens de biologie moléculaire dont nous disposons actuellement.

2. Détection de gènes portés par le chromosome Y.

● L'utilisation de la PCR comme moyen de détection du chromosome Y présente plusieurs intérêts. Il s'agit effectivement d'une méthode rapide, fiable et particulièrement sensible.

Sa sensibilité est un avantage indéniable. En effet, il a été suggéré que certains cas de réversions du sexe XX puissent correspondre à des mosaïques XX/XY pour lesquels la détection de la population lymphocytaire XY n'avait pu être réalisée au moyen du caryotype (population lymphocytaire en majorité XX) [113]. Ainsi, l'utilisation de la PCR nous affranchirait des erreurs liées aux proportions parfois réduites de certaines populations cellulaires (lors de myxoploïdie) mais aussi des artéfacts liés à la réalisation même du caryotype (perte d'une population cellulaire au cours de la culture cellulaire).

● L'objet de cette étude est de définir les conditions expérimentales de PCR afin d'obtenir d'une part la détection du gène *SRY* et d'autre part la mise en évidence d'autres gènes portés par le chromosome Y afin d'attester de sa présence.

En effet, la mise en évidence du chromosome Y par PCR permettrait de détecter les cas de réversion du sexe XY SRY négatifs tels que ceux décrits dans la littérature [2]. De la même manière pourront être détectés les cas de réversion du sexe XX SRY positif qui, bien que n'ayant pas été décrits chez le cheval, sont rapportés chez d'autres espèces tel le chien [100]. Pour mettre en évidence l'existence du chromosome Y, il est ainsi nécessaire que soit recherchée la présence d'autres gènes portés par ce gonosome indépendamment de la présence ou non du gène *SRY*. Il faut donc déterminer les gènes utilisables pour identifier ce chromosome.

Ces gènes ne doivent pas être impliqués dans les phénomènes conduisant à la perte du gène *SRY*. Les hypothèses expliquant les réversions du sexe XY SRY négatif sont [2]:

- une perte d'un fragment du bras court du chromosome Y
- une translocation de plusieurs gènes entre gonosomes lors de leur appariement au cours de la première division méïotique (le chromosome Y déficient étant ensuite apporté lors de la fécondation).
- une translocation de SRY sur un autosome suivi de l'absence de cette autosome porteur de SRY dans le pool chromosomique après fécondation.

La région contenant le gène *SRY* présente comme particularité d'avoir un haut taux de recombinaison génétique [65]. Ainsi, parmi les cinq autres gènes portés par le chromosome Y et dont la séquence est disponible, nous pouvons exclure le gène *TSPY* qui est relativement proche de cette zone (figure 8).

Les conditions d'amplification des gènes *AmelY* [50, 111] et *ZFY* [19] ont été décrites dans la littérature. Nous avons fait le choix d'amplifier le gène *AmelY* qui présente comme avantage d'être plus éloigné de SRY que ne l'est le gène ZFY. Au cours des précédentes études, cinq cas de juments avec réversion du sexe XY SRY négative possédaient bien les gènes *AmelY* [50, 111] ou *ZFY* [19]. Il a ainsi été émis l'hypothèse que la délétion du gène *SRY* pouvait être causée par plusieurs translocations préservant les gènes situés distalement au locus *SRY* [19]. Néanmoins, la perte conjointe des gènes SRY et AmelY reste envisageable. C'est pourquoi, nous avons cherché à identifier un troisième gène pour révéler la présence du chromosome Y.

Le locus AdlicanY a été exclu du fait de sa proximité avec le gène AmelY (figure 8). Nous avons ainsi retenu pour cette étude le gène *SMCY* dont la localisation précise n'a pas encore été établie. Etant donné que des gènes homologues aux gènes *AmelY*, *ZFY* et *SMCY* sont retrouvés au sein du chromosome X [120], il semble probable que ces trois gènes soient regroupés au sein de la région pseudoautosomique du chromosome Y. Cette région s'étendant vraissemblablement distalement au locus *AmelY* [99], il est possible que le gène *SMCY* soit plus éloigné du locus *SRY* que ne l'est *AmelY*.

*Ainsi, conjointement à la réalisation de la PCR **SRY**, la présence du chromosome Y sera confirmée par l'amplification des séquences des gènes **AmelY** et **SMCY**. D'autre part, étant donné que la séquence des gènes AmelX et SMCX dépasse respectivement de 24 pb [123] et 18 pb [125] celle des gènes AmelY et SMCY, il peut être intéressant d'obtenir des contrôles internes d'amplification en réalisant les PCR **AmelX** et **SMCX**. Les conditions expérimentales précises du test diagnostique comprenant la mise en évidence de ces trois gènes et des contrôles internes restent ainsi à définir au cours de l' étude expérimentale.*

Etude Expérimentale

Chapitre I

Objectifs de l'étude expérimentale

I. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE L'ÉTUDE

Plusieurs étapes successives composent cette étude expérimentale :

- une étape de conception au cours de laquelle doivent être définies les séquences des amorces.
- une étape expérimentale au cours de laquelle seront réalisées les nombreuses PCR permettant d'évaluer la qualité (spécificité et sensiblité) des signaux obtenus et de définir les conditions optimales de réaction.
- une étape de mise au point du test diagnostique qui permettra de composer en fonction des résultats expérimentaux obtenus, un assortiment judicieux de réaction de PCR pour détecter différents gènes portés par le chromosome Y.

II. OBJECTIFS ET CONTRAINTES

A. L'ÉTAPE DE CONCEPTION

Le test diagnostique a pour objectif de mettre en évidence la présence des gènes *SRY*, *AmelY* et *SMCY* mais aussi *AmelX* et *SMCX* qui nous apporteront un contrôle interne de réaction pour certaines PCR. Un nombre important d'amorces seront ainsi définies. La qualité d'hybridation de ces amorces sera vérifiée, avant leur synthèse, par l'utilisation du logiciel Amplify® .

B. L'ÉTAPE EXPÉRIMENTALE

Les différentes amorces seront ensuite testées sur des extraits d'ADN de chevaux normaux mâles et femelles afin :

- d'évaluer le bon fonctionnement de nos couples d'amorces
- de définir les critères de sensibilité et de spécificité pour chacune des PCR.

Les conditions idéales de stringence (température d'hybridation des amorces et concentration en $MgCl_2$) des milieux réactonnels sont recherchées afin d'obtenir des signaux bien visibles et d'éliminer d'éventuelles amplifications non spécifiques.

Toutes les PCR comporteront un témoin négatif garant de l'absence de contaminants suceptibles de fausser les résultats.

C. L'ÉTAPE DE MISE AU POINT DU TEST DIAGNOSTIQUE

La mise au point du test diagnostique sera présentée en discussion de la partie expérimentale.

Le test diagnostique sera composé des PCR pour lesquelles les résultats seront apparus satisfaisants pour une interprétation. Ce test sera composé de contrôle d'extraction d'ADN (via l'amplification de séquence des gènes *AmelX* et/ou *SMCX*) et d'amplification (via l'amplification de témoins positifs). Enfin, chaque PCR présentera là encore un témoin négatif pour s'affranchir d'éventuelles contaminations.

Une fois ce test mis au point, nous étudierons les différentes interprétations possibles en fonction des résultats et évaluerons l'intérêt de la réalisation d'un tel test pour l'étude de l'intersexualité équine.

Chapitre II

Matériel et méthodes

I. MATERIEL

A. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les prélèvements sanguins sont obtenus à partir de chevaux présentés à la clinique équine de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon pour des affections ne portant pas sur l'appareil reproducteur et recrutés de manière totalement aléatoire.

Nous avons prélevé le sang (sur tube EDTA) de trois chevaux mâles et de deux juments.

En dépit de nos recherches et de nos contacts, aucun cheval présentant des troubles de la reproduction éventuellement compatibles avec une intersexualité, ne nous a été référé.

B. KITS D'EXTRACTION D'ADN

Nous avons utilisé au cours de cette étude, les kits d'extraction Nucleospin®Blood quick pure (laboratoire Macherey-Nagel) et papier Whatman® (laboratoire whatman) (annexes 7 et 8).

C. LES AMORCES DE PCR

1. Conception générale des amorces

a- Définition de la séquence

•Les amorces sont constituées d'une vingtaine de nucléotides et ont été définies à partir des séquences des gènes *SRY*, *AmelY*, *AmelX*, *SMCY* et *SMCX* (annexes 11, 12, 13, 14, 15).

•Leurs séquences ont été définies en s'assurant de la parfaite complémentarité avec la séquence cible bien qu'un défaut de complémentarité d'une ou deux paires de bases en milieu de séquence ne perturbe pas l'hybridation dans les conditions utilisées.

•La composition en bases est équilibrée en évitant les longues répétitions de cytosine et guanine bien que nous ayons favorisé la présence de ces nucléotides aux extrémités des amorces afin d'améliorer l'efficacité de l'hybridation [90].

b- Détermination des températures de fusion et d'hybridation

● Les températures de fusion sont calculées en fonction de la séquence nucléotidique : chaque base guanine et cytosine apporte 4°C, tandis que chaque base adénine et thymine apporte 2°C.

● La température d'hybridation est généralement de 5 à 10°C inférieure à la température de fusion moyenne des amorces.

c- Spécificité théorique des amorces

Nous avons utilisé lors de la conception des amorces, le logiciel Amplify® qui permet de vérifier la spécificité d'hybridation de nos amorces avec la séquence cible. Ceci ne garantit la spécificité des amorces que par rapport à la séquence du gène étudié et n'assure donc pas de l'absence d'éventuelles hybridations non désirées avec d'autres séquences du génome lors de la réalisation des PCR.

d- Taille du fragment amplifié

- Le couple d'amorces est choisi de telle sorte que les tailles des fragments amplifiés obtenus ne dépassent pas 1000 pb.

- Nous nous sommes également fixé la contrainte pour les gènes *SMC* et *Amel*, d'obtenir des fragments amplifiés différents pour X et Y par au moins 20 pb environ. Cette différence garantirait une lecture aisée des différentes bandes obtenues sur gel d'agarose.

2. Présentation des amorces

a- Amorces du gène *SRY*

- Ce gène code le facteur primordial d'initiation de la cascade du déterminisme sexuel des mammifères. Malgré de rares variations de séquence, il s'agit d'un gène phylogénétiquement bien conservé.

- Les séquences des amorces permettant d'amplifier spécifiquement le gène *SRY Equus caballus* ont été publiées par Meyers Wallen en 1997 [87] (tableau 7). La séquence du gène *SRY* mentionnée étant incomplète, il nous était impossible de retrouver le positionnement de l'amorce sens proposée. Nous avons ainsi recherché d'autres amorces SRY équines dans la littérature et repris les travaux de Hasegawa *et al.* [50].

Amorces SRY Meyers Wallen *Sens (Tm = 64°C)* *Antisens (Tm = 64°C)*	 5'- GTC AAG CGC CCC ATG AAT GC -3' 5'- CGT AGT CTC TGT GCC TCC TC -3'
Amorces SRY Hasegawa *et al.* *Sens (Tm = 84°C)* *Antisens (Tm = 82 °C)*	 5'- CTT AAG CTT CTG CTA TGT CCA GAG TAT CC -3' 5'- GCG GTT TGT CAC TTT TCT GTG GCA TCT T -3'

Tableau 7 : Amorces publiées pour amplifier une partie de la séquence du gène SRY [50 ;87].

Les amorces publiées par Hasegawa *et al.* ont des longueurs dépassant 25 nucléotides et de ce fait, des températures de fusion élevées. Ces températures supposeraient l'utilisation d'une température d'hybridation d'au moins 74 °C qui serait incompatible avec la température d'élongation de la Taq polymérase (72°C).

Nous avons ainsi redéfini à partir de ces séquences, deux amorces plus courtes compatibles avec une température d'hybridation voisine de 64°C : une amorce sens SRY s1 (Tm : 64°C) et une amorce antisens SRY as2(Tm : 66°C) permettant l'amplification d'un fragment de 420 pb de la séquence du chromosome Y (tableau 8).

Locus	*Amorces*	*Tm (°C)*	*Fragments amplifiés attendus en présence*	
			du chromosome X	*du chromosome Y*
SRY *equine* Y	**SRY s1** **SRY as2**	64 66	-	420 pb

Tableau 8 : Amorces utilisées pour amplifier une partie de la séquence du gène SRY.

Les essais de PCR réalisés à partir du logiciel Amplify® atteste de la parfaite complémentarité des amorces avec la séquence cible (figure 9).

```
Fragment of length 422 (including primers)

Left Primer: SRY  s1     Right Primer:  SRY  as2
Target sequence 113 to 489     GC content = 50.7%

Weight = 5      (2, 5)



Primer: SRY  s1
--------------------
Primability of Match = 100%
  Stability of Match =  73%

                      5'                      3'
                       CTTCTGCTATGTCCAGAGTATC
                       |||||||||||||||||||||
cctcttcaacggtgccatcttaagcttctgctatgtccagagtatccaacagcgataattacagtctagc
                       |                      |
                      92                     113


Primer:  SRY  as2
--------------------
Primability of Match = 100%
  Stability of Match =  72%

                     489                     511
                       |                      |
tatcgacctcgtcggaaggccaagatgccacagaaaagtgacaaaccgcttccgcagactcctcttctac
                       |||||||||||||||||||||
                       GATGCCACAGAAAAGTGACAAAC
                     3'                      5'
```

Figure 9 : Résultats théoriques de la PCR avec le logiciel Amplify® : amorces SRY s1/SRY as2 et séquence du gène SRY.

b- Amorces du gène *Amel*

Des amorces amplifiant une séquence du gène *Amel* bovin étaient disponibles au laboratoire. Ces amorces ont été définies à partir des travaux de Ennis *et al.* [36]. Nous avons comparé les séquences de ces amorces (tableau 9) avec celle du gène *Amel* équin. La séquence de l'amorce antisens définie par Ennis *et al*.[36] est complémentaire de la séquence du gène *Amel* équin. Ainsi, nous avons utilisé cette amorce dans notre étude et l'avons nommée Amel as2.

Nous avons repris les travaux de Hasegawa *et al*.[50] (*tableau 9*) pour définir une amorce sens utilisable avec notre amorce Amel as2. L'amorce sens publiée présente une température moyenne de fusion trop élevée, ce qui nous a conduit à raccourcir sa séquence tel que nous l'avons fait pour les amorces du gène *SRY*. Il s'agit de l'amorce Amel s1.

Amorces Amel d'ENNIS et al. *Sens (Tm = 62 °C)* *Antisens (Tm = 70 °C)*	 5'- CAG CCA AAC CTC CCT CTG C -3' 5'- CCC GCT TGG TCT TGT CTG TTG C -3'
Amorce Amel d'Hasegawa et al *Sens (Tm = 96°C)* *Antisens (Tm = 96°C)*	 5'- CCA ACC CAA CAC CAC CAG CCA AAC CTC CCT -3' 5'- AGC ATA GGG GGC AAG GGC TGC AAG GGC AAT -3'

Tableau 9 : Amorces publiées pour amplifier une partie de la séquence du gène Amel [36 ;50].

Nous obtenons ainsi les amorces Amel s1 (Tm = 68°C) et Amel as2 (Tm = 70°C) amplifiant un fragment de 197 pb provenant du chromosome Y et un fragment de 221 pb issu du chromosome X (*tableau 10*).

Locus	*Amorces*	*Tm (°C)*	*Amplifiats attendus en présence*	
			du chromosome X	*du chromosome Y*
Amel *equine* X / Y	**Amel s1** **Amel as2**	68 70	221 pb	197 pb

Tableau 10 : Amorces utilisées pour amplifier une partie de la séquence du gène Amel.

Nous avons également pu attester d'une bonne spécificité (théorique) des amorces mises au point (figure 10).

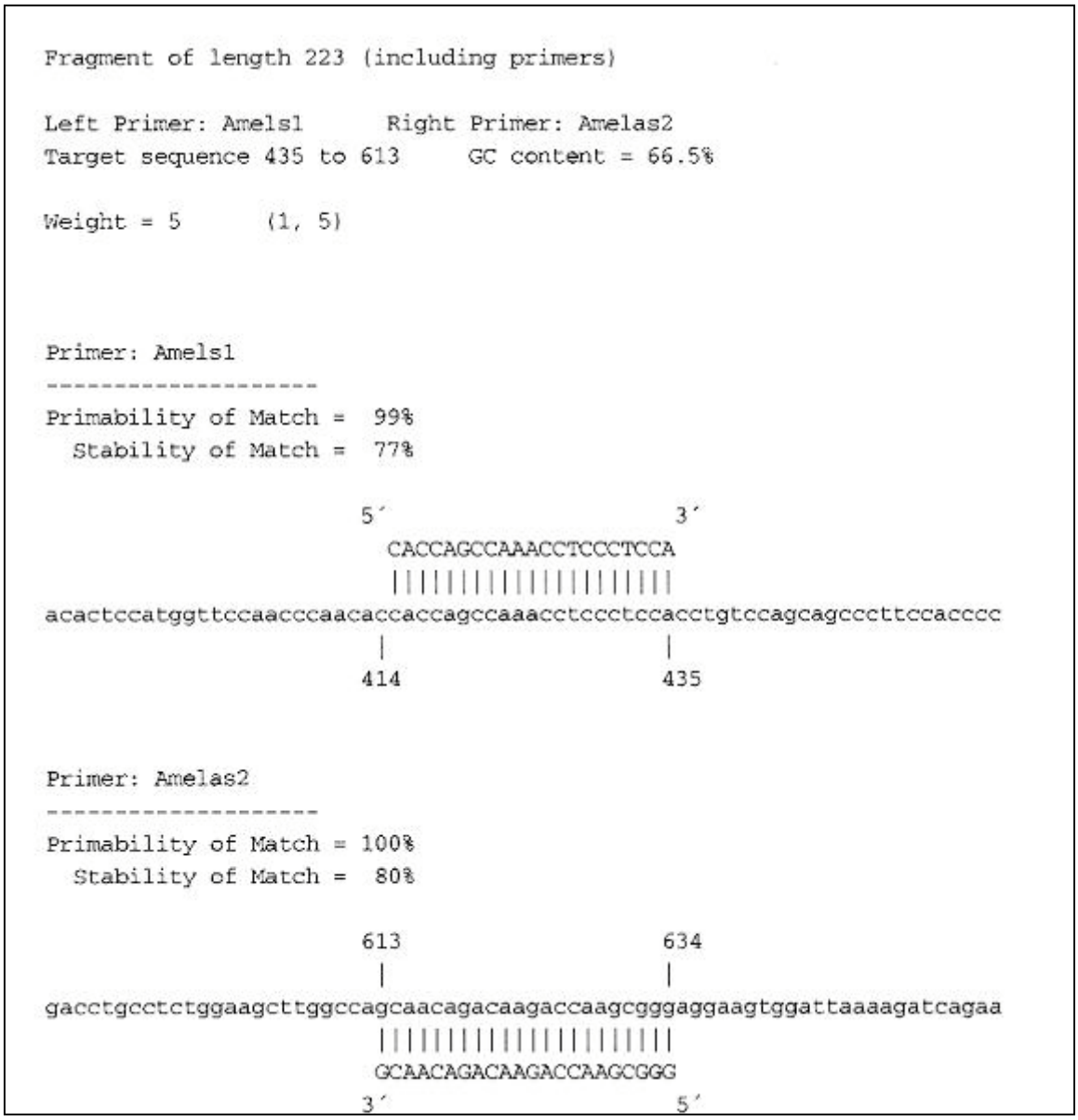


Figure 10 : Résultats théoriques de la PCR avec le logiciel Amplify® : amorces Amel s1/Amel as2 et séquence du gène Amel.

c- Amorces du gène *SMC*

Le gène *SMC* étant présent sur les deux gonosomes, nous avons nommé SMCX, le locus de ce gène sur le chromosome X, et SMCY le locus sur le chromosome Y.

Afin de différencier aisément les amorces s'hybridant spécifiquement à une séquence de l'un des locus, le nom des amorces a été agrémenté de la lettre correspondant au chromosome X ou Y qui lui est associé. Lorsque l'amorce reconnaît une séquence commune à SMC X et SMC Y, la dénomination est dépourvue de ce caractère additionnel.

Pour définir nos amorces, nous avons comparé les séquences :
- ♥ du gène *SMCX* de la souris,
- ♥ du gène *SMCY* de l'homme
- ♥ des gènes *SMCX* et *SMCY* du cheval.

Les alignements de séquences obtenues en utilisant le logiciel McVector® (annexe 11) ont mis en évidence les zones consensus aux différentes espèces, c'est à dire les zones de forte stabilité interspécifique et donc probablement intraspécifique. Les amorces à définir devront donc être complémentaires des séquences consensus identifiées.

Un travail important a consisté à définir et tester plusieurs couples d'amorces. Nous retiendrons finalement pour la présentation de notre étude :
- ♣ deux amorces sens (SMC s1 et SMC s7) ainsi qu'une amorce antisens (SMC as2) pour amplifier SMCX et SMCY.
- ♣ un couple d'amorces (SMC Xs3 et SMC Xas4) pour amplifier spécifiquement SMCX.
- ♣ un couple d'amorces (SMC Ys5 et SMC Yas6) amplifiant spécifiquement SMCY.
- ♣ une amorce sens (SMC s9) *a priori* spécifique du chromosome X, qui associée à une amorce antisens adéquat, amplifierait SMCX.

Les longueurs des produits amplifiés obtenus sont variables en fonction des différentes combinaisons d'amorces testées (tableau 11).

Amorces antisens

Amorces sens	*Locus* SMC *équin* X / Y	Tm (°C)	**SMC as2** 64	**SMC Xas4** 64	**SMC Yas6** 68
	SMC s1	64	**X** = 356 pb **Y** = 338 pb	**X**= 317 pb	**Y** = 306 pb
	SMC Xs3	64	**X** = 60 pb	-	-
	SMC Ys5	64	**Y** = 52 pb	-	-
	SMC s7	68	**X** = 330 pb **Y** = 312 pb	**X** = 291 pb	**Y**= 280 pb
	SMC s9	66	**X** = 100 pb	**X** = 61 pb	-

Tableau 11 : Tailles des fragments amplifiés du gène SMC obtenus avec les différents couples d'amorces.

3. Conservation et préparation des solutions d'amorces

Les amorces sont commandées auprès du laboratoire Eurogentec. Elles sont fournies sous forme lyophilisée à reconstituer en solution.

Les amorces sont solubilisées en eau distillée ou en tampon TE jusqu'à l'obtention d'une solution mère de concentration égale à 0,5 mM. Cette solution mère est distribuée en plusieurs aliquots et permet l'obtention de solutions filles d'amorce à une concentration de 10 µM.

Ces aliquots limitent les phases de congélation et décongélation répétées de la solution mère et préservent donc la qualité des amorces.

D. CONTROLE INTERNE

Le contrôle interne est constitué par un couple d'amorces amplifiant une séquence génomique indépendamment du sexe. Il atteste à la fois de l'efficacité de l'extraction de l'ADN et de la bonne réalisation des PCR. L'absence de séquence du gène recherché ne peut être attestée que si les extraits sont dépourvus d'inhibiteurs de la Taq polymérase. L'uilisation d'un contrôle interne permet de confirmer l'absence de ces inhibiteurs.

La PCR SRY s1/SRY as2 ne bénéficie pas de contrôle interne. Néanmoins, l'absence d'inhibiteurs de la Taq polymérase est confirmée pour chaque extrait par la réalisation des PCR avec les différentes amorces Amel et SMC. Ceci nous dispense donc de contrôle interne pour la PCR SRY s1/SRY as2.

Les amorces des gènes *Amel* et *SMC* ont été définies afin de fournir un contrôle interne en amplifiant une séquence du chromosome X. L'utilisation de ces contrôles autorise ainsi, l'interprétation d'une absence d'amplification des séquences Amel Y et SMCY.

E. AUTRES MATÉRIELS DE PCR ET D'ANALYSE DES RÉSULTATS

1. Les réactifs.

Les réactifs sont décrits dans l'annexe 9.

2. Le thermocycleur

Le thermocycleur utilisé est un MWG-Biotech Primus 96.

3. Matériel d'analyse des produits amplifiés

- La migration des fragments est réalisée dans une cuve d'électrophorèse Mupid-2® fabriqué par le laboratoire Cosmo bio CO.
- Les fragments après migration sont visualisés au moyen d'une table à rayonnement ultraviolet puis photographiés avec un appareil photographique argentique de marque Polaroïd®.
- Enfin les photographies ont été numérisée (Scanner 2700J® de Hewlett Packard) puis traitée au moyen d'un logiciel de traitement d'image (Adobe PhotoDeluxe 3.0®).

II. METHODES

A. EXTRACTION D'ADN

1. Kit d'extraction Nucleospin®blood quickpure

L'extraction de l'ADN (annexe 7) fait intervenir une lyse des hématies et des leucocytes (porteurs du matériel génétique) ainsi qu'une dégradation des protéines susceptibles d'inhiber la Taq polymérase. L'ADN est alors adsorbé sur un gel de silice et subit plusieurs rinçages successifs afin d'être purifié. Il est finalement solubilisé par un éluant.

L'extrait ainsi préparé est conservé à - 20 °C.

2. Kit d'extraction papier Whatman®

Cette méthode d'extraction récemment mise au point, s'effectue au moyen d'un papier imprégné de diverses solutions réalisant après dépôt de sang, les réactions de lyse cellulaire et de dégradation enzymatique. L'ADN, ainsi adsorbé sur le papier, bénéficie d'une conservation de longue durée à température ambiante.

Le papier imprégné de quelques gouttes de sang est mis à sécher puis, est conservé dans un étui étanche à la lumière. Préalablement à la réalisation des PCR, un disque de 2mm de diamètre est prélevé puis traité afin de purifier l'ADN adsorbé (annexe 8).

B. REALISATION DES PCR

1. Le milieu réactionnel

a- Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel (annexe 10), couramment dénommé « mix », est constitué par une solution aqueuse tamponnée, de concentration en $MgCl_2$ définie et à laquelle on ajoute les différents réactifs nécessaires à la synthèse nucléotidique : des dNTP, ainsi que les amorces spécifiques à tester. Enfin l'enzyme assurant la polymérisation, la Taq polymérase, est incorporée dans le milieu.

La concentration de $MgCl_2$ est variable suivant les tests effectués en fonction du degré de stringence exigé. Elle a été fixée à 1mM, 1,5 mM ou 2 mM suivant les cas.

b- Addition des échantillons d'ADN

Nous incorporons à chaque milieu préparé 1 µl d'extrait d'ADN à partir du kit Nucleospin®. Pour les PCR, au cours desquelles nous avons testé le papier Whatman®, l'extrait correspond à un fragment du papier (disque de 2mm de diamètre), qui est directement incorporé après traitement au milieu réactionnel.

Les extraits d'ADN, sont les derniers composants incorporés au milieu réactionnel.

c- Réalisation du témoin négatif

Un témoin négatif, constitué par la substitution du volume d'extrait d'ADN par un même volume d'eau stérile, a été réalisé pour chacune des PCR afin de s'assurer de l'absence de contamination des milieux réactionnels.

2. Programmes d'amplification

La succession des cycles d'amplification s'effectue en suivant la programmation du thermocycleur définie par l'opérateur (tableau 12).

La température d'hybridation est un paramètre variable qui en plus d'avoir été calculée en fonction des amorces testées, a pu être modifiée selon le niveau de stringence désiré et la qualité des résultats obtenue.

Les PCR réalisées pour un couple d'amorces sont effectuées avec 40 cycles d'amplification. Néanmoins, lors de réalisation de PCR avec trois amorces testées simultanément, le nombre de cycles effectués est porté à 50.

3. Analyse des produits amplifiés

a- L'électrophorèse

♦ Préparation du gel d'électrophorèse

• Nous avons utilisé pour les fragments dépassant la centaine de paires de bases, un gel d'agarose à 3% ; pour ceux de plus petite taille, un gel en Nusieve® à 4%.

• La préparation du gel s'effectue par dissolution d'agarose ou de Nusieve® solide dans une solution de tampon TAE contenant du bromure d'éthidium (à 0,1 ou 0,5 µg/l suivant les cas) nécessaire à la révélation des fragments amplifiés.

Le gel obtenu est coulé dans un moule spécifique avec un « peigne » assurant la réalisation des puits où sont déposés les différents échantillons après amplification. Une fois solidifié, le gel est extrait du moule puis placé dans la solution tampon d'électrophorèse contenant une concentration finale de 0,1 ou 0,5µg/ml de bromure d'éthidium.

♦ Dépôts des échantillons et mise en route de l'électrophorèse

• Les produits amplifiés sont distribués dans les puits en suivant scrupuleusement l'ordre défini par un plan de dépôt. Pour chacun des puits, 9µl de milieu réactionnel sont déposés.

• Nous avons utilisé des solutions ladder permettant d'étalonner le gel et de définir la taille des fragments obtenus après leur migration.

De manière générale, un ladder 100 (avec double bande à 800 pb et coloré au bleu de bromophénol) a été utilisé pour les fragments de grande taille (taille supérieure à 100 pb) et un ladder 20 (avec double bande à 200 pb et coloré en orangé) a été utilisé pour les produits de petite taille.

• Un courant électrique continu de 100 V alimente la cuve et permet d'obtenir la migration en une trentaine de minutes.

b- Visualisation des fragments

Le gel d'électrophorèse est placé en chambre noire sous ultraviolet pour visualiser la migration des fragments qui apparaissent sous la forme de bandes fluorescentes orangées.

Une photographie de ce gel est réalisée afin d'être analysée ultérieurement.

c- Conservation

Les produits amplifiés obtenus sont contrôlés par électrophorèse puis conservés à - 20°C pour d'éventuels dépôts ultérieurs.

C. RESPECT DES BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE

L'ensemble des travaux menés au laboratoire fait l'objet d'un suivi rigoureux, avec un système d'archivage et de vérification des expériences entreprises, quotidiennement mis à jour.

Ces expériences sont réalisées par un personnel spécialisé en PCR et formé au respect des bonnes pratiques de laboratoire.

1. Définition du plan HACCP

La méthode HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point), entreprise au laboratoire, nous permet d'identifier les sources d'erreur et d'évaluer les méthodes préventives ou correctrices à apporter au cours des différentes étapes.

2. Définition du danger

La réalisation de la technique PCR est soumise au risque de contamination des milieux réactionnels.

En effet, les performances d'amplification sont telles, qu'une contamination accidentelle par un matériel génomique présent ne serait-ce que sous forme de particule en suspension dans l'air, peut entraîner une altération significative des résultats en créant des faux positifs.

3. Définition des points critiques

Les différentes étapes de la PCR (extraction d'ADN, préparation des milieux réactionnels, amplification, et révélation) ne sont pas tous autant sensibles au risque de contamination.

L'étape où l'on retrouve le plus de contaminants dans l'air ambiant est l'étape de révélation.

4. Plan de prévention des contaminations

a- Adaptation des locaux

♦ Principe de s é paration des secteurs

Chaque étape de la PCR est réalisée dans un local spécifique. Ainsi, le laboratoire présente un local d'extraction, un local de préparation des mélanges réactionnels, un local d'amplification et enfin un local d'analyse des produits amplifiés.

L'entrée dans le laboratoire exige le port d'une blouse blanche spécifique au service. Par ailleurs, l'étape critique de préparation des mélanges réactionnels bénéficie d'un sas spécifique où l'on opère un changement de blouse et de chaussures afin d'éviter les apports d'ADN du milieu extérieur.

♦ Principe de la marche en avant

Le passage d'une étape à l'autre se fait en suivant le principe de la marche en avant. Tout matériel biologique quittant un local ne peut revenir dans ce local ou dans le local précédent.

b- Prévention lors de la préparation du milieu réactionnel

♦ Préparations des réactifs en aliquots

Les réactifs sont préparés à l'avance sous forme d'aliquots à usage unique afin d'éviter les contaminations des solutions mères.

♦ Protocole de mélange des réactifs

Le mélange des réactifs se déroule selon un ordre bien précis sous une hotte aspirante à flux laminaire.

Ainsi, dans un premier temps sont mélangés ensembles les réactifs seuls puis, sont ajoutés en dernier lieu les extraits, une fois l'ensemble des milieux réactionnels prêts.

c- Prévention lors de la révélation des résultats

L'accès à la salle où sont révélés les résultats, est soumis à l'obligation du port d'une blouse spécifique à cet usage.

5. Contrôle des contaminations

Le contrôle des contaminations est fourni par le biais du témoin négatif qui est obtenu par remplacement des extraits d'ADN par un volume identique d'eau (stockée elle aussi sous forme d'aliquots stériles à usage unique).

Le témoin négatif doit, au cours de la préparation des mélanges, être réalisé en dernier lieu pour garantir la présence ou non de contamination survenue dans les manipulations préalables.

Chaque PCR testée (pour des amorces, une température d'hybridation et une concentration en $MgCl_2$ bien définies) contient un témoin négatif. Cependant, les résultats des témoins négatifs n'ont pas tous étés présentés afin d'assurer un gain de place sur les différentes figures, mais il n'en demeure pas moins, qu'ils ont été contrôlés, décrits et analysés dans les chapitres correspondants.

AMORCES	Température d'hybridation (en °C)	Concentration en $MgCl_2$ (en mmol/l)
Amel s1 / Amel as2	62	1,5 / 2
SRY s1/ SRY as2	59	1,5 / 2
SMC s1/ SMC as2	59	1 / 1,5 / 2
	60	1 / 1,5 / 2
SMC s1/ SMC Xas4	59	1,5 / 2
SMC s1/ SMC Yas6	59	1 / 1,5 / 2
	60	1 / 1,5 / 2
SMC Xs3/ SMC as2	59	1,5 / 2
SMC Ys5/ SMC as2	59	1 / 1,5 / 2
	60	1 / 1,5 / 2
SMC s7/ SMC as2	59	1,5 / 2
SMC s7/ SMC Yas6	59	1,5 / 2
SMC s9/ SMC as2	60	1,5 / 2
SMC s9 / SMC Yas6	60	1,5 / 2
SMC s9/ SMC Yas6/ SMC as2	60	1,5 / 2
SCM Xs3 / SMC Ys5 / SMC as2	58	1,5 / 2
	59	1,5 / 2
	60	1,5 / 2
SMC s9/ SMC Ys5/ SMC as2	58	1,5 / 2
	59	1,5 / 2
	60	1,5 / 2

Tableau 12 : Récapitulatif des conditions expérimentales testées pour chaque PCR.

AMORCES	Taille attendue pour X (en pb)	Taille attendue pour Y (en pb)
Amel s1 / Amel as2	221	197
SRY s1/ SRY as2	-	420
SMC s1/ SMC as2	356	338
SMC s1/ SMC Xas4	317	-
SMC s1/ SMC Yas6	-	306
SMC Xs3/ SMC as2	60	-
SMC Ys5/ SMC as2	-	52
SMC s7/ SMC as2	330	312
SMC s7/ SMC Yas6	-	280
SMC s9/ SMC as2	100	-
SMC s9 / SMC Yas6	-	-
SMC s9/ SMC Yas6/ SMC as2	100	-
SCM Xs3 / SMC Ys5 / SMC as2	60	52
SMC s9/ SMC Ys5/ SMC as2	100	52

Tableau 13 : Tableau récapitulatif de la taille des fragments attendus pour les différentes PCR.

Chapitre III

Résultats

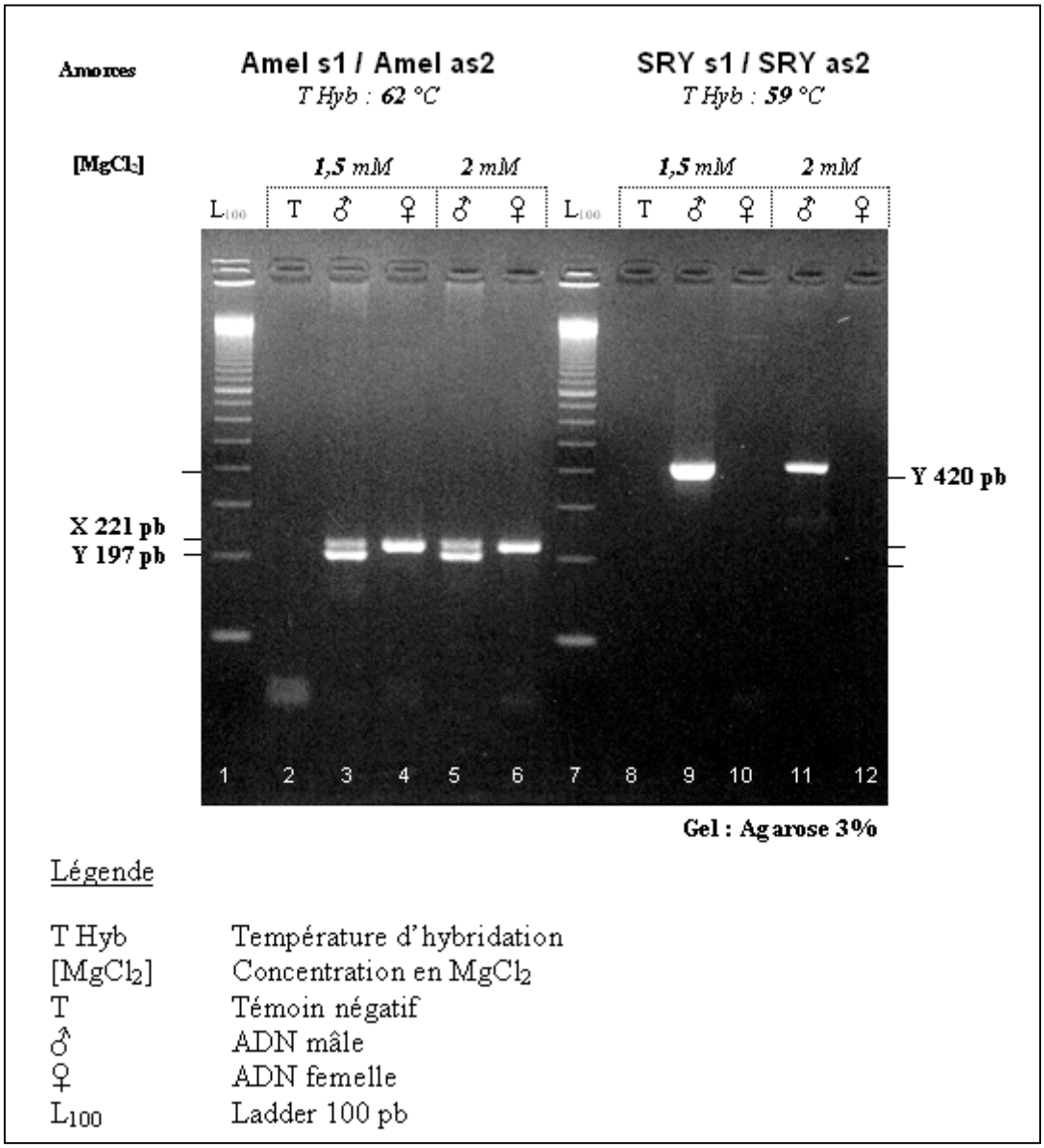


Figure 11 : Résultats des PCR Amel s1/Amel as2 et SRY s1/SRY as2.

Les différentes PCR ont été réalisées avec les prélèvements de trois chevaux mâles et de deux juments. Cependant, les résultats obtenus étant identiques pour tous les mâles et généralement pour les deux femelles, les figures incluses dans ce travail ne présenteront qu'un échantillon mâle et un échantillon femelle (exceptionnellement les deux échantillons femelles).

I. PCR CIBLANT LE LOCUS AMEL

1. Rappel des conditions expérimentales

- Le couple Amel s1/ Amel as2 est testé à la température d'hybridation de 62°C et une concentration en MgCl2 de 1,5 et 2 mM (tableau 12).
- Un fragment de 197 pb spécifique du chromosome Y et un fragment de 221 pb spécifique du chromosome X, sont attendus.

2. Signaux obtenus

- Le **témoin négatif** à 1,5 mM (figure 11, puits 2) présente une bande de très faible poids moléculaire (amorces). Un résultat identique a été retrouvé à la concentration de 2 mM de $MgCl_2$ (non montré).
- Pour les **femelles** (figure 11, puits 4 et 6), l'unique signal obtenu correspond au fragment amplifié de 221 pb du chromosome X.
- Nous obtenons pour les **extraits mâles** (figure 11, puits 3 et 5) deux signaux de taille voisine. L'un de ces signaux correspond au fragment de 197 pb caractérisant le chromosome Y. L'autre signal correspond au fragment de 221 pb caractérisant le chromosome X. Nous remarquons que lors de l'obtention des doubles bandes chez les mâles, le signal de 221 pb apparaît moins intense qu'il ne l'est chez les femelles.
- Aucune amplification non spécifique n'est visible.
- Quelle que soit la concentration en $MgCl_2$, nous obtenons des signaux de forte intensité.

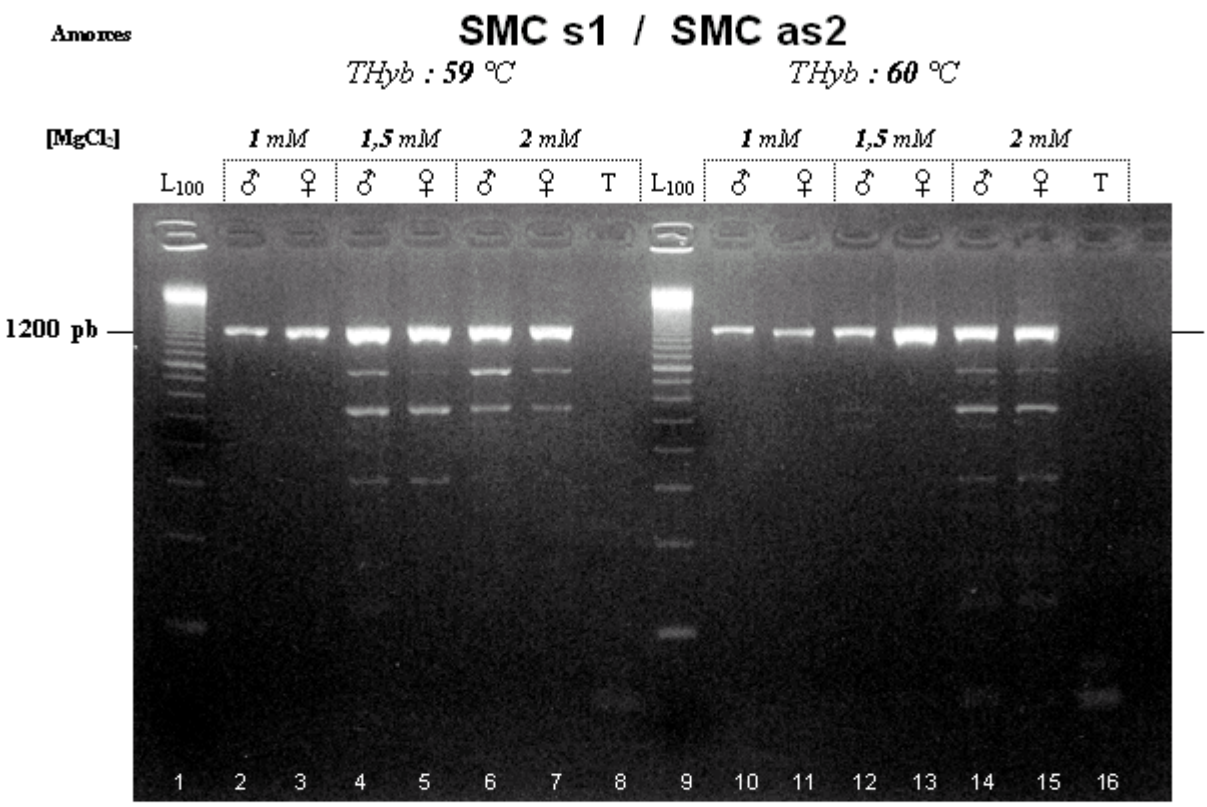
II. PCR CIBLANT LE LOCUS SRY

1. Rappel des conditions expérimentales

- Le couple d'amorces SRY s1/SRY as2 a été testé pour une température d'hybridation de 59°C et une concentration en $MgCl_2$ variant de 1,5 à 2 mM (tableau 12).
- Nous attendons l'amplification d'un fragment de 420 pb du chromosome Y.

2. Signaux obtenus

- Le **témoin négatif** (figure 11, puits 8) et **les extraits femelles** (figure 11, puits 10 et 12) ne présentent aucun signal.
- Les **extraits mâles** (figure 11, puits 9 et 11) présentent un seul signal de 420 pb.
- Le signal obtenu pour une concentration en $MgCl_2$ de 1,5 mM est bien plus intense que celui obtenu à 2 mM.
- Aucune amplification non spécifique n'est visible.



Légende

T Hyb	Température d'hybridation
[$MgCl_2$]	Concentration en $MgCl_2$
T	Témoin négatif
♂	ADN mâle
♀	ADN femelle
L_{100}	Ladder 100 pb

Figure 12 : Résultats des PCR SMC s1/SMC as2.

III. PCR CIBLANT LE LOCUS SMC

A. COUPLE D'AMORCES SMC S1/ SMC AS2

1. Rappel des conditions expérimentales

• Ce couple a été testé aux températures d'hybridation de 59 et 60°C, en faisant varier la concentration en $MgCl_2$ de 1 à 2 mM (tableau 12).

• Il devrait amplifier :
- un fragment de 338 pb caractéristique du chromosome Y
- un fragment de 356 pb caractéristique du chromosome X.

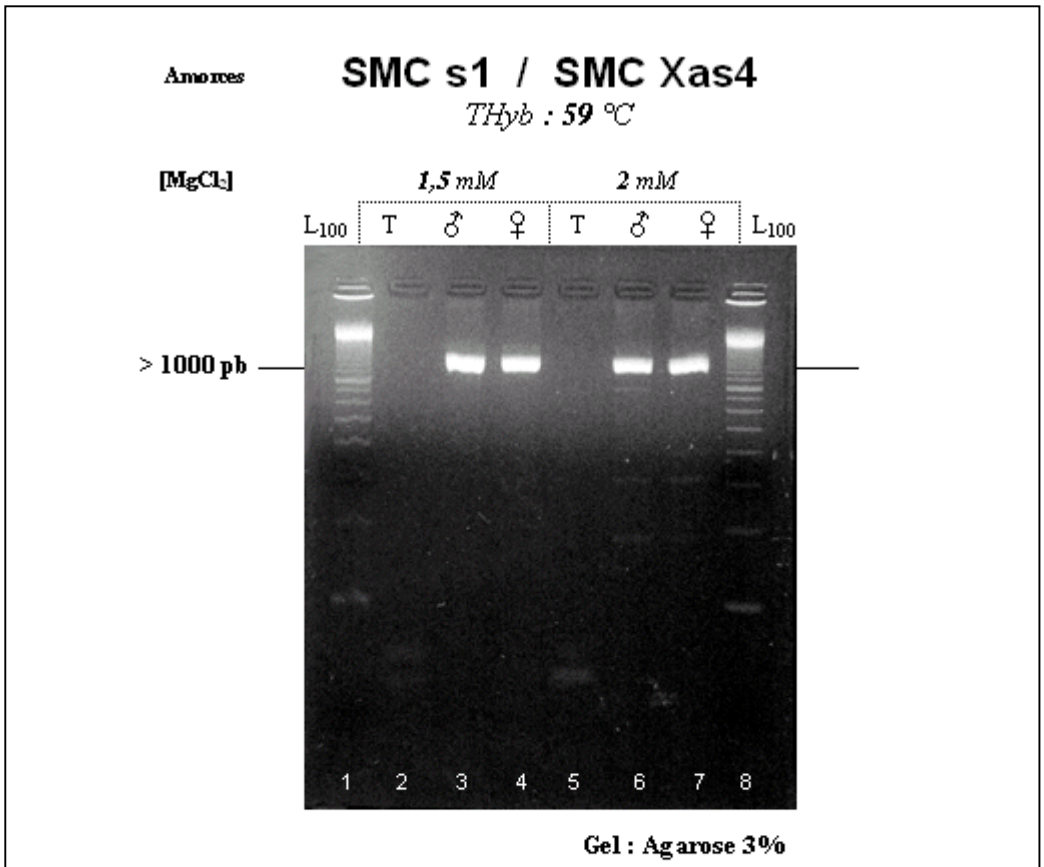
2. Signaux obtenus

• Les **témoins négatifs** (seuls ceux correspondant à 2 mM sont présentés figure 12 puits 8 et 16) présentent un léger signal correspondant à un fragment de faible taille (inférieure à 100 pb) compatible avec les amorces.

• Les **extraits mâles** (figure 12, puits 2, 4, 6 et 10, 12, 14) fournissent principalement un signal d'un fragment de taille supérieur à 1200 pb. Selon les conditions, deux ou trois autres signaux correspondant à des fragments de plus petite taille (entre 300 et 800 pb) peuvent apparaître.

• Les signaux observés chez les **femelles** (figure 12, puits 3, 5, 7 et 11, 13, 15) sont similaires à ceux observés précédemment chez les mâles.

• Tous les signaux obtenus sont non spécifiques.



Légende

T Hyb	Température d'hybridation
[$MgCl_2$]	Concentration en $MgCl_2$
T	Témoin négatif
♂	ADN mâle
♀	ADN femelle
L_{100}	Ladder 100 pb

Figure 13 : Résultats des PCR SMC s1/SMC Xas4.

B. COUPLE D'AMORCES SMC S1/ SMC XAS4

1. Rappel des conditions expérimentales

- La température d'hybridation a été fixée à 59°C. Nous avons testé des milieu à 1,5 et 2 mM de $MgCl_2$ (tableau 12).

- Ce couple d'amorces permet en théorie d'amplifier un fragment de 317 pb du chromosome X.

2. Signaux obtenus

- Les **témoins négatifs** (figure 13, puits 2 et 5) présentent un très léger signal (un peu plus marqué à 2 mM) d'un fragment de taille inférieure à 100 pb (amorces).
- Les **extraits mâles** (figure 13, puits 3 et 6) présentent un signal unique d'un fragment de haut poids moléculaire (supérieur à 1000 pb).
- Les **extraits femelles** (figure 13, puits 4 et 7) présentent un signal identique à celui des mâles.
- Quels que soient le sexe et la concentration en $MgCl_2$ imposée, le signal obtenu est de forte intensité mais non spécifique.

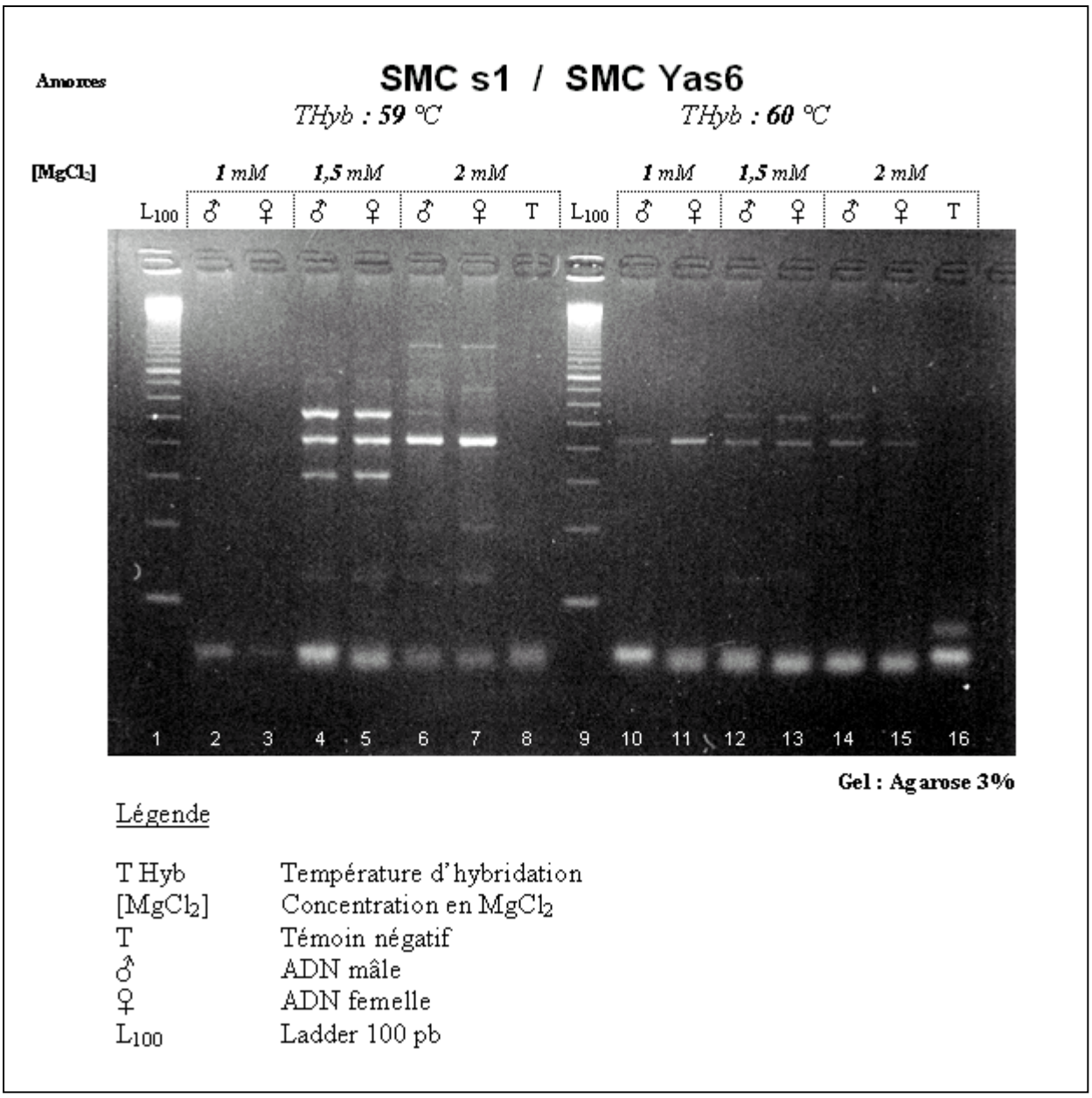


Figure 14 : Résultats des PCR SMC s1/SMC Yas6.

C. Couple d'amorces SMC s1/ SMC Yas6

1. Rappel des conditions expérimentales

- Ce couple d'amorces a été testé dans un premier temps à une température d'hybridation de 59°C puis dans un second temps de 60°C. La concentration en $MgCl_2$ varie de 1 à 2 mM (tableau 12).

- Ce couple d'amorces devrait amplifier un fragment de 306 pb du chromosome Y.

2. Signaux obtenus

- Les **témoins négatifs** (seuls ceux correspondant à une concentration de $MgCl_2$ de 2 mM ont été présentés figure 14, puits 8 et 16) présentent un signal de très faible poids moléculaire correspondant aux amorces (certaines se dimérisant à défaut de trouver une séquence cible).

- Chaque **extrait mâle** présente le même signal que celui qui est observé chez le témoin négatif.

A la température de 60°C, et pour une concentration en $MgCl_2$ de 1,5 et 2 mM, les extraits mâles (figure 14, puits 12 et 14) présentent deux signaux de 400 et 550 pb environ.

Lorsque à cette même température, nous diminuons la concentration à 1 mM, l'extrait (figure 14, puits 10) ne nous fournit plus que le signal voisin de 400 pb.

A la température de 59°C, et pour une concentration de 1 mM (figure 14, puits 2), aucun autre signal que celui de faible taille n'est observé.

Toujours à 59°C, nous observons pour une concentration à 1,5 mM (figure 14, puits 4) trois principaux signaux (taille voisine de 300, 400 et 550 pb) et pour une concentration de 2 mM (figure 12, puits 6) un seul signal principal (taille voisine de 400 pb) avec plusieurs autres signaux de très faible intensité régulièrement répartis sur le gel.

- Les résultats obtenus chez les **femelles** sont comparables en tout point aux résultats obtenus chez les mâles pour des conditions expérimentales identiques.

- Ce couple d'amorces amplifie ainsi de nombreuses séquences non spécifiques.

Le signal de 300 pb étant présent chez le mâle et la femelle (figure 14, puits 4 et 5), il ne peut en aucun cas correspondre au fragment attendu.

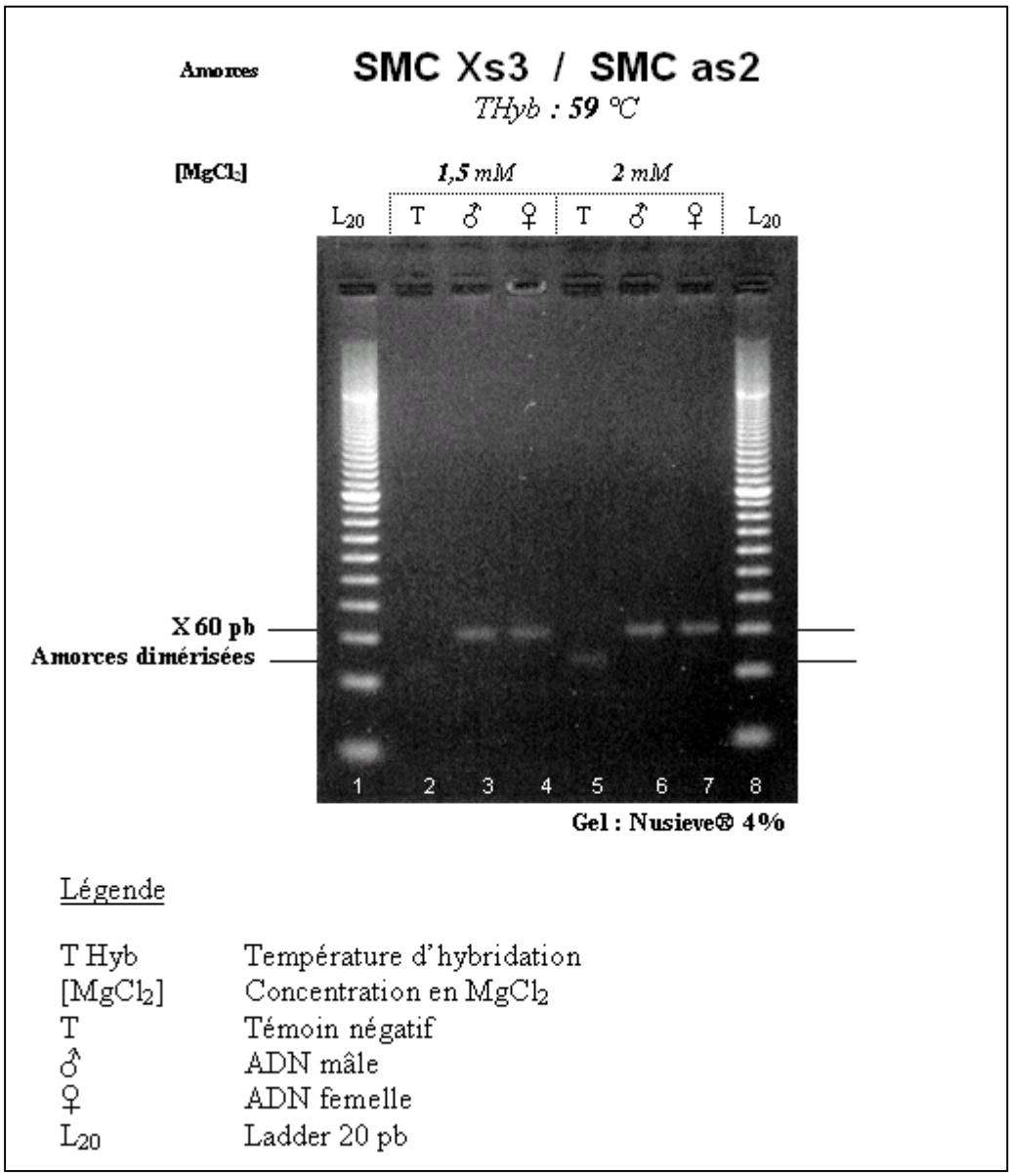


Figure 15 : Résultats des PCR SMC Xs3/SMC as2.

D. COUPLE D'AMORCES SMC XS3/ SMC AS2

1. Rappel des conditions expérimentales

L'amplification a été réalisée en fixant la température d'hybridation à 59°C et la concentration en $MgCl_2$ à 1,5 et 2 mM (tableau 12).

Un fragment de 60 pb de la séquence SMC porté par le chromosome X est attendu.

2. Signaux obtenus

- Les **témoins négatifs** (figure 15, puits 2 et 5) présentent un très léger signal à hauteur de 50 pb environ. Ce signal est plus intense à 2 mM (dimérisation d'amorce en absence de séquence cible).

- Les **extraits mâles** (figure 15, puits 3 et 6) fournissent un signal de 60 pb.

- Les **extraits femelles** (figure 15, puits 4 et 7) donnent un signal comparable à celui des mâles.

Remarques :

- A une même concentration, le niveau d'intensité du signal est identique chez le mâle et la femelle.

- L'intensité du signal pour une concentration en $MgCl_2$ de 1,5 mM est légèrement plus faible que celle du signal à 2 mM.

- Le signal observé concorde avec l'amplification d'un fragment de 60 pb du chromosome X. Par ailleurs, aucune bande non spécifique n'est visible.

Le couple SMC Xs3/ SMC as2 fonctionne correctement à 59°C et pour des concentrations en $MgCl_2$ de 1,5 et 2 mM.

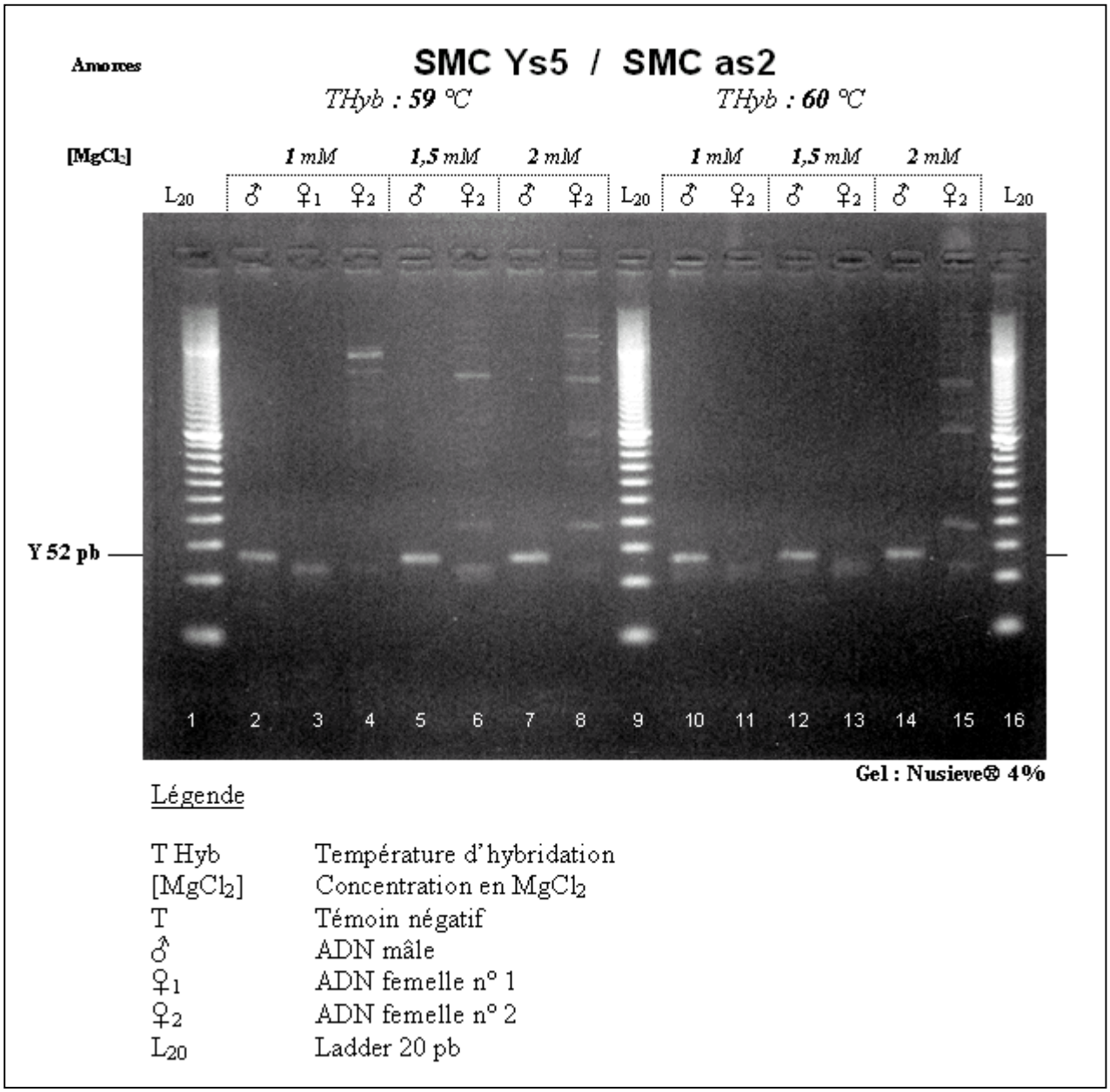


Figure 16 : Résultats des PCR SMC Ys5 / SMC as2.

E. Couple d'amorces SMC Ys5/ SMC as2

1. Rappel des conditions expérimentales

Ce couple d'amorces a été testé aux températures d'hybridation de 59 et 60°C pour une concentration en $MgCl_2$ variant de 1 à 2 mM (tableau 12).

Les résultats de PCR obtenus à partir des extraits de deux femelles différentes ont été présentés.

Ce couple d'amorces amplifie un fragment de 52 pb du chromosome Y.

2. Signaux obtenus

- Les **témoins négatifs** (non présentés en figure), ont tous un discret signal diffus à hauteur voisine de 50 pb (amorces).

- Les **extraits mâles** (figure 16, puits 2, 5, 7, 10, 12 et 14) présentent quelles que soit les conditions du milieu, un fragment nettement visible de 50 pb environ.

On constate également sous cette bande de 50 pb, la présence d'un discret signal diffus identique à celui présent chez les témoins négatifs.

- Pour les **extraits femelles**, nous constatons à 59°C et 1 mM, une différence de résultat entre les deux extraits de femelle ici présentés. En effet, alors que la femelle n°1 (figure 16, puits 3), ne présente qu'une unique bande diffuse voisine de 50 pb (semblable à celle des témoins négatifs), la femelle n°2 (figure 16, puits 4) présente plusieurs bandes réparties le long de la piste du gel.

En reprenant l'extrait de la femelle n°2 et en augmentant la concentration en $MgCl_2$ (figure 16, puits 6 et 8), nous observons et confirmons la présence de plusieurs signaux de tailles variables.

A la température d'hybridation de 60°C, ces bandes ne restent visibles qu'à une concentration de 2 mM (figure 16, puits 15). A une concentration en $MgCl_2$ de 1 (figure 16, puits 11) et 1,5 mM (figure 16, puits 13), seul persiste, le signal diffus semblable à celui des témoins négatifs (amorces).

Remarques :

- L'amplification de fragments de petite taille nous donne des signaux de faible intensité.

Le signal de 50 pb environ observé chez les mâles est un peu plus intense à 59°C et pour une concentration de 1,5 ou 2 mM. Dans les autres conditions, bien qu'atténué, il est tout à fait visible.

- Nous attendions le signal d'un fragment de 52 pb présent uniquement chez les mâles. Les signaux obtenus chez ceux-ci concorderaient bien avec nos prévisions.

A 59°C, nous constatons la présence de bandes non spécifiques pour la femelle n°2 (figure 16, puits 4, 6 et 8). Nous avons augmenté les conditions de stringence en portant la température d'hybridation à 60°C. A cette température, nous obtenons une extinction de la majorité des bandes non spécifiques aux concentrations de 1 (figure 16, puits 11) et 1,5 mM (figure 16, puits 13).

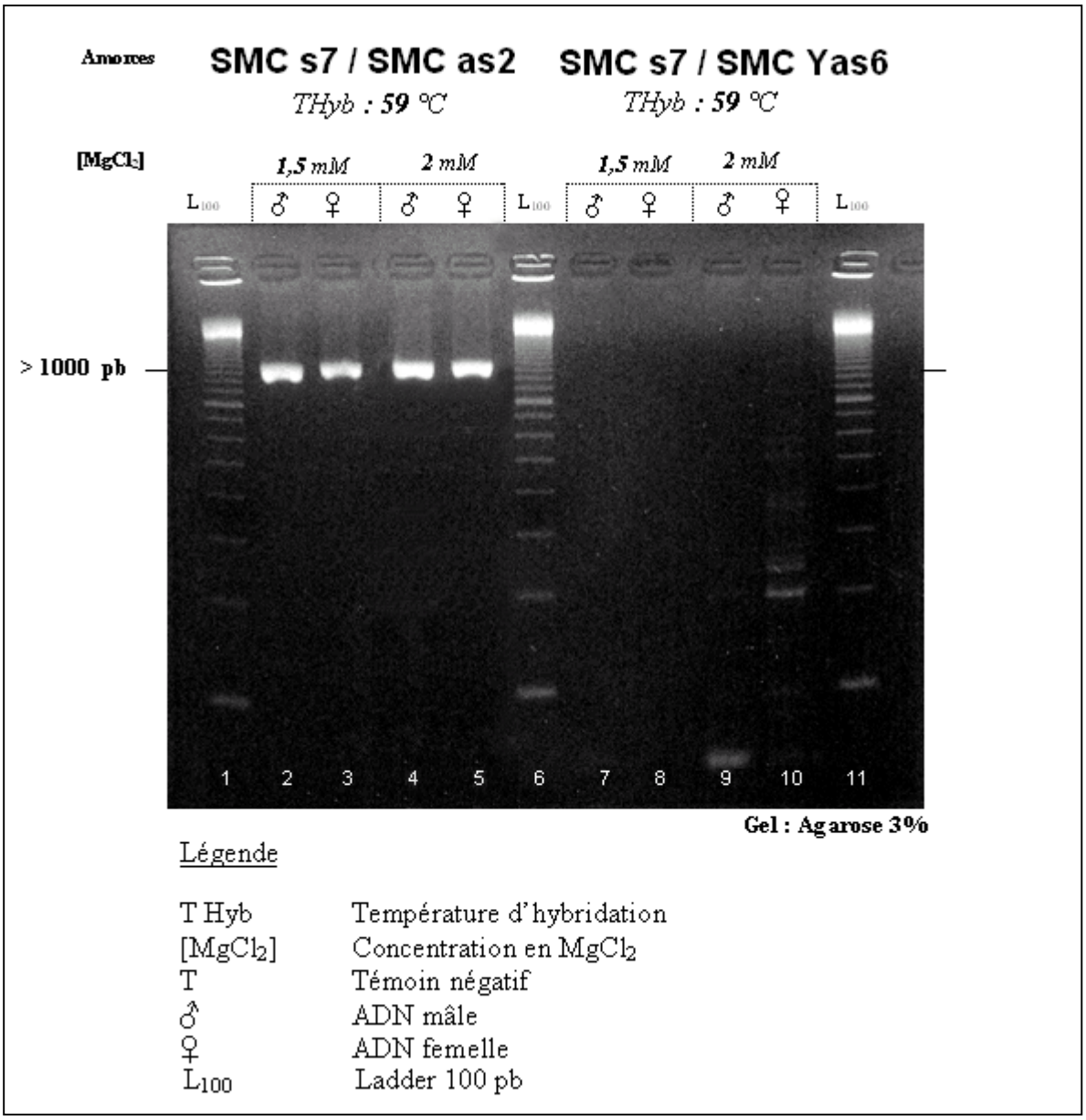


Figure 17 : Résultats des PCR SMC s7/ SMC as2 et SMC s7 / SMC Yas6.

F. Couple d'amorces SMC s7/ SMC as2

1. Rappel des conditions expérimentales

Ce couple a été testé à 59°C pour des concentrations de $MgCl_2$ de 1,5 et 2 mM (tableau 12).

Il devrait permettre d'amplifier une séquence de 330 pb du chromosome X et un fragment de 312 pb du chromosome Y.

2. Signaux obtenus

- Aucune amplification n'a été observée chez les **témoins négatifs** (non présentés).
- Pour les **extraits mâles** (figure 17, puits 2 et 4), nous observons la présence du signal d'un fragment de grand poids moléculaire (supérieur à 1000 pb).
- Le même signal est observé chez les **femelles** (figure 17, puits 3 et 5).

Ce signal intense de haut poids moléculaire ne semble pas varier avec les conditions du milieu et correspond à une amplification non spécifique par ce couple d'amorces.

G. Couple d'amorces SMC s7/ SMC Yas6

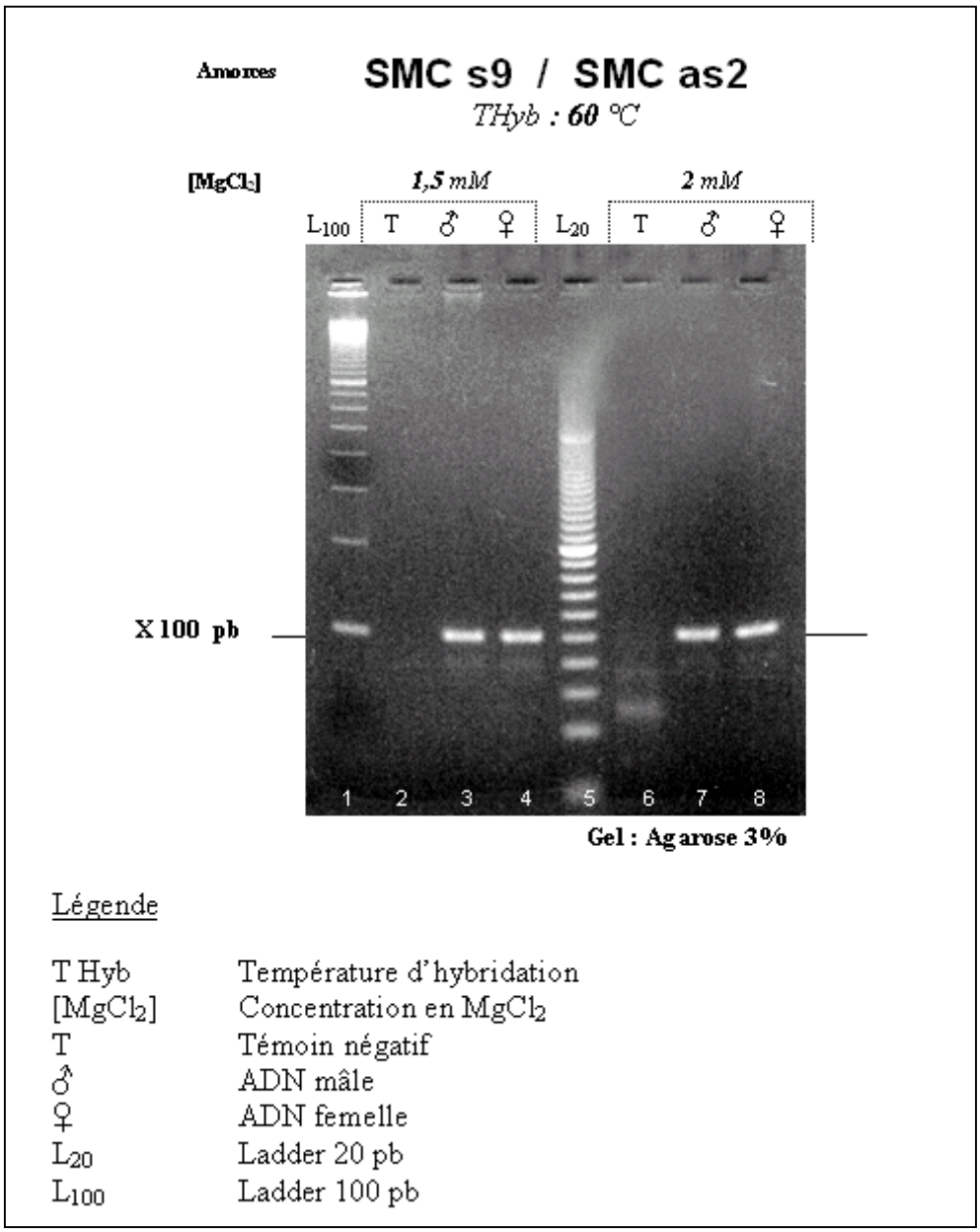
1. Rappel des conditions expérimentales

Nous avons testé ce couple dans les mêmes conditions que le couple préalable, c'est à dire à une température d'hybridation de 59°C, à 1,5 et 2 mM .

Ce couple d'amorces amplifierait une séquence de 280 pb du chromosome Y.

2. Signaux obtenus

- Les **témoins négatifs** ne présentent aucune amplification (non présenté).
- Pour les **extraits mâles**, aucune amplification n'est visible à 1,5 mM (figure 17, puits 7). On constate à 2 mM (figure 9, puits 9), la présence d'un signal de très faible poids moléculaire non spécifique.
- Pour les **extraits femelles**, aucune amplification n'est visible à 1,5 mM (figure 17, puits 8). L'amplification obtenue à 2 mM (figure 17, puits 10) est non spécifique.



Légende

T Hyb	Température d'hybridation
[$MgCl_2$]	Concentration en $MgCl_2$
T	Témoin négatif
♂	ADN mâle
♀	ADN femelle
L_{20}	Ladder 20 pb
L_{100}	Ladder 100 pb

Figure 18 : Résultats des PCR SMC s9 / SMC as2.

H. COUPLE D'AMORCES SMC S9/ SMC AS2

1. Rappel des conditions expérimentales

La température d'hybridation a été fixée à 60°C. La concentration du milieu en $MgCl_2$ varie entre 1,5 et 2 mM.

Ce couple d'amorces permet d'amplifier un fragment de 100 pb du chromosome X.

2. Signaux obtenus

- Pour le **témoin négatif**, nous remarquons aucune amplification visible à une concentration en $MgCl_2$ de 1,5 mM (figure 18, puits 2).

Cependant, à la concentration de 2 mM (figure 18, puits 6), nous observons deux signaux : un signal de faible intensité dont la taille avoisine les 50 pb et un autre signal très faible, plus proche de 70 pb.

- Les **extraits mâles** présentent aux deux températures et pour les deux niveaux de concentration testés, un signal intense d'environ 100 pb.

Nous pouvons remarquer également la présence d'un très léger signal voisin de 80 pb. Il est plus visible à une concentration de 1,5 mM.

- Les résultats obtenus à partir des **extraits femelles** ressemblent en tout point à ceux décrits chez les mâles.

Remarques :

- Quelle que soit la concentration en $MgCl_2$, et pour les deux sexes, nous obtenons un signal d'intensité suffisamment visible.

- Nous attendions le signal d'un fragment de 100 pb correspondant au chromosome X, ce qui correspondrait bien aux bandes obtenues.

Les autres signaux obtenus montrent un défaut de spécificité de nos amorces. Néanmoins, les signaux obtenus restes de très faible intensité.

- Nous percevons également la trace d'un signal de très faible intensité à hauteur de 80 pb, pour les milieux à 1,5 mM (figure 18, puits 3 et 4) et à 2 mM (figure 18, puits 6, 7 et 8). Cette bande est également associée à une bande de 50 pb environ chez le témoin négatif. Ces bandes de faible intensité pourraient correspondre aux dimérisations des amorces.

I. Couple d'amorces SMC s9/ SMC Yas6

1. Rappel des conditions expérimentales

Ce couple d'amorces a été testé pour une température d'hybridation de 60°C et une concentration en $MgCl_2$ variant de 1,5 à 2 mM.

Nous ne devrions pas obtenir d'amplification à partir de ce couple d'amorces.

2. Signaux obtenus

Les résultats de cette PCR ne sont pas présentés.

- Aucun produit amplifié n'est apparu que ce soit chez les témoins négatifs, ou chez les échantillons mâle et femelle.

Ces résultats confirment la spécificité de nos amorces SMC s9 et SMC Yas6 pour respectivement, les chromosomes X et Y.

J. PCR avec 3 amorces SMC s9/ SMC Yas6/SMC as2

1. Rappel des conditions expérimentales

Nous avons tester ces amorces à une température d'hybridation de 60°C, à 1,5 et 2 mM de $MgCl_2$ (tableau 12).

Nous attendons l'amplification par la combinaison SMC s9/SMC as2 d'un fragment de 100 pb.

La combinaison SMC s9/SMC Yas6 ne devrait produire aucune amplification.

2. Signaux obtenus

Les résultats de cette PCR ne sont pas figurés.

- Seul le **témoin négatif** à la concentration de 2 mM présente un signal similaire à ce qui avait été observé pour les résultats du couple SMC s9/SMC as2 : deux bandes de faible intensité à 50 et 80 pb (figure 18).

L'autre témoin négatif (à 1,5 mM) n'a pas présenté de signal.

- Les **extraits mâles et femelles** présentent un signal voisin de 100 pb.

- L'intensité des signaux de 100 pb est comparable à celle obtenue par la PCR SMC s9/SMC as2 (figure 18).

Ces résultats confirment la spécificité de l'amorce SMC s9 pour la séquence SMCX et la spécificité de SMC Yas6 pour la séquence SMCY.

Figure 19 : Résultats des PCR SMC Xs3 / SMC Ys5 / SMC as2 à la température de 59 et 60°C.

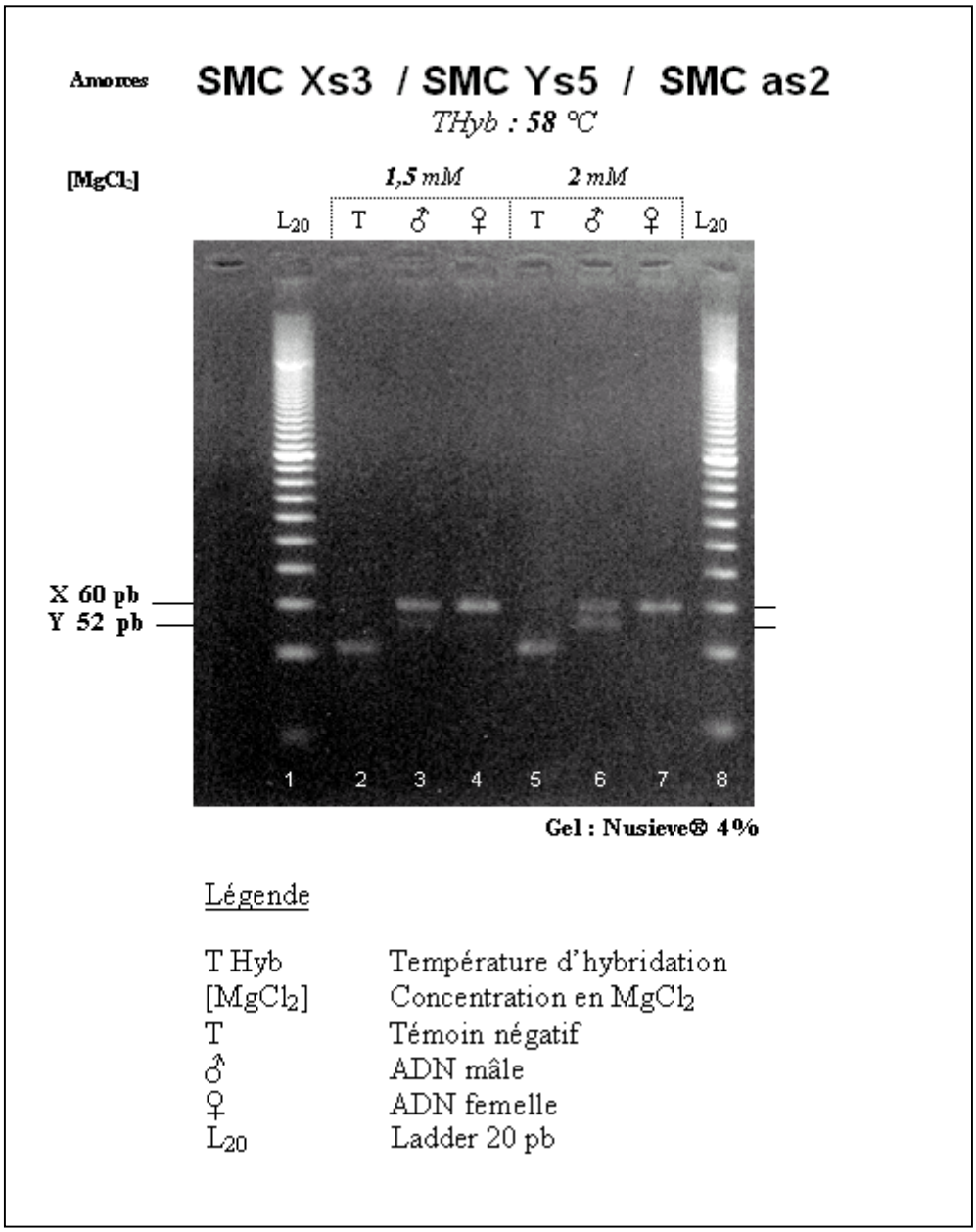


Figure 20 : Résultats des PCR SMC Xs3 / SMC Ys5 / SMC as2 à la température de 58°C.

K. PCR avec les 3 amorces SMC Xs3/ SMC Ys5/ SMC as2

1. Rappel des conditions expérimentales

Ces trois amorces ont été testées aux températures d'hybridation de 60°C, 59°C et 58°C (tableau 12).

Pour chacune des températures testées, la concentration du milieu en $MgCl_2$ varie de 1,5 à 2 mM.
Le couple SMC Xs3/SMC as2 amplifie un fragment de 60 pb du chromosome X.
Le couple SMC Ys5/SMC as2 amplifie un fragment de 52 pb du chromosome Y.

2. Signaux obtenus

a- Témoin négatif

Pour chaque température et chaque milieu étudié, nos témoins négatifs présentent tous un signal de faible intensité d'environ 40 pb correspondant aux dimérisation d'amorces (figure 19, puits 2, 5, 9, 12 et figure 20, puits 2 et 5).

Nous pouvons cependant remarquer qu'aux concentrations de 2 mM (figure 19, puits 5 et 12), les témoins négatifs présentent une double bande : une bande voisine de 40 pb et une autre bande plus haute voisine de 50 pb. Cette double bande visible à 2 mM n'est apparue qu'aux température de 60 et 59°C. En effet, à 58°C, les signaux des témoins négatifs restent rigoureusement identiques entre eux. Cette bande d'environ 40 pb, correspond aux amorces.

b- Extraits mâles

Température de 60°C

A la température de 60°C et pour 2 mM, l'extrait mâle (figure 19, puits 13) présente un signal à hauteur de 60 pb et un autre signal beaucoup plus discret de 52 pb. Nous devinons également un très faible signal plus proche de 40 pb similaire à l'un de ceux du témoin négatif.

En diminuant la concentration en $MgCl_2$ et en restant toujours à 60°C, l'extrait mâle (figure 19, puits 10) ne présente plus que deux bandes (celle à 60 pb et celle de 52 pb). Le très léger signal plus proche de 40 pb n'est plus visible.

Température de 59°C

Nous retrouvons à 2 mM (figure 19, puits 6) les trois bandes vues précédemment (figure 19, puits 13). Celles-ci sont plus intenses.

En diminuant, la concentration à 1,5 mM (figure 19, puits 3), la bande proche de 40 pb s'efface, laissant place uniquement aux bandes de 60 et 52 pb.

Température de 58°C

A 2 mM (figure 20, puits 6), nous distinguons les bandes de 60 et 52 pb. Par contre à cette température, nous n'observons pas la troisième bande (40 pb) précédemment observée.

En diminuant la concentration en $MgCl_2$ à 1,5 mM, nous constatons la diminution du signal de la bande de 52 pb. Par contre la bande à 60 pb reste toujours visible et est plus intense qu'à 2 mM.

c- Extraits femelles

Quelles que soient les conditions de température et de concentration en $MgCl_2$ utilisées, nous obtenons pour les différents extraits de femelle, un unique signal à hauteur de 60 pb.

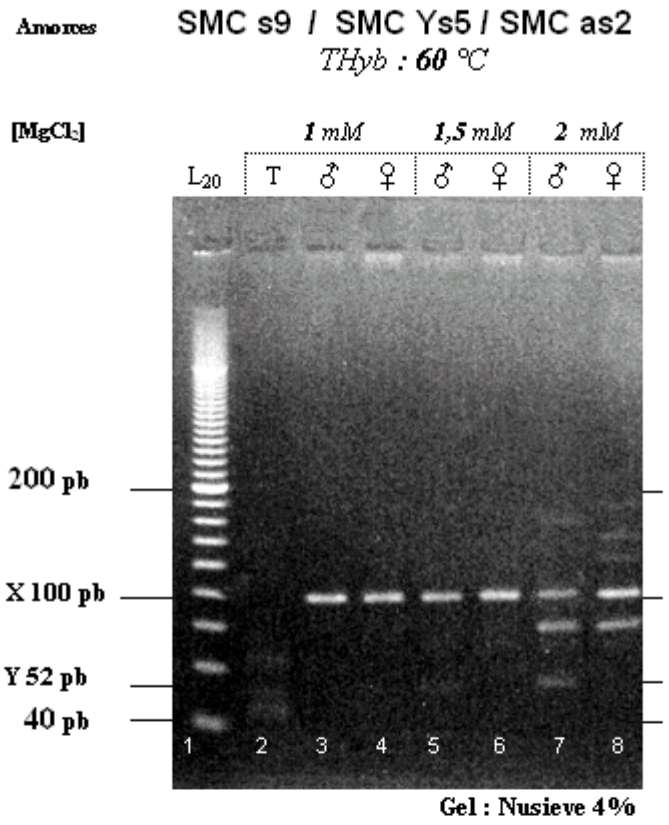
3. Qualité des résultats

L'intensité des signaux obtenus est une fois encore très faible à cause de la taille des fragments amplifiés.

L'intensité maximale des signaux des extraits mâles a été obtenue à la température de 58°C et la concentration de 2 mM (figure 19, puits 6).

Nous remarquons chez les mâles que le fragment de 52 pb est généralement de plus faible intensité que le fragment de 60 pb sauf pour le cas à 58°C et 2mM.

Enfin, pour des conditions expérimentales identiques, le fragment de 60 pb du mâle est de plus faible intensité que celui de la femelle.



Légende

T Hyb	Température d'hybridation
[$MgCl_2$]	Concentration en $MgCl_2$
T	Témoin négatif
♂	ADN mâle
♀	ADN femelle
L_{20}	Ladder 20 pb

Figure 21 : Résultats des PCR SMC s9/ SMC Ys5 / SMC as2 à la température de 60°C.

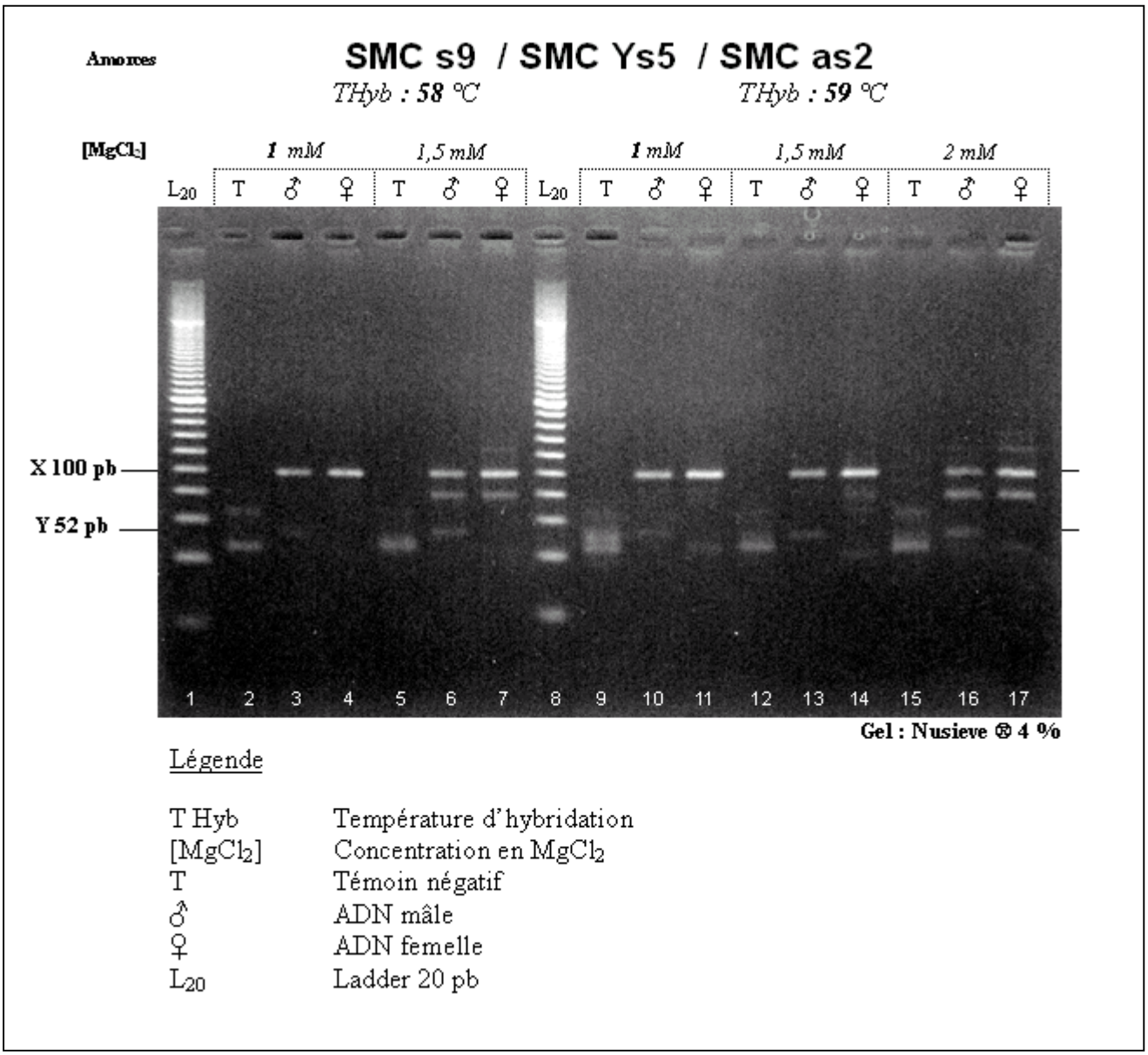


Figure 22 : Résultats des PCR SMC s9 / SMC Ys5 / SMC as2 à la température de 59 et 58°C.

L. PCR avec les 3 amorces SMC s9 / SMC Ys5/ SMC as2

1. Rappel des conditions expérimentales

Ces trois amorces ont été testées aux températures d'hybridation de 60°C, 59°C et de 58°C (tableau 12).

Pour chacune des températures testées, la concentration du milieu en $MgCl_2$ varie de 1,5 à 2 mM.
Le couple SMC s9/SMC as2 amplifie un fragment de 100 pb du chromosome X.
Le couple SMC Ys5/SMC as2 amplifie un fragment de 52 pb du chromosome Y.

2. Signaux obtenus

a- Témoin négatif

Température de 60°C

A 60°C et 1 mM, le témoin négatif (figure 21, puits 2), présente trois signaux de très faible intensité à hauteur approximative de 20, 30 et 40 pb (dimérisation des amorces en absence de cible).

Température de 59°C

En diminuant la température d'un degré, le témoin négatif à 1 mM (figure 22, puits 9), ne présente plus les bandes de 20 et 30 pb mais l'intensité des deux signaux de taille voisine de 40 et 50 pb augmentent. On devine également un troisième signal à hauteur de 60 pb. A cette même température et pour une concentration croissante en $MgCl_2$ de 1,5 mM (figure 22, puits 12) et 2 mM (figure 22, puits 15), les bandes évoquées sont moins visibles.

Température de 58°C

A la température de 58°C et une concentration de 1 mM (figure 22, puits 2), on perçoit les bandes voisines de 40 et 60 pb, et une fois encore, en augmentant la concentration à 1,5 mM (figure 22, puits 5), on constate principalement une légère atténuation du signal voisin de 60 pb.

b- Extraits mâles

Température de 60°C

A la concentration de 2 mM, l'extrait mâle (figure 21, puits 7), présente plusieurs signaux dont deux principalement visibles à 100 et 80 pb. Les autres signaux de plus faible intensité correspondent à des amplicons d'environ 160 et 50 pb.

En diminuant la concentration à 1,5 (figure 21, puits 5) puis 1 mM (figure 21, puits 3), nous constatons la persistance d'un signal unique à hauteur de 100 pb.

Température de 59°C

Nous retrouvons à la concentration de 2 mM (figure 22, puits 16) les signaux à 100, 80 et 50 pb. L'intensité des deux premiers signaux est légèrement diminuée par rapport aux conditions précédentes (60°C et 2 mM) tandis que celle du signal à 50 pb n'a pas été affectée.

En diminuant la concentration à 1,5 mM (figure 22, puits 13), puis à 1 mM (figure 22, puits 10), nous procédons à l'extinction du signal de 80 pb ainsi qu'à l'atténuation du signal de 50 pb. Le signal obtenu à 100 pb semble par contre plus intense lors de la diminution de la concentration en $MgCl_2$.

Température de 58°C

A cette température, les signaux à 100, 80 et 50 pb sont visibles jusqu'à la concentration de 1,5 mM (figure 22, puits 6). Ce n'est qu'en diminuant la concentration à 1 mM (figure 22, puits 3) que les signaux de 80 et 50 pb disparaissent.

c- Extraits femelles

Température de 60°C

Nous observons à 2 mM (figure 21, puits 8), deux principaux signaux (100 et 80 pb) associés à deux signaux de très faible intensité à 120 et 140 pb environ.

En diminuant la concentration à 1,5 mM (figure 21, puits 6) puis à 1 mM (figure 21, puits 4), seul persiste le signal de 100 pb.

Température de 59°C

A la concentration de 2 mM (figure 22, puits 17), nous observons des signaux identiques à ceux obtenus à 60°C pour cette même concentration. Est apparu également dans ces conditions, un signal de très faible intensité voisin de 40 pb.

La diminution de la concentration en $MgCl_2$ à 1,5 mM (figure 22, puits 14) produit une diminution de l'intensité des signaux. Ce n'est qu'en diminuant une nouvelle fois cette concentration à 1 mM (figure 22, puits 11) que l'on obtient l'extinction d'une partie des signaux : persistent les signaux de 100 et 40 pb. L'intensité du signal de 40 pb est d'autant plus importante que la concentration du milieu en $MgCl_2$ diminue.

Température de 58°C

Nous obtenons à 1,5 mM (figure 22, puits 7) deux principaux signaux à 100 et 80 pb. Un signal de très faible intensité est également visible à 120 pb. Nous pouvons remarquer que l'intensité du signal de 80 pb à 1,5 mM est d'autant plus faible que la température d'hybridation diminue.

En réduisant la concentration à 1 mM (figure 22, puits 4), seul le signal à 100 pb reste visible.

3. Qualité des résultats

a- Sensibilité

Le signal de 100 pb reste clairement identifiable quelles que soient les conditions expérimentales fixées.

Par contre, le signal de 52 pb est de très faible intensité. Il reste encore suffisamment visible pour une concentration en $MgCl_2$ variant entre 1,5 et 2 mM. L'intensité de ce signal n'est semble-t-il pas affecté par les températures testées.

b- Spécificité

Les fragments obtenus à 100 et 52 pb semblent bien spécifiques des séquences.
D'autres signaux sont apparus suivant les conditions du milieu. Parmi ceux-ci, nous retiendrons le signal de 80 pb non spécifique, qui disparaît à 1,5 et 1 mM à 60°C ainsi qu'à 1 mM à 58 et 59°C.

Chapitre IV

Discussion

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

● Nous avons prélevé pour la mise au point des amorces, le sang de trois chevaux mâles et de deux juments. Nous avons considéré ces chevaux comme ayant un développement normal de leur appareil reproducteur au vu des commémoratifs et des résultats de l'examen clinique. Il nous aurait fallu en toute rigueur, réaliser un caryotype de ces animaux afin de s'assurer qu'ils n'étaient pas porteur d'une anomalie chromosomique. Néanmoins, vue la faible prévalence de ces cas, nous n'avons pas jugé nécessaire de le réaliser. Les volumes prélevés ont été suffisants à l'élaboration de ce test.

● Nous aurions aimé pouvoir conforter nos résultats et illustrer ce travail par la réalisation du test sur des chevaux intersexués et pour lesquels une anomalie du caryotype était déjà identifiée. Malgré nos recherches, il n'a pas été possible d'obtenir un tel cas.

● Enfin, les travaux de Boinot [12] ont montré que les résultats de PCR sont de meilleure qualité lorsque l'extraction était réalisée à partir de sang réfrigéré mais non congelé. Nous avons donc réalisé l'extraction à partir de sang frais ou seulement réfrigéré. Les extraits ont ensuite été conservés congelés.

II. METHODE

A. KITS D'EXTRACTION D'ADN

1. Quantité d'ADN extrait

Nous avons principalement utilisé le kit d'extraction Nucleospin®. Il nous permet d'obtenir 50 µl d'ADN purifié par extraction.

Au cours de ce processus, l'ADN est adsorbé sur un gel de silice. La quantité adsorbée est donc définie par la surface de silice et ne peut donc pas dépasser une valeur seuil fixée par le fabricant du kit. Cette valeur seuil limite les excédents d'acides nucléiques préjudiciables à la qualité des résultats [90].

2. Méthode d'extraction

a- Kit d'extraction Nucleospin®blood quickpure

Ce kit d'extraction que nous avons majoritairement utilisé a pour avantage d'obtenir nos extraits très rapidement (en moins d'une demi-heure).

Néanmoins, il nécessite d'avoir recours à du matériel de laboratoire spécifique (notamment des centrifugeuses et des congélateurs de forte puissance) et de procéder à de multiples petites manipulations toujours considérées comme sources d'erreur possible.

b- Kit d'extraction papier Whatman®

Nous avons pu également utiliser à titre d'essai un procédé d'extraction récemment mis sur le marché, le papier Whatman®.

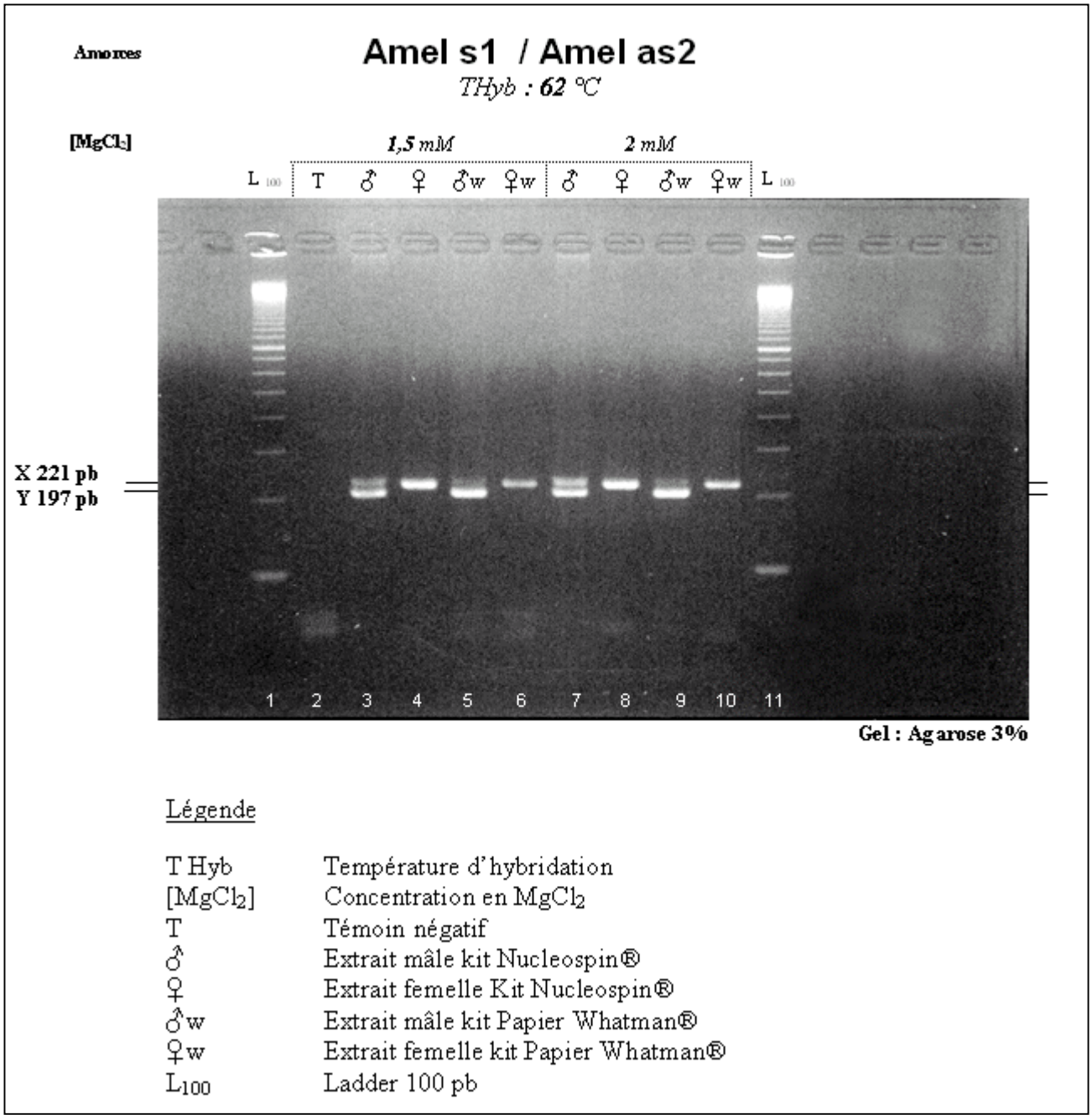


Figure 23 : Comparaison des résultats des PCR Amel s1/ Amel as2 avec extraction Nucleospin® et Whatman®.

Ce kit d'extraction présente des propriétés technologiques très intéressantes permettant une simplification maximale du procédé d'extraction. En effet, les étapes de purification de l'ADN, sont réduites à de simples incubations successives sans nécessité d'un appareillage perfectionné.

c- Comparaison des kits d'extraction Nucleospin® et papier Whatman®.

Nous voulions savoir si ce procédé altérait les résultats d'une PCR réalisée traditionnellement avec le kit d'extraction Nucleospin®.

♦ PCR avec le couple Amel s1/Amel as2.

Nous avons comparé les résultats des PCR réalisées à une température d'hybridation de 62°C (figure 23). La concentration en $MgCl_2$ a été fixée à 1,5 puis 2 mM.

- Quelle que soit la concentration du milieu en $MgCl_2$, nous obtenons pour les deux procédés d'extraction, deux bandes chez les mâles (figure 23, puits 3,5,7 et 9) à 221 et 197 pb et une unique bande à 221 pb chez les femelles (figure 23, puits 4,6,8 et 10).

- Nous constatons qu'à la concentration de 2 mM, les signaux obtenus à partir du kit papier Whatman® sont de manière générale d'intensité plus faible que les signaux respectifs fournis par l'autre kit. Seule la bande à 197 pb des mâles (figure 23, puits 5 et 9) a une intensité supérieure lorsqu'elle est extraite avec le papier Whatman®.

Cette différence d'intensité est visible lorsque les PCR ont été réalisées à la concentration de 1,5 mM.

Aucune amplification non spécifique n'a été apportée par le changement de kit d'extraction.

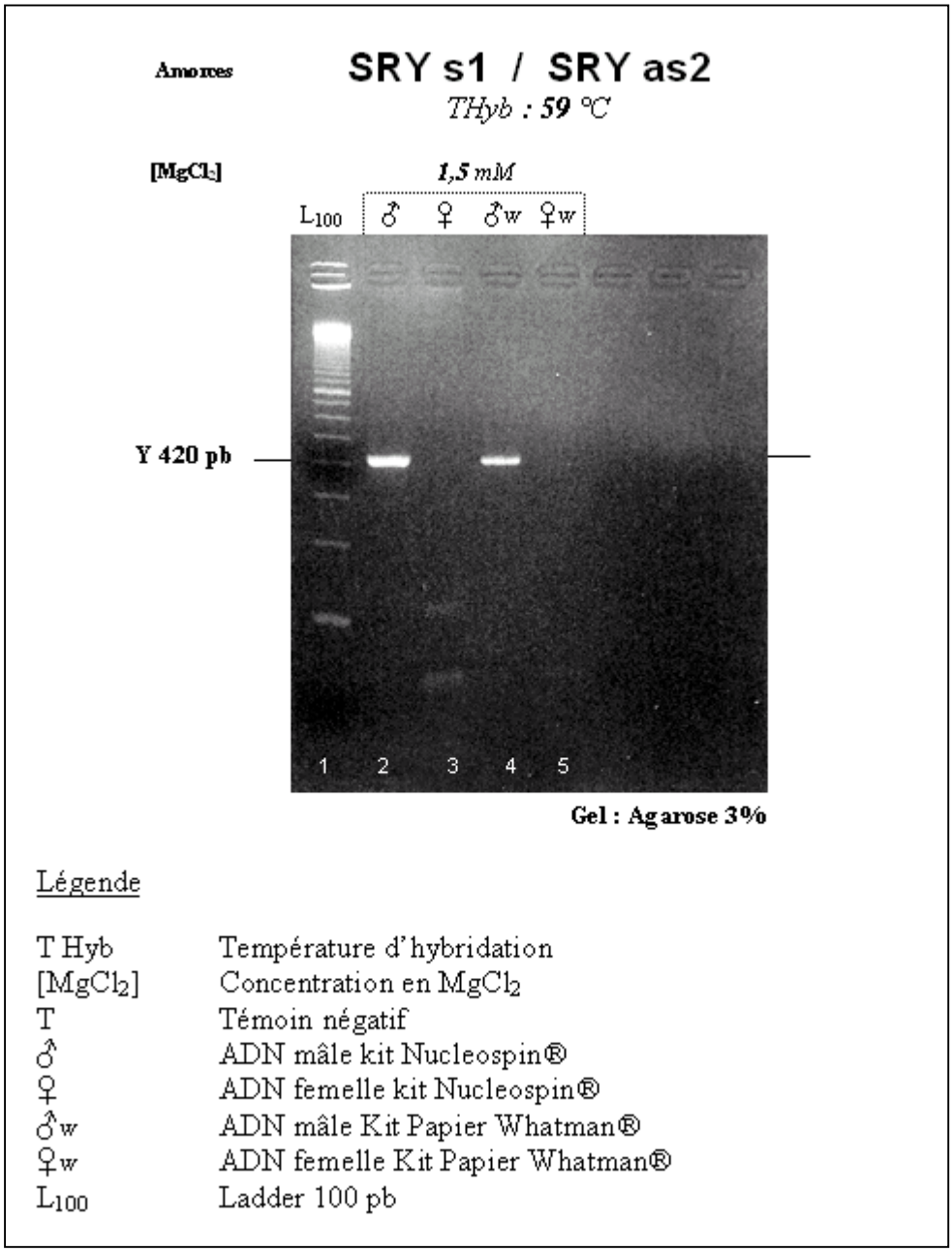


Figure 24 : Comparaison des résultats des PCR SRY s1/ SRY as2 avec extraction Nucleospin® et Whatman®.

♦ PCR avec le couple SRY s1/SRY as2

Nous avons comparé les résultats du procédé d'extraction en réalisant une PCR à la température de 59°C et pour une concentration en $MgCl_2$ de 1,5 mM (figure 24).

Nous avons bien obtenu un signal à 420 pb pour les mâles (figure 24, puits 2 et 4).

La bande à 420 pb obtenue par extrait au papier Whatman® est de plus faible intensité que celle obtenue avec l'autre kit.

♦ Choix du kit d'extraction et de purification d'ADN

Bien que les résultats obtenus avec l'extraction au papier Whatman® puissent être satisfaisants, nous avons conservé le procédé d'extraction Nucleospin® pour assurer l'homogénéité des tests effectués dans cette étude.

B. AMPLIFICATION PAR PCR ET ELECTROPHORESE

1. Variation de la stringence

a- Le chlorure de magnésium

Le réactif soumis à variation lors de notre étude est le chlorure de magnésium, $MgCl_2$. L'apport d'ions Mg^{2+} est nécessaire pour la réalisation de la réaction enzymatique et la stabilisation des nucléotides [90].

Nous avons fait varier cette concentration de 1 à 2 mM selon les cas. Lorsque nous diminuons la concentration en ions Mg2+, nous limitons la capacité d'hybridation non spécifique des amorces c'est à dire que nous rendons le milieu plus stringent. La réciproque est également vraie. Il est impossible de travailler à des concentrations inférieures à 1mM, faute de quoi, aucune hybridation spécifique des amorces avec leur séquence ne peut se produire.

Ainsi, la variation de concentration opérée vise à atténuer des bandes non spécifiques éventuelles (en diminuant la concentration) ou à augmenter l'intensité du signal recherché (en augmentant la concentration).

b- Température d'hybridation

La température d'hybridation théorique est de 5 à 10°C inférieure à la moyenne des températures de fusion des différentes amorces mises en jeu. Néanmoins, seule l'expérience permet de définir la température d'hybridation optimale qui devra être utilisée (tableau 14).

Amorce	*Tm (°C)*	*Tm moyenne (°C)*	*T Hybridation utilisée(s) (°C)*	*T Hybridation optimale (°C)*
Amel s1	**68**	69	62	**62**
Amel as2	**70**			
SRY s1	**64**	65	59	**59**
SRY as2	**66**			
SMC s1	**64**	64	59 et 60	**-**
SMC as2	**64**			
SMC s1	**64**	64	59	**-**
SMC Xas4	**64**			
SMC s1	**64**	66	59 et 60	**-**
SMC Yas6	**68**			
SMC Xs3	**64**	64	59	**59**
SMC as2	**64**			
SMC Ys5	**64**	64	59 et 60	**60**
SMC as2	**64**			
SMC s7	**68**	66	59 et 60*	**-**
SMC as2	**64**			
SMC s7	**68**	68	59 et 62*	**-**
SMC Yas6	**68**			
SMC s9	**66**	65	60	**60**
SMC as2	**64**			
SMC s9	**66**	67	60*	**-**
SMC Yas6	**68**			
SMC Xs3	**64**	64	58, 59 et 60	**58**
SMC Ys5	**64**			
SMC as2	**64**			
SMC s9	**66**	64,7	58, 59 et 60	**58**
SMC Ys5	**64**			
SMC as2	**64**			
SMC s9	**66**	66	60*	**-**
SMC Yas6	**68**			
SMC as2	**64**			

Tableau 14 : Détermination des températures d'hybridation optimales.

* Résultats non montrés.

- aucune amplification n'a été obtenue avec ces couples d'amorces.

Lorsque nous augmentons la température d'hybridation, nous augmentons la stringence du milieu, c'est à dire que nous limitons la capacité d'hybridation des amorces [90]. La réciproque est également vraie.

Ainsi pour diminuer l'intensité de bandes non spécifiques, nous augmentons la température d'hybridation (ce qui explique l'intérêt d'obtenir des amorces à température de fusion élevée qui permettent de travailler à une température d'hybridation d'autant plus élevée sans perte d'intensité du signal recherché) et pour augmenter l'intensité du signal recherché, nous diminuons la température (au détriment de l'apparition de bandes non spécifiques).

2. Nombre de cycles d'amplification

Bien qu'en temps normal le rendement d'amplification ne puisse être fortement augmentée au-delà de 40 cycles, nous avons porté ce nombre à 50 pour les PCR avec trois amorces.

En effet, en associant ensemble trois amorces, nous augmentons l'importance des phénomènes de compétitions (avec la séquence cible ou même des amorces entre elles), et obtiendrions donc à 40 cycles un rendement plus faible que si un seul couple était utilisé.

3. Séparation des produits amplifiés par électrophorèse

● Le gel de migration est constitué soit d'agarose soit de Nusieve®, choisis en fonction de la taille des produits amplifiés attendus. En effet, alors que le Nusieve® est un composé macromoléculaire recommandé pour la migration de petits fragments, il arrive parfois, que la migration sur gel d'agarose apparaisse de meilleure qualité selon la concentration utilisée.

Nous avons donc comparé les résultats de l'une des PCR produisant des fragments très courts (PCR avec les amorces SMC Xs3/SMC Ys5/SMC as2) en fonction de la nature du gel : agarose 3% ou Nusieve ® 4% (résultats non montrés).

En l'occurrence dans notre cas, les signaux des fragments en gel d'agarose ont été plus intenses mais moins nets qu'en gel de Nusieve®. Nous avons préféré malgré la perte d'intensité, travailler pour les petits fragments avec le gel le plus résolutif, le Nusieve®.

● Les électrophorèses ont été poursuivies jusqu'à l'obtention d'une migration au-delà de 3/4 de la hauteur du gel afin d'obtenir une séparation suffisante des fragments de tailles voisines (comme les fragments de 60 et 52 pb obtenus avec les amorces SMC Xs3/SMC Ys5/SMC as2 par exemple).

Toutefois, nous obtenions une perte d'intensité des signaux avec l'augmentation de la durée de migration. Il a été nécessaire de trouver dans certains cas un compromis pour limiter cette perte d'intensité et obtenir une séparation des fragments suffisante.

C. NUMERISATION ET TRAITEMENT DES RESULTATS PHOTOGRAPHIQUES

● La numérisation des clichés a nécessité le réglage de l'appareil afin d'obtenir la meilleure résolution possible et ainsi une restitution fidèle des résultats.

Bien que la qualité obtenue soit amplement satisfaisante, il n'est pas possible d'affirmer qu'aucune perte de signal ne se produise du fait des caractéristiques techniques du matériel. C'est pourquoi, chaque résultat numérisé a fait l'objet d'une comparaison attentive avec la photographie originale pour pouvoir effectuer si besoin une nouvelle numérisation.

● Nous avons modifié les paramètres de luminosité et de contraste afin que les signaux visibles sur les clichés photographiques et numériques soient également visibles après impression sur support papier ordinaire.

Les variations de luminosité et de contraste apportées sont identiques pour tous les résultats. Cette homogénéité de traitement garantit au lecteur la possiblité de comparer les résultats imprimés entre eux.

Il n'en demeure pas moins que la description et l'analyse des résultats sont réalisées en se référant à la qualité des signaux obtenus sur les clichés photographiques originaux.

III. RESULTATS

A. REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE

1. Répétabilité

La répétabilité est le paramètre garantissant de retrouver des résultats semblables à partir d'autres extraits que ceux utilisés dans le cadre de cette mise au point. Elle dépend donc fortement de la variabilité intraspécifique.

Pour s'affranchir de cette variabilité, il est théoriquement necessaire après leur mise au point, de réaliser les tests sur un panel aléatoire d'échantillons sanguins. Néanmoins, nous avons pris soin de définir nos amorces au sein de séquences concensus qui sont garantes de la stabilité génétique et donc de la répétatbilité de nos tests.

2. Reproductibilité

La reproductibilité correspond à la faculté d'obtenir en suivant un protocole expérimental défini, des résultats identiques à ceux préalablement rencontrés. Nous avons pu attester de cette reproductibilité au travers des nombreux tests réalisés et reproduits dans le cadre de ce travail.

B. SENSIBILITE ET SPECIFICITE

La sensibilité et la spécificité des amorces ont été évaluées pour chacunes des PCR. La perte de sensibilité correspond à une perte d'intensité du signal tandis que la perte de spécificité correspond à l'apparition de signaux inattendus. Ces signaux non spécifiques peuvent provenir [90]:

- d'hybridations non spécifiques correspondant à une hybridation des séquences sur une portion différente du génome,
- d'hybridation des amorces entre elles (appelée dimérisation d'amorces)
- de la formation de structure en « épingle à cheveux » au sein même d'une amorce.

1. Amorces Amel s1 et Amel as2

Au cours de la PCR, nous avons obtenu pour chacune des concentrations en $MgCl_2$, des signaux de forte intensité. Nous avions bien obtenu les fragments attendus de 197 pb chez le mâle et de 221 pb chez le mâle et la femelle. Aucun autre signal (à l'exception des dimères d'amorces) n'est visible.

Ces deux amorces sont donc bien sensibles et spécifiques quelles que soient les conditions de stringence en $MgCl_2$.

2. Amorces SRY s1 et SRY as2

Nous avons bien obtenu pour ces amorces le signal de 420 pb attendu pour les extraits mâles. Ces amorces sont bien spécifiques. Nous notons une différence d'intensité du signal en fonction de la concentration en $MgCl_2$. Ainsi, le signal obtenu pour une concentration de 1,5 mM est particulièrement intense et donc très facilement identifiable. Nous avons ainsi une très bonne sensibilité de ces amorces.

3. Amorces SMC

● De nombreuses PCR ont été entreprises pour mettre au point les amorces SMC. Au cours de celles-ci, nous avons pour chacun des couples, évalué leur sensibilité et leur spécificité. De nombreuses modifications ont été réalisées en fonction de ces paramètres aboutissant à une véritable démarche expérimentale. C'est pourquoi, afin de rendre compte de cette réflexion, nous avons présenté la discussion sur la sensiblité et la spécificité de ces amorces, non pas par couple isolé, mais bien en reproduisant cette démarche.

● Préalablement à la réalisation des PCR, nous avions défini pour les amorces SMC, certains impératifs.

Ainsi, sachant que la séquence du gène *SMCX* était plus longue de 18 pb de la séquence du gène *SMCY*, nos amorces devaient permettre d'obtenir chez les mâles porteurs de SMCY, deux signaux de taille voisine mais suffisamment distiguables.

D'autre part, nous voulions obtenir des fragments d'une taille proche de ceux obtenus avec les amorces SRY et Amel, afin de pouvoir *in fine*, présenter les résultats d'un éventuel test sur un même et unique gel.

● Le séquençage des fragments amplifiés sera réalisé afin de confirmer la spécificité de nos amorces SMC.

a- Amorce SMC s1

♦ Tests entrep r is SMC as2

Nous avons réalisé plusieurs PCR avec les amorces SMC s1 et SMC as2, qui auraient dû permettre l'amplification de deux fragments (tableau 12).

Les résultats obtenus (figure 12) montrent contre toute attente, un défaut de spécificité survenant quelles que soient les conditions de température et de concentration en $MgCl_2$. Il nous fallait donc déterminer si ce défaut de spécificité provenait de l'une ou bien des deux amorces et s'il se produisait aussi bien en amplifiant exclusivement SMCX ou SMCY.

Nous avons émis dans un premier temps l'hypothèse que ce manque de spécificité résultait principalement d'une seule amorce. Nous voulions alors tester l'amorce SMC s1 avec des amorces antisens spécifiques de chacune des séquences SMCX ou SMCY.

♦ Tests entrepris avec SMC Xas4 et SMC Yas6

Une amorce SMC Xas4 (spécifique de la séquence de SMCX) et une amorce SMC Yas6 (spécifique de la séquence de SMCY) situées légèrement en amont de la zone d'hybridation de SMC as2 ont été définies (figure 25).

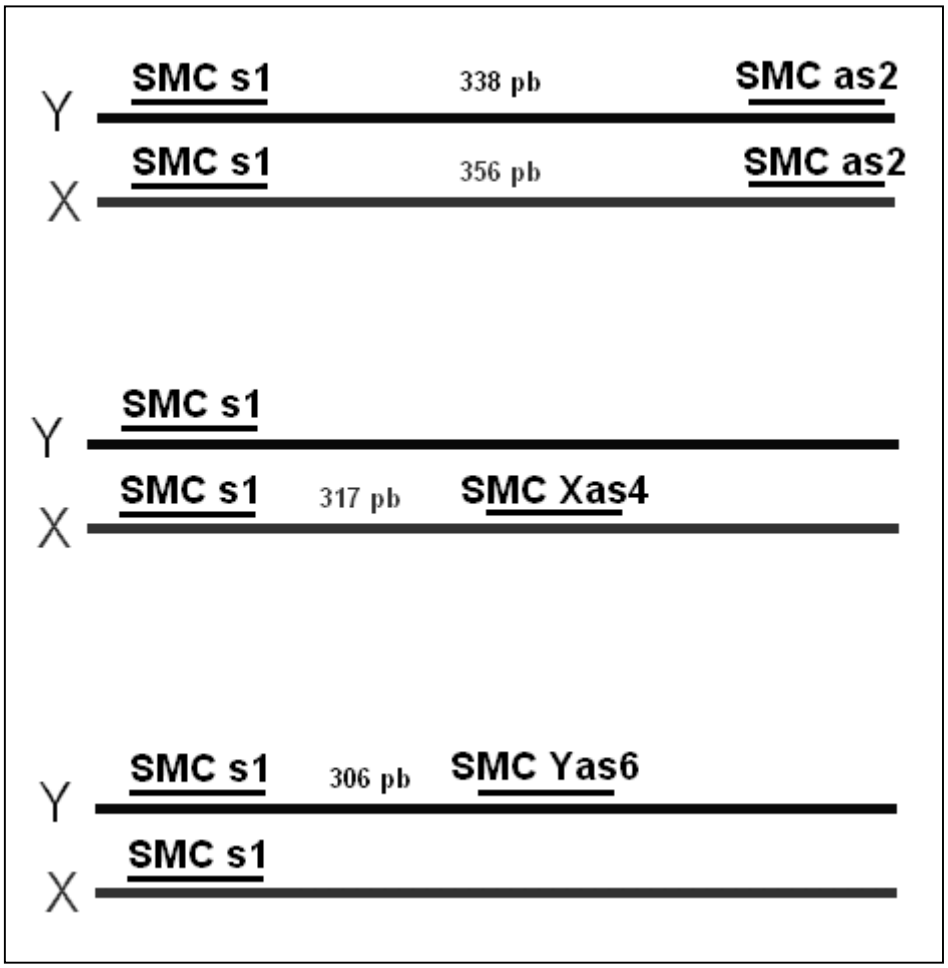


Figure 25 : Positionnement de SMC Xas4, SMC Yas6 et SMC as2 par rapport à SMC s1.

Les PCR réalisées avec les amorces SMC s1/SMC Xas4 (figure 13) et SMC s1/SMC Yas6 (figure 14) ont toutes deux fournies des bandes non spécifiques.

Etant donné qu'il n'est possible de statuer sur l'efficacité d'une amorce que lors de l'obtention des amplifiats attendus, il nous a été difficile à ce stade de l'expérimentation de rejeter l'ensemble des amorces jusqu'alors utilisées.

Néanmoins, au vu des nombreuses PCR réalisées, nous suspectons fortement que l'amorce SMC s1 (paramètre fixe de nos tests) soit peu spécifique et donc à l'origine de nos résultats.

b- Amorce SMC as2

Dans la continuité des tests effectués pour valider SMC s1, nous voulions vérifier si les défauts de spécificité jusqu'alors rencontrés pouvaient venir ou non de notre amorce antisens SMC as2.

♦ Tests entrep r is avec SMC Xs3 et SMC Ys5

● Nous avons alors défini une nouvelle amorce sens SMC Xs3 (figure 26) et réalisé la PCR SMC Xs3/SMC as2 (figure 15). Nous avons bien obtenu l'amplification attendu du fragment de 60 pb.

De la même manière nous avons défini une amorce SMC Ys5 (figure 26) et réalisé la PCR SMC Ys5/ SMC as2 (figure 16). Nous obtenons bien le signal de 52 pb attendu.

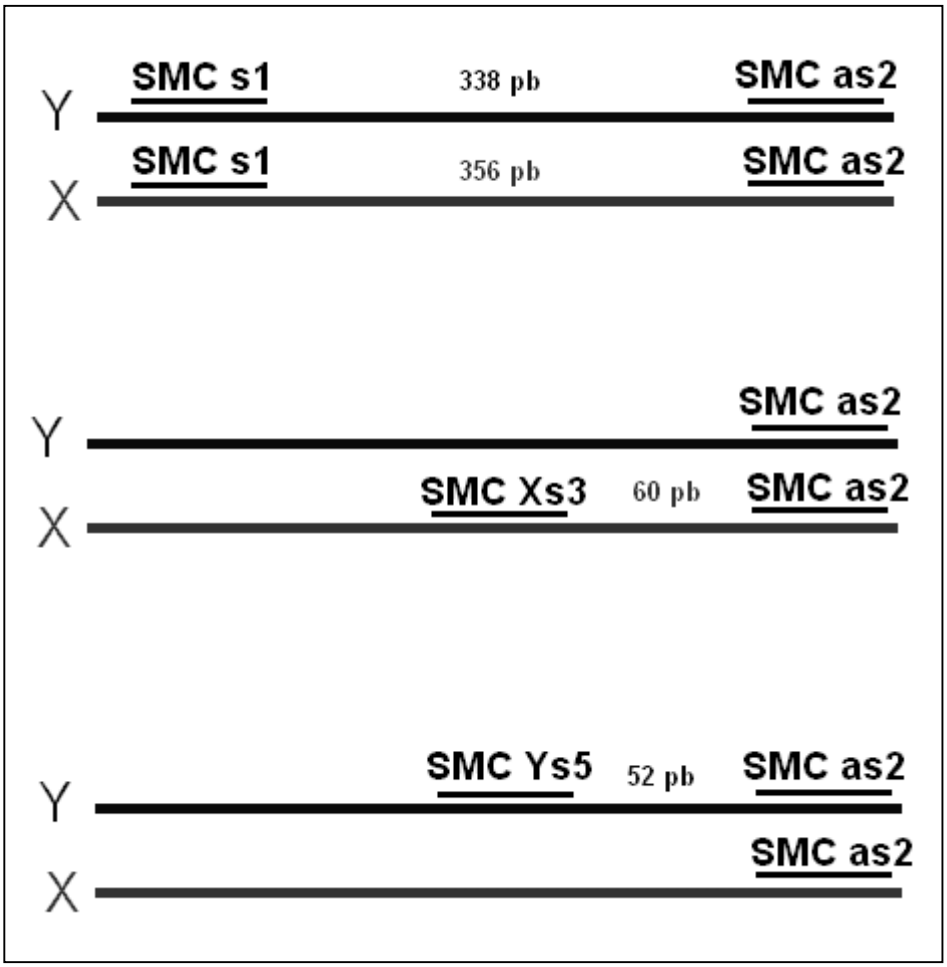


Figure 26 : Positionnement de SMC Xs3, SMC Ys5 et SMC as2 par rapport à SMC as2.

● Ceci nous permet donc de valider notre amorce SMC as2 mais également les amorces SMC Xs3 et SMC Ys5 testées. Ainsi, il s'avère que notre amorce SMC s1 ne soit pas spécifique et vienne s'hybrider dans une région différente du génome, amplifiant des fragments de haut poids moléculaires.

● Nous avons remarqué lors de la réalisation de la PCR SMC Ys5/SMC as2 (figure 16), que nous obtenions des bandes non spécifiques pour l'un des extraits femelle utilisé. Bien que créée à partir de la séquence de SMCY, nous devions bien vérifier que notre amorce SMC Ys5 ne produise aucun signal pour les extraits femelles. C'est pourquoi nous avons dès lors repris cet extrait (femelle n°2) dans différents milieux à la température de 60°C, afin de réduire ces bandes non spécifiques. Nous n'avons obtenu qu'une réduction partielle de ces signaux non spécifiques. Néanmoins, ceux-ci correspondent à des fragments de poids moléculaire important, et ne couvre pas la zone de lecture qui nous intéresse.

● L'inconvénient de ces couples d'amorces est qu'ils amplifient des fragments de faible taille et donc d'intensité beaucoup plus faible que pour SRY et Amel. De plus, nous obtenons des produits de taille voisine, 52 et 60 pb, dont la distinction (malgré l'augmentation du temps de migration) peut être délicate et oblige le recours à un gel hautement résolutif, le Nusieve® à 4%.

C'est pourquoi, nous aurions pu, pour augmenter la taille des fragments et par la même occasion la sensibilité, définir une amorce antisens plus éloignée que ne l'est l'amorce SMC as2. Néanmoins, aucune zone consensus suffisamment importante en aval de la région d'hybridation de l'amorce SMC as2 n'a été identifiée, ce qui explique que nous avons été amené à poursuivre notre recherche d'autres amorces sens fonctionnelles.

c- Amorce SMC s7

♦ Conception de l'amorce

Dans le cadre des objectifs que nous nous sommes fixés pour définir les amorces SMC, il était impératif de trouver une amorce sens en remplacement de l'amorce SMC s1. Nous avons alors défini l'amorce SMC s7 dans une région consensus de SMC, proche de la séquence SMC s1.

♦ Tests entrepris avec SMC as2 et SMC Yas6

Nous avons réalisé différentes PCR avec les couples SMC s7/SMC as2 et SMC s7/SMC Yas6. Les résultats de la PCR SMC s7/SMC as2 (figure 17) sont semblables à ce qui avait été obtenu en utilisant SMC s1. De même, la PCR SMC s7/SMC Yas6, n'a fourni aucune amplification.

Il semblerait ainsi que l'amorce SMC s7 ne puisse pas être fonctionnelle et s'hybriderait à la manière de SMC s1, en d'autres régions du génome.

d- Amorce SMC s9

♦ Conception de l'amorce

Nous avons cherché à définir une nouvelle fois une amorce sens parmi les zones consensus du gène *SMC* en respectant un éloignement suffisant de la région d'hybridation de l'amorce SMC as2. La zone en aval de la région d'hybridation de l'amorce SMC s7, présente plusieurs portions de séquence consensus. Nous avons recherché une portion d'au moins 20 pb pour définir notre nouvelle amorce sens, SMC s9, ce qui nous a conduit à nous rapprocher de la région d'hybridation de l'amorce SMC as2.

Nous n'avons trouvé aucune portion consensus de 20 pb successives. Ceci nous a alors obligé à définir une amorce parfaitement complémentaire de SMCX mais ne présentant qu'une forte homologie avec SMCY.

Il nous restait alors à déterminer le comportement de cette amorce SMC s9 et vérifier qu'elle amplifie malgré tout, les deux séquences SMCX et SMCY.

♦ Tests entrepris avec SMC as2 et SMC Yas6

● Plusieurs PCR avec les amorces SMC s9/SMC as2 ont été réalisées (figure 18) Nous avons bien obtenu l'amplification d'un fragment de 100 pb présent chez le mâle et la femelle. Nous constatons également, dans certaines conditions de température et de milieu, l'apparition d'un signal de très faible intensité à hauteur de 80 pb pour les deux sexes.

Nous avons également entrepris la PCR SMC s9/SMC Yas6 (résultats non présentés). Aucune amplification n'a été constatée.

Enfin, nous n'avons pas testé la PCR SMC s9/SMC Xs4 car celle-ci est suceptible de produire des fragments de taille équivalente au couple SMC Xs3/SMC as2 (tableau 12) et ne présente pas d'intérêt particulier.

● Nous avons donc obtenu une amorce sens fonctionnelle. Dans l'hypothèse où notre amorce SMC Yas6 soit bien fonctionnelle, il semblerait également que l'amorce SMC s9, ne puisse pas s'hybrider avec SMCY. Notre amorce SMC s9 est donc bien spécifique de SMCX.

♦ Défauts de notre amorce SMC s9

L'inconvénient de cette amorce SMC s9 est qu'elle ne permet pas l'amplification de SMCX et SMCY. Nous aurions en effet, voulu obtenir une amorce sens nous permettant de réaliser une PCR avec seulement deux amorces, et qui incluerait le contrôle interne (amplification de SMCX).

L'amorce SMC s9 étant spécifique de la séquence du gène *SMC* porté par le chromosome X, nous avons été amené à modifier sa dénomination. L'amorce SMC s9 correspond dorénavant à l'amorce SMC Xs9.

♦ Choix d'une amorce spécifique de SMCY

A l'instar de ce qui a été réalisé avec l'amorce SMC Xs9, nous aurions pu éventuellement redéfinir une amorce sens, SMC Ys11, bien spécifique de SMCY. Il nous a été impossible de définir une amorce sens fonctionnelle en amont de la région d'hybridation de l'amorce SMC Xs9. Nous pourrions définir cette nouvelle amorce sens, à partir de la séquence du chromosome Y équivalente à la position de SMC Xs9 sur le chromosome X.

L'amorce SMC Ys11 aurait ainsi été utilisée avec les amorces antisens SMC Yas6 et SMC as2 pour obtenir des fragments de respectivement 49 et 81 pb.

Nous avons déjà réussi à obtenir avec les amorces SMC Ys5/ SMC as2, un fragment de 52 pb caractérisant le chromosome Y (figure 26). Il est donc inutile de chercher à obtenir le fragment de 49 pb.

Il peut par contre être fort intéressant d'obtenir le fragment de 81 pb caractérisant SMCY. En effet, non seulement il est fort probable que le signal correspondant soit bien plus intense que celui du fragment de 52 pb mais en plus, il serait plus éloigné de la zone de 50 pb.

Cette zone est, comme nous l'avons vu avec les PCR SMCXs3/SMCas2 et SMC Ys5/SMC as2, le siège de signaux non spécifiques de dimérisation rendant la lecture des amplifiats de 60 et 52 pb difficile. Ainsi, en définissant SMC Ys11, il serait possible de réaliser une PCR en y ajoutant les amorces SMC Xs3 (pour obtenir le contrôle interne) et SMC as2 et obtenir probablement une lecture plus aisée avec des signaux de 81 et 60 pb.

In fine, il serait même intéressant d'évaluer les résultats d'une réaction de PCR en utilisant les amorces SMC Xs9/SMC s11/SMC as2 afin d'obtenir des produits de plus grande taille (100 et 81 pb) facilitant une fois de plus, la lecture des résultats. Néanmoins, nous avons constaté que la PCR SMC Xs9/SMC as2 (figure 18) produit une bande non spécifique à hauteur de 80 pb qui serait ici, confondu avec le signal de 81 pb attendu. C'est pourquoi cette association d'amorces semble peu intéresssante.

C. SYNTHESE DES RESULTATS

Au cours de ce travail, nous avons défini et sélectionné plusieurs couples d'amorces dont les résultats nous ont paru satisfaisants (*tableau 15*).

Gène	***Amorce***	***Spécificité Chromosome***		
		X	***X et Y***	***Y***
Amel	***Sens***		Amel s1	
	Antisens		Amel as2	
SRY	***Sens***			SRY s1
	Antisens			SRY as2
SMC	***Sens***	SMC Xs9 SMC Xs3		SMC Ys5
	Antisens	SMC Xas4	SMC as2	SMC Yas6

Tableau 15 : Présentation des amorces fonctionnelles selon leur spécificité chromosomique

Il nous faut donc maintenant déterminer parmi ces couples d'amorces, ceux utilisables dans un test diagnostique.

IV. PROPOSITION D'UN TEST DIAGNOSTIQUE

A. DETERMINATION DES REACTIONS DE PCR

1. Rôle des couples d'amorces

Nous avons défini dans cette étude un certain nombre d'amorces qui judicieusement associées entre elles, vont permettre de (tableau 16) :

- discriminer le sexe génétique de l'animal
- servir de contrôle interne d'extraction et/ou d'amplification
- servir à la fois de contrôle interne et de discriminant du sexe.

Discriminant du sexe	*Discriminant du sexe et contrôle interne*	*Contrôle interne*
● SRY s1/ SRY as2 **● SMC Ys5/ SMC as2**	**● Amel s1/Amel as2**	**● SMC Xs3/SMC as2** **● SMC Xs9/SMC as2**

Tableau 16 : Fonction des différents couples d'amorces utilisables.

La PCR SRY s1/SRY as2 ne présente pas de contrôle interne. Ainsi en l'absence de signal, une PCR à partir des amorces Amel ou SMC permettra de garantir l'absence d'inhibiteur de la réaction de PCR dans l'extrait.

La PCR Amel s1/Amel as2 présente l'avantage de dicriminer le sexe et de fournir un contrôle interne au cours d'une même PCR.

Les amorces SMC peuvent être associées afin d'obtenir comme pour les amorces Amel, à la fois une discrimination du sexe et un contrôle interne. Nous pouvons effectuer deux combinaisons d'amorces SMC :

- ✓ SMC Xs3/SMC Ys5/ SMC as2
- ✓ SMC Xs9/SMC Ys5/ SMC as2

La réalisation de PCR avec trois amorces est suceptible d'altérer les paramètres de sensibilité et de spécificité que nous avons décrits pour chacun des couples isolés. Ainsi, il nous faut évaluer sous un nouvel angle, la qualité des PCR obtenues avec ces trio d'amorces et déterminer leurs conditions optimales d'utilisation.

2. Evaluation des PCR avec trois amorces SMC

a- Avec SMC Xs3/SMC Ys5/SMC as2

A l'instar de ce qui a été observé lorsque nous avons réalisé les PCR de chacun des couples ici mis en jeu, nous obtenons des fragments de très petite taille situés au voisinage de la zone de migration des bandes de dimères d'amorces (figures 19 et 20).

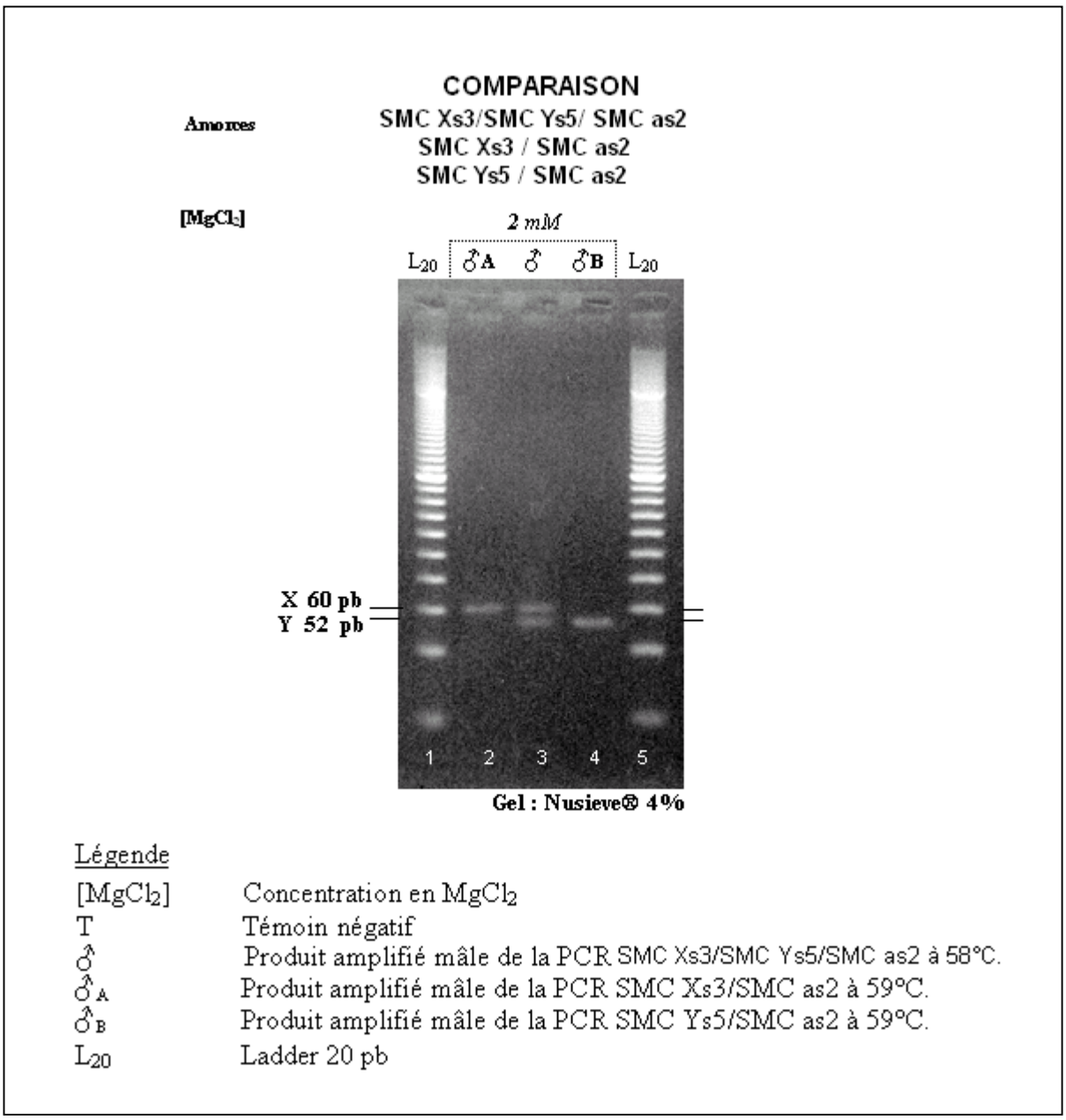


Figure 27 : Comparaison des résultats obtenus entre les PCR SMC Xs3/SMC Ys5/SMC as2 , SMC Xs3/SMC as2 et SMC Ys5/SMC as2.

▸ *Evaluation à la température d'hybridation de 60°C*

Ceci a dans un premier temps été constaté à la température d'hybridation de 60°C (figure 19). Quelle que soit la concentration en $MgCl_2$ utilisée, l'intensité du signal de 52 pb est très faible et semble difficilement utilisable pour un test diagnostic. De plus, il s'avère qu'à la concentration de 2 mM, les dimérisations d'amorces sont plus importantes et pourraient venir chevaucher la zone de 50 pb, rendant impossible toute interprétation diagnostique.

▸ *Evaluation à la température d'hybridation de 59°C*

La diminution de la température d'hybridation à 59°C, nous a permis de constater une augmentation de l'intensité du signal de 52 pb. Bien que les dimères d'amorces soient plus intenses à 2 mM, il semblerait que ces conditions nous permettent tout de même de bien les différencier du signal de 52 pb.

▸ *Evaluation à la température d'hybridation de 58°C*

● *Augmentation de l'intensité du signal de 52 pb*

Nous avons alors essayé de rendre le signal de 52 pb encore plus visible en diminuant la température d'hybridation à 58°C (figure 20).

Nous obtenons effectivement pour une concentration de 2 mM (figure 20, puits 6) un signal de 52 pb parfaitement distinguable du signal de 60 pb. Par ailleurs, nous constatons également la disparition du signal des amorces dimérisées des extraits mâles et femelles (figure 20, puits 6 et 7) rendant d'autant plus aisée la lecture des résultats.

Ainsi, en diminuant les conditions de stringence du milieu en portant la température d'hybridation à 58°C et en fournissant une concentration en $MgCl_2$ de 2 mM, nous avons augmenté l'intensité du signal de 52 pb tout en préservant celle du signal de 60 pb et atténué les bandes correspondantes aux dimères d'amorces.

Distinction des fragments de 52 et 60 pb

Nous avons comparé les résultats obtenus entre la PCR SMC Xs3/SMC Ys5/SMC as 2 et les deux PCR SMC Xs3/ SMC as2 d'une part et SMC Ys5/SMC as2 d'autre part (figure 27).

Nous retrouvons bien les signaux de 60 et 52 pb (figure 27, puits 3), ce qui atteste de la spécificité des trois amorces employées ensemble.

La taille des fragments amplifiés ne diffère que de 8 pb. Malgré cela, les signaux restent parfaitement identifiables. Ceci provient notamment du fait de l'utilisation du gel de Nusieve® qui présente une très bonne capacité de résolution.

Hybridation compétitive et rendement de PCR

On remarquera par ailleurs, que malgré une température d'hybridation supérieure (conditions plus stringentes), l'intensité des bandes de 52 pb (figure 27, puits 4) et 60 pb (figure 27, puits 2) obtenues séparément est identique à celles obtenus avec cette PCR à 58°C (en milieu moins stringent). Le rendement de la PCR avec trois amorces semble ainsi diminuée. Ceci peut être expliquée par d'éventuels phénomènes de compétition entre les amorces lors de l'étape d'hybridation.

b- Avec SMC Xs9/SMC Ys5/SMC as2

L'utilisation des couples séparément montrait l'apparition d'une bande non spécifique de 80 pb avec les amorces SMC Xs9/SMC as2 et soulevait le problème de la proximité du fragment de 52 pb avec les dimérisations des amorces pour le couple SMC Ys5/SMC as2. Nous retrouvons bien chacun de ces défauts en réalisant la PCR avec ces trois amorces réunies.

Nous constatons par ailleurs que le signal de 100 pb attendu est bien visible quelles que soient les conditions d'expérience. Nous pouvons remarquer également que l'intensité de ce signal, qui correspond à une amplification d'une séquence de SMCX, est deux fois plus importante pour le sexe homogamétique (figure 21, puits 8) que pour le sexe hétérogamétique (figure 21, puits 7).

▸ *Evaluation à la température d'hybridation de 60°C*

Nous constatons à la température de 60°C (figure 21) et pour une concentration de 2 mM, la présence du signal non spécifique de 80 pb chez le mâle et la femelle (figure 21, puits 7 et 8). Le signal de 52 pb du mâle est de faible intensité.

En diminuant la concentration de $MgCl_2$, nous obtenons une disparition de cette bande non spécifique de 80 pb mais également du signal que nous attendions de 52 pb.

▸ *Evaluation à la température d'hybridation de 59°C*

En portant la température d'hybridation à 59°C (figure 22), nous remarquons pour l'extrait mâle à 2 mM (figure 22, puits 16), une augmentation de l'intensité du signal de 52 pb par rapport aux conditions précédentes.

De même, l'intensité du signal correspondant aux dimérisations des amorces voisines de 50 pb à été augmentée. Ce signal est visible à pour l'extrait femelle (figure 22, puits17).

Les bandes non spécifiques sont présentes à 2 mM mais disparaissent lorsque l'on diminue la concentration en $MgCl_2$.

▸ *Evaluation à la température d'hybridation de 58°C*

Fort de l'expérience menée avec le trio d'amorces précédemment décrit, nous avons ici encore diminué la température d'hybridation à 58°C (figure 22). Du fait de la persistance de la bande non spécifique de 80 pb à 2 mM, il n'a pas été ici réalisé de PCR à cette concentration. Néanmoins, il semble qu'en diminuant la température d'hybridation (diminution de la stringence du milieu), nous ayons fait apparaître à nouveau cette bande de 80 pb à la concentration de 1,5 mM (figure 22, puits 6 et 7). Cette bande disparaît à nouveau à 1 mM (figure 22, puits 3 et 4).

Le signal de 52 pb est plus intense à 1,5 mM (figure 22, puits 6) qu'il ne l'était pour un même niveau de concentration à 59°C (figure 22, puits 13). Cependant, en diminuant la concentration en $MgCl_2$ du milieu pour éteindre la bande de 80 pb, nous obtenons la disparition concomitante de notre signal de 52 pb. Il n'est donc pas intéressant de travailler avec ces amorces dans ces conditions.

● Accentuation du signal de 52 pb en augmentant la part d'amorce antisens ?

Nous avons alors cherché à augmenter l'intensité du signal de 52 pb en augmentant la proportion d'amorce SMC as2 dans le milieu. Aucune amplification ne s'est produite pour les réactions où la concentration de l'amorce antisens était deux fois plus élevée que celle de chacune des amorces sens (résultats non présentés).

Des amplifications correctes ne semblent donc se produire que lorsque les amorces sont en proportion identique. L'excès de l'une des amorces, en l'occurrence l'amorce SMC

as2, engendrerait une augmentation des phénomènes de compétition pour l'hybridation des autres amorces et limiterait donc la réaction de PCR [90].

● ***Accentuation du signal de 52 pb en modifiant la concentration du gel de migration ?***

● Pour faciliter la distinction du signal de 52 pb avec d'éventuelles dimérisations d'amorces, il est parfois judicieux de modifier la qualité de gel afin d'en améliorer la résolution. Ainsi, même si le gel de Nusieve® utilisé est réputé pour sa qualité de résolution, nous avons fait migrer sur gel d'agarose 3% les mélanges réactionnels de cette PCR.

Bien qu'il arrive de manière occasionnelle d'obtenir une meilleure visualisation des résultats avec le gel d'agarose, nos essais (non présentés) ne nous ont pas permis de le privilégier dans ce cas, au gel de Nusieve®.

● Etant donné que la capacité de migration d'un fragment d'ADN est fonction notamment de la concentration du gel, nous pouvons nous demander si nous n'aurions pas obtenu une meilleure différenciation du signal de 52 pb en augmentant la concentration de Nusieve®. Il s'avère toutefois impossible pour des raisons chimiques propres au produit, d'obtenir lors de la constitution du gel, une dissolution plus importante de Nusieve®.

Puisqu'il nous est impossible d'augmenter l'intensité du signal de 52 pb, nous avons cherché à éteindre prématurément le signal non spécifique de 80 pb avant que les conditions de stringence du milieu ne produise la disparition du signal de 52 pb.

● ***Détermination de l'origine du signal de 80 pb.***

Comparaison avec la PCR SMC Xs9/SMC as2

Il est intéressant de comparer les résultats des PCR SMC Xs9/SMC as2 (figure 18) et SMC Xs9/SMC Ys5/SMC as2 à la température de 60°C (figure 21).

Bien que les dépôts aient été réalisés sur des gels de constitution différente, nous remarquons que la différence d'intensité entre le signal de 80 pb à 2 mM et à 1,5 mM est beaucoup plus importante lorsque nous utilisons les trois amorces simultanément que lors de l'utilisation d'un seul couple.

Ceci nous amène à réaffirmer l'hypothèse émise lors de l'étude de la PCR avec les amorces SMC Xs3/SMC Ys5/SMC as2, qui était de penser que la réalisation d'une PCR avec trois amorces favoriserait les hybridations compétitives et diminuerait l'intensité des signaux obtenus.

La concentration en $MgCl_2$ du milieu interviendrait alors de manière d'autant plus importante sur l'hybridation « indésirable » de SMC s9, ce qui expliquerait la forte capacité d'atténuation du signal de 80 pb juste en diminuant la concentration à 1,5 mM (figure 22, puits 13 et 14).

Comparaison avec la PCR SMC Xs9/SMC Yas6/SMC as2

Nous avons réalisé dès lors, une PCR avec les amorces SMC Xs9/SMC Yas6/SMC as2 (non présentée). Lors de la réalisation cette PCR (à une température d'hybridation de 60°C et pour 1,5 mM de [$MgCl_2$]), nous n'avons pas obtenu de signal à 49 pb. Cela nous permet une fois encore d'attester de la spécificité de SMC s9 pour la séquence SMCX.

Par ailleurs, nous n'avons pas obtenu dans ces conditions la bande non spécifique de 80 pb retrouvée avec la PCR SMC Xs9/SMC Ys5/SMC as2.

Nouvelle approche du problème

Il convient au regard des différents éléments développés, de juger de l'intérêt à faire disparaître le signal de 80 pb jusqu'à présent considéré comme indésirable.

Nous pouvons en effet soit redéfinir une amorce SMC homologue de SMC s9 mais bien spécifique de la séquence SMC Y tel que nous l'avions proposé au cours des précédentes discussions, soit accepter la présence de cette bande de 80 pb et définir donc les conditions optimales pour la réalisation de cette PCR, en ne tenant compte que de la qualité des signaux de 52 et 100 pb.

Dans ces conditions, et en l'absence de travaux complémentaires pour définir cette nouvelle amorce sens, la PCR SMC Xs9/SMC Ys5/SMC as2, pourra être utilisée de façon optimale à 58°C et 1,5 mM.

Puisque nous ne portons plus d'intérêt au signal de 80 pb, il serait intéressant de voir les résultats à 58°C et 2 mM, conditions moins stringentes en $MgCl_2$ permettant probablement d'obtenir une qualité de signal encore meilleure.

Ces conditions correspondraient à celles du précédent trio d'amorces SMC Xs3/SMC Ys5/ SMC as2 (figure 19). Nous bénéficions ainsi non seulement d'un gain de temps en ne réalisant qu'une seule programmation du thermocycleur à 58°C mais aussi d'une simplification des manipulations par la préparation commune des milieux réactionnels de 2 mM. Ceci est d'autant plus intéressant pour un test diagnostique de routine (réalisé en quantité importante), où, les erreurs liées aux manipulations bien que déjà limitées, doivent être complètement exclues.

Bien que les conditions expérimentales soient similaires, nous n'avons pas jugé utile de tester une PCR avec les quatres amorces SMC Xs9/SMC xs3/SMC Ys5/ SMC as2. En effet, il est fort probable, comme nous avons pu le constater pour d'autres réactions, que l'ajout supplémentaire d'une amorce accroît l'importance des phénomènes d'hybridation compétitive. Ceci diminue ainsi le rendement des réactions et donc la qualité des signaux attendus.

3. Conditions optimales de réaction

Nous avons finalement défini les conditions optimales de températures d'hybridation et de concentration en $MgCl_2$ pour chaque PCR du test (tableau 17) et rappelé les différents signaux obtenus (tableau 18).

		Conditions optimales		
		Température d'hybridation	***Concentration en $MgCl_2$***	***Gel de migration***
DEUX AMORCES	**Amel s1/ Amel as2**	62 °C	1,5 mM	Gel d'agarose 3%
	SRY s1/SRY as2	59°C	1,5 mM	
	SMC Xs3/SMC as2 *	59°C	2 mM	Gel de Nusieve 4%
	SMC Ys5/SMC as2 *	60°C	1mM	
	SMC Xs9/ SMC as2 *	60°C	2 mM	
TROIS AMORCES	**SMC Xs3/SMC Ys5/SMC as2**	58°C	2 mM	Gel de Nusieve 4%
	SMC Xs9/SMC Ys5/SMC as2	58°C	1,5 mM	

Tableau 17 : Conditions optimales des PCR
*(*fourni à titre indicatif).*

	Chromosome	Taille des fragments amplifiés (pb) ♂	♀
SRY s1 / SRY as2	Y	**420**	**-**
	X	**-**	**-**
Amel s1/ Amel as2	Y	**197**	**-**
	X	**221**	**221**
SMC Xs3 / SMC as2 *	Y	**-**	**-**
	X	**60**	**60**
SMC Ys5/ SMC as2 *	Y	**52**	**-**
	X	**-**	**-**
SMC s9/SMC as2 *	Y	**-**	**-**
	X	**100**	**100**
SMC Xs3/SMC Ys5/SMC as2	Y	**52**	**-**
	X	**60**	**60**
SMC Xs9/SMC Ys5/SMC as2	Y	**52**	**-**
	X	**100**	**100**

Tableau 18 : Fragments obtenus pour chaque PCR.
(fourni à titre indicatif).*

B. CONCEPTION DU TEST

1. Les étapes du test

Nous avons défini plusieurs couples d'amorces permettant de réveler la présence des gènes *SRY*, *AmelY* et *SMCY* du chromosome Y.

Parmi ces gènes, seul *SRY*, est impliqué dans la cascade du déterminisme sexuel mâle. La PCR SRY est l'élément fondamental de ce test. La détection des gènes *AmelY* et *SMCY* est également importante afin d'identifier la présence d'éventuelles translocations affectant la région du gène SRY. Ainsi, les PCR *AmelY* et *SMCY* seront systématiquement réalisées.

Les deux PCR SRY et Amel, se produisent à deux températures d'hybridation différentes, ce qui nous oblige à les réaliser successivement et occasionne une certaine perte de temps (chaque PCR ayant une durée d'environ deux heures). Néanmoins, les fragments obtenus ont pour avantage d'être de tailles relativement proches, ce qui permet de les présenter sur un même gel dans des conditions de migration semblables.

Les résultats des PCR SMC font l'objet d'une présentation sur un gel de migration différent, du fait de la faible taille des fragments obtenus.

Le test présente ainsi deux parties :
- une première partie avec les résultats des PCR SRY et Amel.
- une seconde partie avec les résultats des PCR SMC.

2. Outils de contrôle et témoins de réaction

a- Les contrôles

♦ Contrôle d'absence de contamination

La réalisation de témoins négatifs pour chacune des PCR atteste de l'absence de contamination.

♦ Contrôles d'amplification

Les contrôles d'amplification correspondent aux témoins positifs de chacune des PCR.

♦ Contrôles d'extraction

Les contrôles d'extraction sont obtenus par l'amplification des séquences des gènes *AmelX* et *SMCX*. L'absence de l'amplification des séquences *AmelX* et *SMCX* en présence du signal des témoins positifs (bonne réalisation de l'amplification) indique un défaut d'extraction.

La PCR SRY s1/ SRY as2 présente l'inconvénient de ne pas posséder de contrôle interne d'extraction. L'absence de signal peut donc se traduire par l'absence de la séquence SRY ou par un défaut d'extraction. L'extrait testé étant similaire pour chacune des PCR, les défauts d'extraction sont révélés par les PCR Amel et SMC.

Dans la situation où après vérification d'une bonne amplification (témoin positif) et d'une bonne extraction (contrôle interne des PCR Amel et SMC), nous n'obtiendrions pas de signal d'amplification de la séquence SRY, il nous faudrait refaire le test. En effet, cette situation peut correspondre soit à l'absence de séquence SRY dans le génome de l'animal testé, soit à une erreur de manipulation au cours de laquelle l'extrait n'a pas été ajouté au milieu réactionnel. Ainsi, en réalisant à nouveau le test il est possible d'écarter l'hypothèse d'une erreur de manipulation.

En cas de contrôle d'extraction et d'amplification positifs et d'absence du signal de la PCR SRY s1/SRY as2, le test sera renouvelé dans sa globalité pour exclure toute erreur éventuelle de manipulation.

b- Témoins de réaction

Les témoins de réaction, sont constitués des témoins postifs et négatifs.

● Le témoin positif a pour fonction de s'assurer des bonnes conditions de PCR et de fournir la hauteur précise des signaux pour l'interprétation des résultats de l'échantillon analysé. Il vient en remplacement des solutions ladder qui ont été utilisés lors de la mise au point des PCR. Ainsi, chacune des PCR devra présenter un témoin positif constitué par l'extrait d'ADN de chevaux mâles.

● Le témoin négatif, qui assure de l'absence de contamination, sera également réalisé pour chacune des PCR.

Ainsi, chaque résultat des PCR discrimant le sexe sera encadré par le témoin négatif et le témoin positif correspondant.

Un second témoin positif femelle peut être ajouté aux résultats obtenus avec les amorces SMC Xs3/SMC Ys5/SMC as2 tel que présenté dans les résultats (figure 27). Ce second témoin positif réalise avec le témoin positif mâle un encadrement permettant de distinguer précisément les signaux de 52 et 60 pb. Il faut effectivement pouvoir distinguer aisément les résultats d'une PCR obtenue à partir d'extrait de femelle (absence du signal de 52 pb et présence du signal de 60 pb), d'une PCR obtenue à partir d'extrait de mâle mais dont la réaction du contrôle interne n'aurait donné aucun signal (présence du signal de 52 pb et absence du signal de 60 pb). L'utilisation de deux témoins positifs mâle et femelle permet de réaliser la distinction entre les signaux de 52 et 60 pb.

Il est possible de réaliser au choix la PCR SMCXs9/SMC Ys5/SMC as2 ou la PCR SMC Xs3/SMC Ys5/SMC as2. La réalisation de ces deux PCR, garantit une détection fiable du gène *SMCY* puisque les résultats de l'une confirme les résultats de l'autre.

Il serait néanmoins possible de réaliser une seule de ces PCR. En l'occurrence, la PCR SMC Xs9/SMC Ys5/SMC as2 présente l'avantage d'obtenir des signaux plus éloignés donc plus facilement distinguable que pour l'autre PCR. Il faudra tenir compte de la présence d'un signal de moindre intensité non spécifique de 80 pb, qui n'altère aucunement la lecture et l'interprétation des résultats.

La PCR SMC Xs3/ SMC Ys5/ SMC as2 sera également réalisée lorsque la qualité des signaux obtenu avec l'autre PCR, ne permet une interprétation certaine du test. Cette seconde PCR sera réalisée avec un témoin positif mâle et femelle afin de distinguer aisément les signaux de 60 et 52 pb.

Le test comporte ainsi la réalisation successive de :
- **la PCR SRY s1/ SRY as2**
- **la PCR Amel s1/ Amel as2**
- **la PCR SMC Xs9/ SMC Ys5/ SMC as2.**
- **et éventuellement de la PCR SMC Xs3/ SMC Ys5/ SMC as2.**

3. Présentation des résultats du test

Nous avons présenté les résultats théoriques attendus à partir de l'extrait :
- de mâle sain XY (figure 28)
- de femelle saine XX (figure 29).

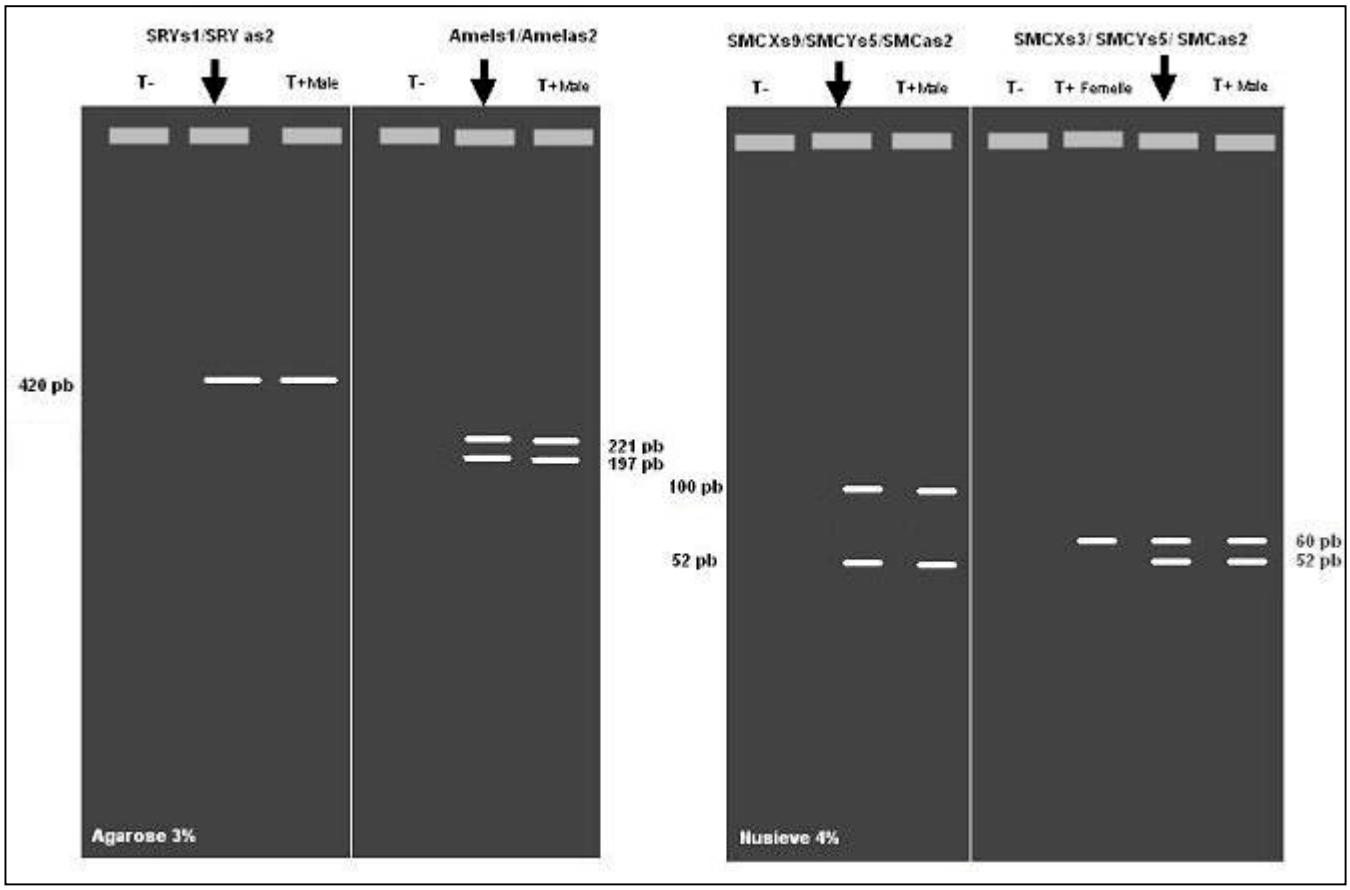


Figure 28 : Schéma des résultats du test obtenus chez un mâle XY.

T - : Témoin négatif.
T+ mâle : Témoin positif mâle.
T+ femelle : Témoin positif femelle.

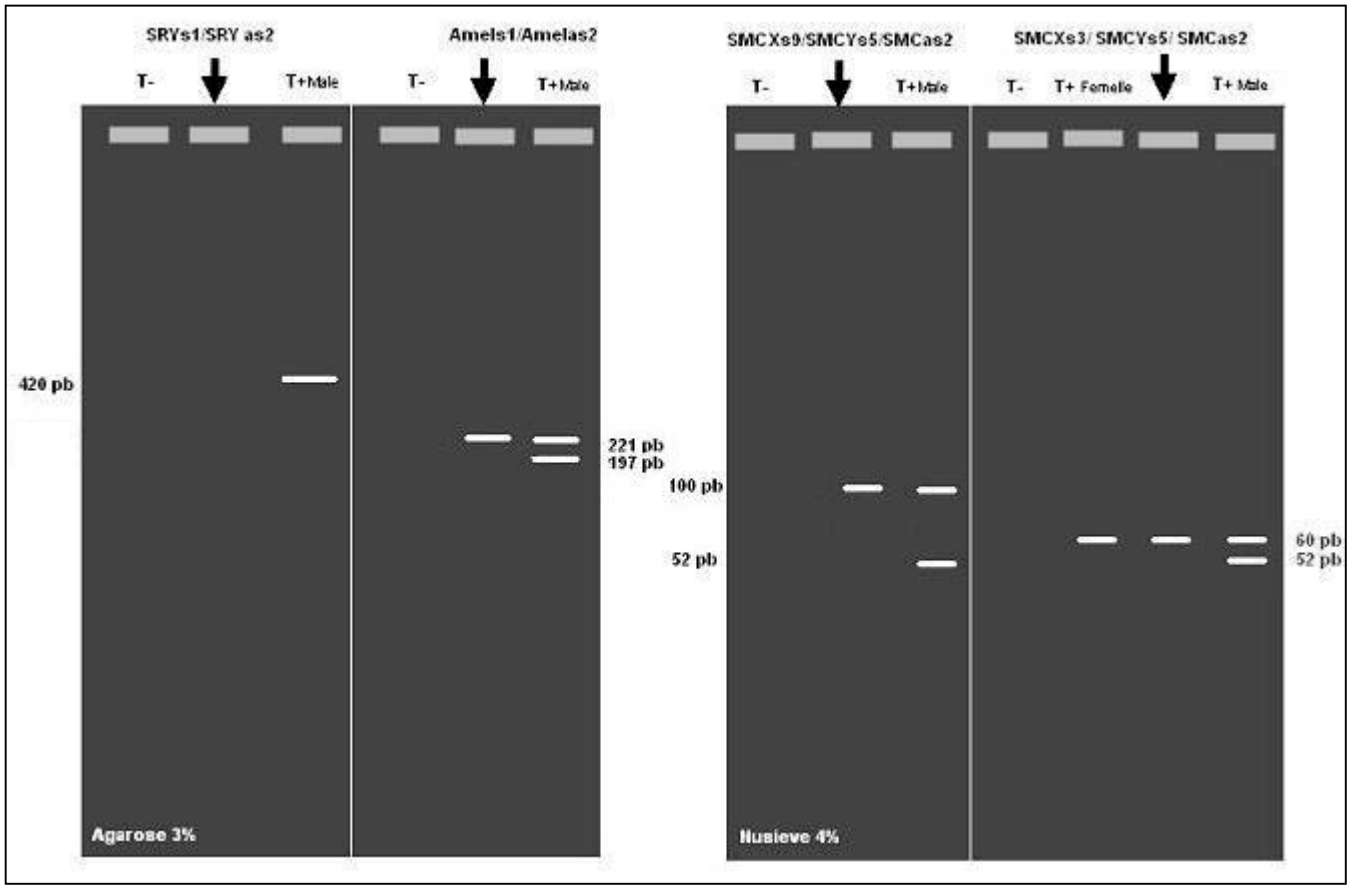


Figure 29 : Schéma des résultats du test obtenus chez une femelle XX.

T - : Témoin négatif.
T+ mâle : Témoin positif mâle.
T+ femelle : Témoin positif femelle.

C. INTERPRETATION DU TEST

1. Possibilités d'interprétation

Les différentes possibilités d'interprétation du test sont données dans le tableau 19.

Cette interprétation doit tenir compte des éventuels échanges génétiques intervenant entre le chromosome Y et le chromosome X ou les autosomes. La région contenant le gène *SRY* présente comme particularité d'avoir un haut taux de recombinaison génétique [65]. Ceci explique les cas de translocation du gène *SRY* seul (cas de réversion du sexe XY SRY négatif) décrits dans les précédentes parties.

Le gène *AmelY* a été localisé dans la portion distale du bras long du chromosome Y (figure 8) tandis que le locus SMCY n'a pas encore été localisé. Les homologues des gènes *AmelY* et *SMCY* sont retrouvés au niveau du chromosome X (gènes *AmelX* et *SMCX*). Les locus AmelY et SMCY sont ainsi vraisemblablement tous deux contenus dans la région pseudoautosomique du chromosome Y.

Etant donné la localisation distale du gène *AmelY* par rapport à *SRY*, nous pouvons nous interroger sur la possibilité d'une translocation conjointe de ces deux gènes. Ce remaniement chromosomique interesserait ainsi un nombre important de gènes situés entre les deux locus. La mise en évidence du gène *SMCY* permettrait de confirmer avec certitude la présence du chromosome Y. L'interprétation de ce test diagnostique incluant les gènes *SRY*, *AmelY* et *SMCY* repose sur l'hypothèse que ces trois gènes ne soient pas affectés par d'éventuels remaniements chromosomiques de façon concomittante.

Présence du gène *SRY*	Présence du gène *Amel Y*	Interprétation partielle	Présence du gène *SMCY*	Interprétation finale
OUI	OUI	Chromosome Y présent **ou** Chromosome Y absent mais présence des gènes transloqués	OUI	**Chromosome Y présent**
			NON	**Chromosome Y absent** + translocation* SRY et Amel
OUI	NON	Chromosome Y présent + translocation de Amel **ou** Chromosome Y absent +translocation SRY	OUI	**Chromosome Y présent** + translocation* de Amel
			NON	**Chromosome Y absent** + translocation* SRY
NON	OUI	Chromosome Y présent + translocation de SRY **ou** Chromosome Y absent +translocation Amel	OUI	**Chromosome Y présent** + translocation* de SRY
			NON	**Chromosome Y absent** + translocation* Amel
NON	NON	Chromosome Y présent + translocation de SRY et AmelY **ou** Chromosome Y absent	OUI	**Chromosome Y présent** + translocation* de SRY
			NON	**Chromosome Y absent**

Tableau 19 : Interprétations du test diagnostique.
(* translocation sur un chromosome X ou sur un autosome absent du pool chromosomique)

2. Interprétation en comparaison des autres examens complémentaires

a- Par rapport à l'imagerie médicale

Bien que le domaine de l'imagerie médicale soit en constante progression, l'interprétation d'une image échographique de l'appareil génital dans le cadre d'une suspicion d'intersexualité demeure délicate. En effet, cette interprétation s'avère difficile du fait d'une part de la qualité du matériel employé (sonde spécifique) et d'autre part des aptitudes du manipulateur.

De plus, les anomalies de développement occasionnées peuvent soit correspondre à des variations anatomiques de trop petite taille pour être facilement visualisables, soit n'affecter que l'organisation tissulaire d'un organe (présence d'un ovotestis par exemple) rendant difficile toute interprétation.

b- Par rapport à l'histologie

L'histologie atteste de la présence de tissu testiculaire et/ou ovarien au sein des gonades. Elle permet de classer les différents cas d'intersexualité (hermaphrodisme, pseudohermaphrodisme mâle ou femelle).

Il peut être intéressant de réaliser l'identification du chromosome Y par PCR, à partir d'extrait d'ADN de tissu gonadique. Ces résultats seraient comparés à l'analyse histologique des gonades, et permettrait ainsi d'évaluer la corrélation entre le degré de différenciation tissulaire mâle et les gènes présents.

c- Par rapport à l'étude du caryotype

L'étude du caryotype requiert l'acheminement rapide des prélèvements sanguins héparinés sous couvert du froid. La vitalité des cellules doit effectivement être préservée au cours de l'acheminement des prélèvements. Sa réalisation nécessite un délai d'environ 48 heures. La PCR, est une technique particulièrement sensible qui présente une plus grande simplicité d'emploi. Elle ne nécessite pas l'obtention de cellules vivantes et les résultats sont obtenus très rapidement. La PCR est donc un bien meilleur outils de dépistage que le caryotype.

L'étude du caryotype présente l'avantage de déterminer le nombre de chacun des chromosomes X et Y présents au sein d'une cellule et de déceler les animaux mosaïques. Elle participe donc grandement à la compréhension des mécanismes cellulaires à l'origine de l'intersexualité. La PCR, outil à l'échelle moléculaire, perd cet avantage. Ainsi un caryotype pourra être réalisé pour les chevaux intersexués détectés par PCR.

V. INTERET DU TEST PCR DANS LE CADRE DE L'INTERSEXUALITE EQUINE

A. EN MEDECINE VETERINAIRE

1. Diagnostic individuel d'intersexualité

Les chevaux intersexués sont généralement infertiles. Les anomalies morphologiques ou anatomiques associées à l'intersexualité peuvent être discrètes. L'hypothèse d'intersexualité ne peut donc pas être exclue au terme de l'examen clinique de l'animal.

Ce test PCR est un nouvel outil diagnotique mis au service des praticiens afin d'apporter des éléments de réponse lors de troubles de la fertilité. Il peut également être utilisé lors de transaction de jeunes chevaux futurs reproducteurs afin de garantir leur potentiel reproducteur.

2. Etude de l'intersexualité au sein d'une population

a- Dépistage des cas intersexués

Ce test peut être utilisé dans le cadre d'un dépistage afin d'accroitre le nombre de cas intersexué recruté. Ceci permettrait d'approfondir l'étude de l'intersexualité équine.

b- Réalisation d'une étude statistique sur l'intersexualité équine

Une étude statistique peut être entreprise afin d'évaluer la prévalence de certaines anomalies chromosomiques ou génétiques affectant les gonosomes. Le test serait ainsi utilisé sur les chevaux issus d'un échantillonnage aléatoire. Ceci permettrait d'estimer notamment la prévalence des cas de réversions du sexe XY, qui correspondent à l'anomalie la plus fréquente après la monosomie X.

B. EN RECHERCHE FONDAMENTALE

1. Compréhension du mécanisme de réversion du sexe.

Une fois identifiés, les cas de réversion du sexe XX et XY pourront faire l'objet d'une étude génétique approfondie pour détecter et comprendre les mécanismes mis en cause. Il serait ainsi intéressant de séquencer le gène *SRY* des juments XY SRY positives afin d'évaluer la présence d'éventuelles mutations de sa séquence.

2. Compréhension des phénomènes de remaniement du chromosome Y équin

Il serait envisageable de quantifier la fréquence de translocation des gènes *SRY* et AmelY et d'apprécier finalement l'importance des phénomènes de remaniement du chromosome Y équin. Ceci trouve son intérêt dans l'étude des différents mécanismes ayant conduit à l'obtention chez cette espèce, du chromosome Y, le plus hétérogène qui soit dans la lignée des Mammifères [62].

C. PERSPECTIVES

La technique de PCR, bien que déjà performante, évolue toujours de sorte que de nouveaux procédés technologiques apparaissent régulièrement. Les derniers en date, concernent la mise au point de la PCR quantitative.

Les PCR que nous avons réalisées, ne nous fournissent qu'un résultat qualitatif, c'est à dire la présence d'un signal ou non. Il serait donc fort intéressant d'utiliser ce nouveau procédé de PCR quantitative afin de pouvoir évaluer à l'instar du caryotypage, la proportion relative de chacun des gonosomes de l'échantillon.

Cette PCR quantitative nous apporterait donc de manière simple, rapide et efficace, de nouvelles informations pour l'étude de l'état intersexué en espèce équine.

CONCLUSION

Le développement et la différenciation sexuels résultent d'un processus séquentiel complexe faisant intervenir plusieurs gènes dont les mécanismes de régulation restent incomplètement élucidés. De nombreuses anomalies du processus de différenciation mâle conduisant à l'intersexualité ont pu être identifiées chez l'homme et concernent d'autres espèces de Mammifères.

En dépit de l'absence d'étude statistique, il semblerait que le pseudohermaphrodisme mâle équin soit la forme d'intersexualité la plus fréquente devant le pseudohermaphrodisme femelle et l'hermaphrodisme vrai. Néanmoins, le nombre de ces cas serait probablement sous-évalué du fait de manifestations morphologiques relativement discrètes. L'hypothèse diagnostique d'intersexualité doit ainsi être évoquée face à des troubles persistants de la fertilité et ne peut en aucun cas être exclue à la simple réalisation de l'examen clinique.

La réalisation de caryotypes est fondamentale dans l'étude de l'intersexualité, mais demeure néanmoins insuffisante pour l'identification d'anomalies génétiques et pour une utilisation en dépistage de routine. C'est pourquoi, nous avons développé un test de diagnostic moléculaire, permettant d'identifier aisément la présence de séquences du chromosome Y dont le gène SRY. Ainsi, ce test permet de déceler la présence des gènes SRY, AmelY et SMCY portés en trois régions distinctes du chromosome Y et d'évaluer l'importance des remaniements affectant le chromosome Y qui sont suceptibles d'interférer avec la différenciation du sexe de l'animal.

La réalisation de ce test apporterait ainsi non seulement un élément de réponse au clinicien, mais permettrait aussi d'accroître le recrutement des cas et ainsi d'approfondir l'étude des mécanismes responsables de l'intersexualité en espèce équine.

Le professeur responsable de l'Ecole
Nationale Vétérinaire de Lyon.
Professeur F. GRAIN

Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Lyon.
Docteur S. MARTINOT

Le Président de la thèse.
Professeur J.F. GUERIN

Vu et permis d'imprimer
Lyon, le
- 3 JUIN 2005

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur D. VITAL-DURAND

Annexes

	Race	Age	Caractéristiques comportementales	Anomalie morphologique	Caractéristiques anatomiques		Type de gonade	Caryotype	Réf. date
					Dérivés des canaux de Wolff	Dérivés des canaux de Müller			
HERMAPHRODISME LATERAL	Quarter Horse	4 ans	Comportement de femelle. Anoestrus	Type femelle avec clitoris hypertrophié	Pseudo épididyme à gauche	Pseudo-oviducte droit. Utérus atrophié.	Ovaire à droite et testicule à gauche	XX	[105] 1990
	Arabe	7 ans	Comportement d'étalon	Type femelle avec clitoris hypertrophié	?	?	Testicule à droite et ovaire à gauche.	XX (SRY neg)	[22] 2000
NON DETERMINE (PROBABLE BILATERAL)	Type Arabe	3 ans	Comportement d'étalon	Type mâle avec cryptorchidie	Tissu épididymaire	?	● 2 masses canaux inguinaux droit et gauche : tissu ovarien avec tissu épididymaire. ● Testicules : - gauche intra-abdominal latérocranial au canal inguinal (allure nécrotique) - droit intra-abdominal classique.	XX / XY	[85] 1976
HERMAPHRODISME BILATERAL	Poney Welsh	1 an	Absence de comportement d'étalon	Type mâle avec atrophie du pénis et absence de scrotum et de testicules palpables	Epididymes Canaux déférents	Utérus atrophié	Deux ovotestis (prédominance ovarienne à gauche et testiculaire à droite)	XX/XY (chimère)	[35] 1981
	Trotteur	1 an	Absence de comportement d'étalon	Type mâle avec atrophie du pénis et absence de scrotum et de testicules palpables Présence d'une pseudo-vulve	Epididymes présents	Utérus atrophié.	2 ovotestis abdominaux	XO/XY (chimère ?)	[35] 1981
	Paso Fino	16 mois	Comportement d'étalon	Type femelle avec clitoris hypertrophié	Absents	Absents	2 ovotestis	XX (SRY négatif)	[87] 1997

Annexe 1 : Hermaphrodites vrais équins recensés dans la littérature.

Race	Age	Caractéristiques comportementales	Anomalie morphologique	Caractéristiques anatomiques		Type de gonade	Caryotype	Réf. date
				Dérivés des canaux de Wolff	Dérivés des canaux de Müller			
Croisé	3 ans	-	Pénis atrophié en région périnéale	Absence de prostate et de vésicules séminales	Utérus vestigial	Testicules en position sous cutanée de part et d'autre de la ligne médiane (en dehors des canaux inguinaux).	-	[118] 1969
Croisé Percheron	4 ans	-	Micropénis Monorchidie Présence d'une vulve en région périnéale	Présences des épididymes et canaux déférents	-	Testicule droit atrophié en localisation scrotale. Testicule gauche dégénéré d'allure kystique dans le canal inguinal.	XO/XX/XY/XXY	[6] 1969
Belge	2 ans	Comportement d'étalon	Pénis érectile atrophié en région périnéale. Cryptorchidie.	-	Aucun utérus palpable	Testicules abdominaux.	peau : XX testicule et sang : XY et possible XYY.	[34] 1974
Pur-sang	12 ans	Comportement d'étalon	Pénis et prépuce atrophiés en région périnéale	-	Absence de vagin ou d'utérus à la palpation	Testicules en position inguinale.	XO/XX	[52] 1980
Palomino Quarter Horse	2 ans	Comportement d'étalon	Pénis et prépuce atrophiés. Gynécomastie	Vésicules séminales, Prostate et Glandes bulbo-urétrales atrophiées	-	Testicules atrophiés en localisation inguinale	XX (SRY négatif)	[22 et 26] 2000 et 1994

Annexe 2 : Pseudo-Hermaphrodites mâles équins (avec apparence générale de mâle)

Race	Age	Caractéristiques comportementales	Anomalie morphologique	Caractéristiques anatomiques		Type de gonade	Caryotype	Réf. date
				Dérivés des canaux de Wolff	Dérivés des canaux de Müller			
Croisé	2 ans	Comportement d'étalon (attiré par femelles en œstrus et agressivité)	Large clitoris érectile	-	Vagin borgne Absence d'utérus et de cervix	Testicules atrophiés retenus dans les canaux inguinaux	-	[4] 1965
-	1 an	-	Vulve normale. Clitoris péniforme. Hypospadias.	-	Utérus présent	Testicules hypoplasiques intra-abdominaux.	XX	[13] 1967
North Swedish	1,5 an	Comportement d'étalon	Vulve normale Clitoris péniforme	-	Utérus présent	Testicules hypoplasiques intra-abdomninaux	XX	[13] 1967
Nord Sevensk	1,5 an	Comportement d'étalon	Vulve normale Micropénis Gynécomastie	-	Aucun utérus palpable	Testicules en position inguinale	-	[69] 1969
Arabe	1 an	Absence de comportement de type masculin	Vulve rudimentaire. Clitoris péniforme.	Epididymes et canaux déférents immatures	-	Testicules en position inguinale.	XX (sur biopsie osseuse)	[39] 1970
Nonius	3 ans	Comportement agressif	Vulve normale. Micropénis.	-	Utérus atrophié	Testicules atrophiés en région inguinale.	XXXY	[41] 1970
Poney Welsh	2 ans	Comportement d'étalon.	Vulve normale. Clitoris péniforme érectile	Epididymes atrophiés	Vagin borgne. Absence d'utérus.	Testicules intra-abdominaux.	XX/XXY	[14] 1972
Poney Welsh	-	Comportement d'étalon	Vulve normale Clitoris péniforme érectile	-	Vagin atrophié Absence d'utérus.	Testicules intra-abdominaux.	XX/XXY	[15] 1975
Arabe	6 mois	Comportement d'entier (attiré par femelles en œstrus)	Vulve normale. Clitoris péniforme érectile.	-	Vestibule borgne. Absence d'utérus.	Testicules en position inguinale.	XO?/XX/XX Y	[37] 1976

Annexe 3 : Pseudo-Hermaphrodites mâles équins (avec apparence générale de femelle)

Quarter Horse	7 ans	Comportement d'étalon (agressivité, saillies)	Appareil génital externe de type femelle sans anomalie.	-	Vagin borgne. Utérus présent.	Testicules intra-abdominaux.	XY	[66] 1976
-	2 mois	-	Vulve normale. Clitoris hypertrophié. Monorchidie	-	-	1 testicule en position abdominale 1 testicule en position scrotale	XX	[cité par 94] 1987
Andalous	7 ans	Comportement d'étalon (agressivité, saillies)	Vulve normale. Micropénis érectile. Anoestrus permanent.	-	Vagin atrophié. Cervix & utérus non palpables.	2 testicules palpables en région inguinale.	XXX	[91] 1989
Pur-sang	3 ans	Comportement d'étalon (agressivité)	Raphé proéminent Clitoris hypertrophié érectile	-	Vagin & utérus non palpables	Testicules inguinaux (droit atrophié)	XX/XXY Chimère	[98] 1990
Paso Fino	6 ans	Comportement d'étalon (agressivité)	Appareil génital externe de type féminin sans anomalie.	Epididymes incomplets	Utérus non palpable. Vagin borgne	Testicules hypoplasiques intra-abdominaux.	XY (Y de taille réduite)	[28] 1992
Trotteur	6 ans	Comportement d'étalon	Appareil génital externe de type féminin sans anomalie.	-	Vestibule borgne. Absence de vagin,utérus et cervix.	Testicules palpables.	XX	[23] 1993
Appaloosa	2 ans	Comportement d'étalon	Conformation mâle. Gynécomastie. Développement vulvaire périnéal. Clitoris péniforme.	Présence des épididymes	-	Testicules apparemment en position inguinale (testicule droit palpable contrairement au gauche).	XX SRY négatif	[22 et 88] 2000 et 1995
Croisé	-	-	Appareil génital externe de type femelle sans anomalie.	-	-	Testicules intra-abdominaux	XX	[22] 2000
Arabe	1 an	Comportement d'étalon	Vulve avec micropénis érectile	-	-	Testicules présents en région inguinale	XO/XYY	[93] 2001

Annexe 4 : Pseudo-Hermaphrodites mâles équins (avec apparence générale de femelle) suite.

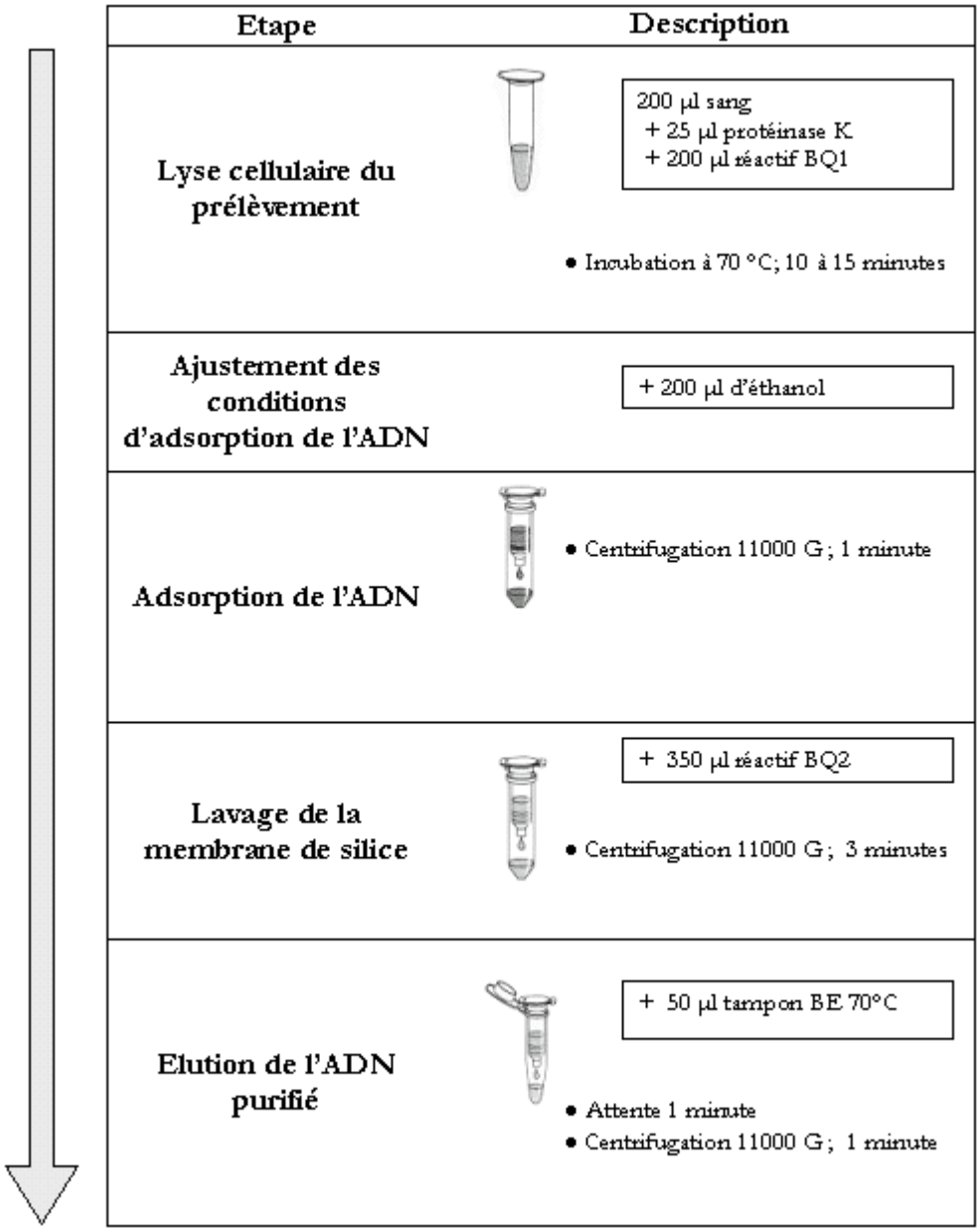
Race	Age	Caractéristiques comportementales	Anomalie morphologique	Caractéristiques anatomiques		Type de gonade	Caryotype	Réf. date
				Dérivés des canaux de Wolff	Dérivés des canaux de Müller			
Pur-sang	15 ans	Chaleurs irrégulières	Apparence de femelle normale	-	Appareil génital normal	Ovaires atrophiés (3 x 1 cm), de nature fibreuse, sans ovocytes. (histologie réalisée)	XX / XX +fragment	[24] 1975
Quarter Horse	-	Aucun comportement de chaleur	Apparence de femelle normale	-	Utérus et cervix flasques	Ovaires atrophiés (<20 mm)	XO/XY	[55] 1977
Poney	-	Aucun cycle manifesté	Apparence de femelle normale	-	Utérus et cervix flasques	Ovaires atrophiés (< 1 cm) lisses et fermes (sans follicules palpables)	XY sex reversal	[55] 1977
Arabe	5 ans	-	Apparence de femelle normale	-	Petit utérus Cervix flasque	Ovaires atrophiés (cheval issu de gestation gémellaire hétérosexuée. Pas de chimérisme leucocytaire).	XY (sex reversal ?)	[110] 1979
Poney Shetland	-	Aucun comportement de mâle	Apparence de femelle normale	-	Utérus atrophié Cervix flasque	Ovaires atrophiés (10 x 5 x 3 mm)	XY sex reversal	[110] 1979
-	5 ans	Pas de chaleurs depuis plusieurs années (après avoir mis bas une pouliche XX)	Apparence de femelle normale	-	Utérus atrophié	Ovaires atrophiés (2 x 2 cm)	XY (présence antigène HY)	[104] 1980

Annexe 5 : Pseudo-Hermaphrodites femelles équins.

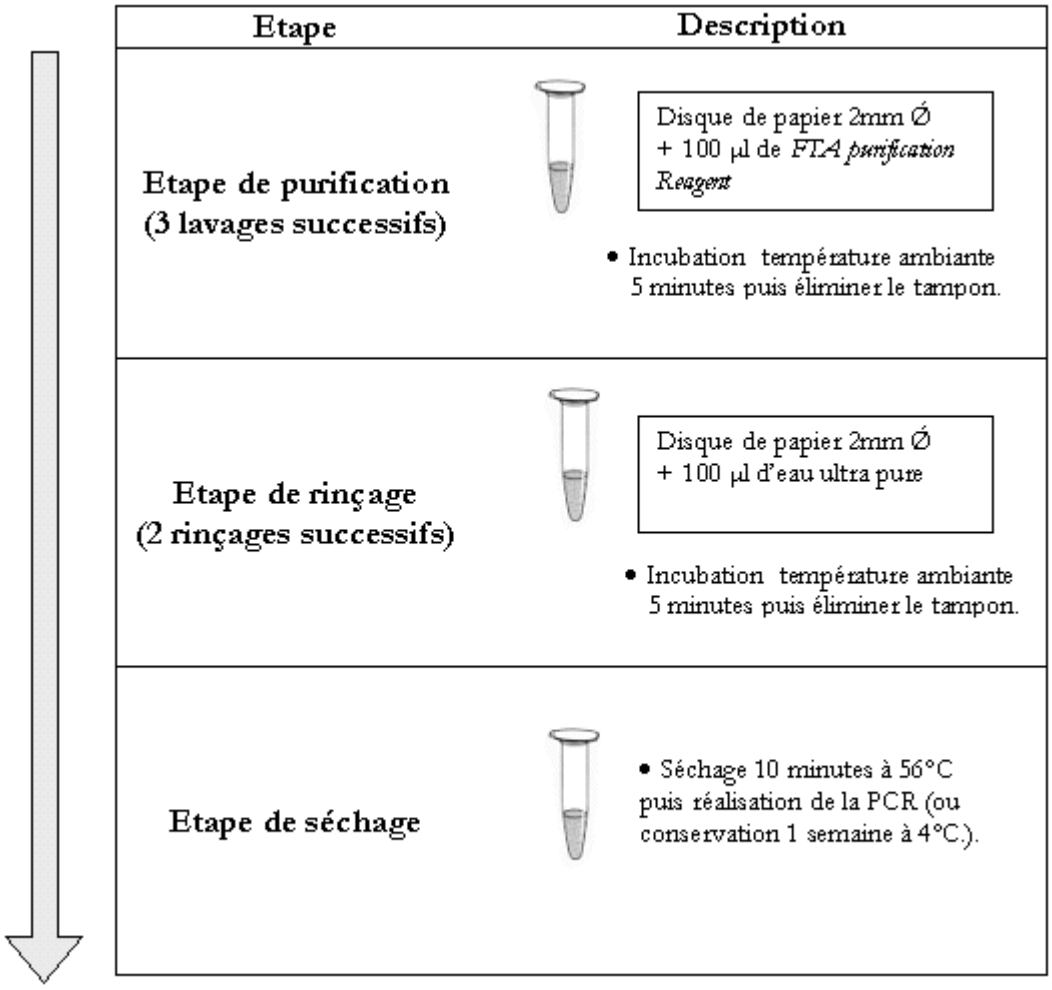
Selle Français	6 ans	Comportement de femelle avec probable cyclicité régulière	Apparence de femelle normale	-	Jugés comme normaux	Ovaires très atrophiés	XY Réversion du sexe	[30] 1984
Selle Français	13 ans	Agressivité intra et interspécifique Cycles probablement réguliers	Apparence de femelle normale	-	Jugés comme normaux	Ovaires non palpables.	XY Réversion du sexe	[30] 1984
Pur-sang américain	6 ans	Absence d'œstrus	Apparence de femelle normale	-	Jugés comme normaux	Ovaires atrophiés (1,5 cm x 1,2 cm) Sans follicules	XY Réversion du sexe	[97] 1986
Arabe	8 ans	Cyclicité irrégulière.	Apparence de femelle normale	-	Jugés comme normaux	Ovaires atrophiés sans follicules.	XO/XX/XXX/XXY/XXXY/XXYY Chimère ?	[67] 1990
Trotter	14 ans	-	Apparence de femelle normale	-	Vagin et cervix flasques	Ovaires atrophiés	XO/XY (10 : 40)	[108] 1990
Pur-sang	> 5 ans	Absence d'œstrus	Stature importante Appareil génital externe type femelle	-	Appareil génital flasque	Ovaires atrophiés (3 cm x 1 cm)	XY Réversion du sexe	[92] 1993
Trotteur	5 ans	Comportement de femelle avec cyclicité régulière	Apparence de femelle normale	-	Vagin, cervix normaux et atrophie glandulaire utérine	Ovaires atrophiés de nature fibreuse sans follicules (histologie réalisée)	XY SRY négatif Réversion du sexe	[77] 1999
Pur-sang		Absence d'œstrus	Apparence de femelle normale	-	Jugés comme normaux	Ovaires probablement hypoplasiques (absence de tissu testiculaires par dosage testostérone après stimulation hCG)	XY SRY négatif	[2] 1999

Annexe 6 : Pseudo-Hermaphrodites femelles equins (suite).

Annexe 7 : Protocole d'extraction du kit NucleoSpin® Blood QuickPure.



Annexe 8 : Protocole d'extraction avec le papier Whatman.



Annexe 9 : Références des réactifs

	Dénomination	*Fournisseur*	*Référence*
Extraction de l'ADN	NucleoSpin®blood quick pure	Macherey-Nagel	740569.50
	Papier Whatman®	Whatman	Echantillon
Mélange réactionnel de PCR	RED Taq® DNA polymerase without MgCl2	Sigma	D2812
	Ultrapure dNTP set ® 2'Deoxynucleoside 5'triphosphate (100mM)	Amersham Pharmacia Biotech	27-2035-01
	Amorces	Eurogentec	
Electrophorèse	Agarose	Sigma	A-6877
	Nusieve®	FMC	50082
	TAE 10x	Sigma	T-9650
	Bromure d'éthidium	Sigma	E-1510
	Xylène Cyanol FF	Sigma	X-4126
	Bleu de bromophenol	Sigma	B-5525
	Orange G.	Sigma	O-3756
	100 Base Pair ladder	Amersham pharmacia biotech	27-4001
	PCR low Ladder 20-1000pb	Sigma	P-1598

Annexe 10 : Composition du milieu réactionnel.

Réactif	Concentration réactif	Concentration du milieu final	Volume de réactif utilisé (µl)
H20		qsp 49 µl	37,1
Tampon	10 X	1X	5
MgCl2	25 mM	1,5 mM *	3
dNTP	10 mM	200 µM	1
Amorce sens	10 µM	0,2 µM	1
Amorce antisens	10 µM	0,2 µM	1
Taq polymérase	1 U/µl	0,9 U/ 50 µl	0,9

TOTAL	49 µl
Extrait ADN	1 µl

* variable selon le niveau de stringence désiré

Annexe 11 : Séquence du gène SRY équin [121].

LOCUS : AB004572 1403 bp mRNA MAM 28-FEB-2001
DEFINITION : Equus caballus mRNA for sex-determining protein
ORGANISME : Equus caballus (Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae; Equus).
CHROMOSOME : "Y"
GENE : "SRY" CDS<100…771>

Protéine

"MSRVSNSDNYSLAGQQHTVLGSGRTSSLLWTSNPGSHFRSETRGNGRENGQDRVKRPM
NAFMVWSRDHRRKVALENPQLQNSEISKRLGCQWKMLTEAEKLPFFEEAQRLRAMHQEK
YPDYKYRPRRKAKMPQKSDKPLPQTPLLHCAGRRTYTSTSGCPFLIHGRLFLRATQSQTGG
AVKPFAAGATAISALQQELSQQHRTLRCHSGNVGYADIRRRSLSL"

ADN

```
   1  ctagaataac cttggaaaag taagttaatt ttcccaacgc tttatcttcg cattttgcta
  61  ccaccctcct cttcaacggt gccatcttaa gcttctgcta tgtccagagt atccaacagc
 121 gataattaca gtctagcagg acagcaacat accgttctcg gctctgggag aacctcatcc
 181 ctactttgga cgagcaatcc tggctcacat tttcggagtg aaacaagagg aaatggtaga
 241 gagaacggcc aggaccgtgt caaacgaccc atgaatgcat tcatggtgtg gtctcgtgat
 301 cacaggcgca aggtcgctct agagaatccc caactgcaaa actcagagat cagcaagcgg
 361 ctgggatgcc agtggaaaat gcttacggaa gccgaaaaat tgccattctt cgaggaggca
 421 cagagactac gggctatgca tcaagagaaa tacccggact ataaatatcg acctcgtcgg
 481 aaggccaaga tgccacagaa aagtgacaaa ccgcttccgc agactcctct tctacactgt
 541 gcgggcaggc gcacgtacac gtcgacgagt ggttgtccct ttctcattca cggacgactg
 601 ttcttgaggg ccacacagtc acaaacggga ggagcggtta aaccattcgc ggccggggcc
 661 acagctattt cggcgctgca acaggagctg tcacagcagc accgcaccct gcgttgccat
 721 tcgggtaacg ttggctacgc agacatacgc agacgttccc tttcactgta atttaccctc
 781 cggactttct cacggtgatt ttccttgatt tccttactgg tggcttcaga gtccctgttc
 841 ggctctattt tcgtatttct tctggagccc cagcgtatca acaccagtga aattttgagt
 901 tccaaggtca gctgtttttc tgttaatgga acagtttgta atctaatttt agtcttccag
 961 aggttgtcct ttaaatagcg ctaagcatat attgatacac taataatcgc cagcatagat
1021 cacagaattc taactcttta ttttaaatac tataagtcac aaacatagtg gagagaagca
1081 tgcacaaaat tatgctatgg aaaaattgtt gcgttttgat gggaaactgc gtacgtctac
1141 agtagtccct tctcgacggt ctgttcattg gtctttcagc taccttgcgc gtcttggtaa
1201 actgcacata attaacgcat ggaaatgtaa attctttcct gttggatagt ttatgttacc
1261 tcccctcccc gctgtgagaa accagtcttg cggccctttg ctattcaatt cttttactcc
1321 gcacaaaact gagagcttcg atgcgctgtg aaccggttat attctctaat ctgggtaaaa
1381 taaaatgttttatttaactc gtg
```

Annexe 12 : Séquence du gène AmelY équin [122]

LOCUS : AB032194 765 bp mRNA MAM 28-FEB-2001
DEFINITION : Equus caballus AMELY mRNA for amelogenin.
ORGANISME : Equus caballus (Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae; Equus).
CHROMOSOME : "Y"
GENE : "AMELY" CDS<70…624>

Protéine
"MGTWILFASLLGAAFAMPLYLILGTLGYINFSYEVLTPLKWYQS
LIRQPYTSYGYEPMGGWLHHQIIPVLSQQNPSNHALQPHHHIPMVSAQHPVVPQQPMM
PLPGQHSMVPTQHHQPNLPPPVQQPQPHQPIQPQPPLHPIQPLPPQPPLPPIFPLQPL
PPMLPDLPLEAWPATDKTKREEVD"

ADN
```
   1  ggatcaggca tccctgagtt tcagacagaa acttactcgg aatacgtata ttcaatgggc
  61 catcaagaaa tggggacctg gattttgttt gccagcctcc tgggagcagc ctttgctatg
 121 cccctatatc tcatcctggg caccctgggt tatatcaact tcagctatga ggtgcttacc
 181 cctctgaagt ggtaccagag cttgatcagg cagccgtaca cttcctatgg ttacgaaccc
 241 atgggtggat ggctgcacca ccaaatcatc cccgtgctgt cccagcagaa tccctcaaat
 301 cacgccttgc agcctcatca ccatatcccc atggtgtcgg ctcagcaccc tgtggtcccc
 361 cagcaaccaa tgatgccact tcctggccaa cactccatgg ttccaaccca acaccaccag
 421 ccaaacctcc ctccacctgt ccagcagccc cagcctcacc agcccatcca gcctcagcca
 481 cctctgcacc ccatccagcc cctgccgcca cagccacctc tgcctccgat attccccttg
 541 cagcccttgc cccctatgct tcctgacctg cctctggaag cttggccagc aacagacaag
 601 accaagcggg aggaagtgga ttaaaagatc agaaactgag aagcagatac ttcagttgct
 661 ttcagaatga cacaagaaca caatgatttg tgcctatcat cacttagtaa attcgtgact
 721 aaaattagtt acaattacaa aacaataaat ggtttttaaa atcaa
```

Annexe 13 : Séquence du gène AmelX équin [123].

LOCUS : AB032193 789 bp mRNA linear MAM 28-FEB-2001
DEFINITION : Equus caballus AMELX mRNA for amelogenin.
ORGANISME : Equus caballus (Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae; Equus).
CHROMOSOME : "X"
GENE : "AMELX" CDS<70…648>

Protéine
"MGTWILFASLLGAAFAMPLYLILGTLGYINFSYEVLTPLKWYQS
LIRQPYTSYGYEPMGGWLHHQIIPVLSQQNPSNHALQPHHHIPMVSAQHPVVPQQPMM
PLPGQHSMVPTQHHQPNLPPPVQQPFHPQPVQPQPHQPIQPQPPLHPIQPLPPQPPLP
PIFPLQPLPPMLPDLPLEAWPATDKTKREEVD"

ADN
```
   1 ggatcaggca tccctgagtt tcagacagaa acttactcgg aatacgtata ttcaatgggc
  61 catcaagaaa tggggacctg gattttgttt gccagcctcc tgggagcagc ctttgctatg
 121 cccctatatc tcatcctggg caccctgggt tatatcaact tcagctatga ggtgcttacc
 181 cctctgaagt ggtaccagag cttgatcagg cagccgtaca cttcctatgg ttacgaaccc
 241 atgggtggat ggctgcacca ccaaatcatc cccgtgctgt cccagcagaa tccctcaaat
 301 cacgccttgc agcctcatca ccatatcccc atggtgtcgg ctcagcaccc tgtggtcccc
 361 cagcaaccaa tgatgccact tcctggccaa cactccatgg ttccaaccca acaccaccag
 421 ccaaacctcc ctccacctgt ccagcagccc ttccaccccc agcctgtcca gccgcagcct
 481 caccagccca tccagcctca gccacctctg caccccatcc agcccctgcc gccacagcca
 541 cctctgcctc cgatattccc cttgcagccc ttgcccccta tgcttcctga cctgcctctg
 601 gaagcttggc cagcaacaga caagaccaag cgggaggaag tggattaaaa gatcagaaac
 661 tgagaagcag atacttcagt tgctttcaga atgacacaag aacacaatga tttgtgccta
 721 tcatcactta gtaaattcgt gactaaaatt agttacaatt acaaaacaat aaatggtttt
 781 taaaatcaa
```

Annexe 14 : Séquence du gène SMCY équin [124].

LOCUS : ECU52364 1036 bp mRNA MAM 06-MAR-1997
DEFINITION : Equus caballus SMCY mRNA.
ORGANISME : Equus caballus (Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae; Equus).
CHROMOSOME : "Y"
GENE : "SMCY" CDS<1..<1036

Protéine

"PIAEKSGICKIRPPADWQPPFAVEVDNFKFTPRIQRLNELEAQTRVKLNYLDQIAKFWEIQG
SSLKIPNVERKILDLYSLSKIVMEEGGYEAICKDRRWARVAQRLNYPPGKNIGSLLRSHYERII
YPYEMFQSGANLVPCDTHPFDNEEKDKEYKPHSIPLRQSVQPSKFSSYSRRAKRLQPDPE
PTEEDIERNPELKKLQIYGAGPKMMGLGLVPKDKTLRKKDKEGVICPPAVIMEEEPSRVGKV
MSALPKEDLSHSLEPCTKMTMQLRKNHSSSQFIDSYVCRMCSRGDEDDKLLLCDGCDDNY
HIFCLLPPLPEIPRGVWRCPKCIMAE CKRPPEAFGFE"

ADN

```
   1 gcccatcgcg gagaagtcgg gtatttgcaa gattcgtcca cccgcggact ggcagcctcc
  61 ctttgcagta gaagttgaca atttcaagtt tactcctcgc atccagcggc taaatgaatt
 121 agaggctcag accagggtaa aactgaatta tttggatcag attgcaaaat tctgggaaat
 181 ccaaggttct tcattaaaaa ttcccaatgt ggagcggaag atcttggacc tctacagcct
 241 tagtaagatt gtgatggagg aaggtggcta tgaagccatc tgcaaggatc gtcgatgggc
 301 ccgggttgcc cagcgtctca actacccacc aggcaaaaac attggctcgc tgctaagatc
 361 tcactatgag cgcatcattt acccttatga aatgtttcag tctggagcca accttgtgcc
 421 atgtgacact cacccatttg acaatgagga aaaagacaaa gaatacaaac cccacagcat
 481 tccccttaga cagtctgtgc agccttccaa gttcagcagc tatagtcggc gggcaaaaag
 541 acttcagcct gatccagagc ccacagagga ggacattgag aggaatccag aactgaagaa
 601 gctgcaaatc tatggggcag gtcccaagat gatgggcttg ggccttgttc ccaaggataa
 661 gactttacgg aagaaagata aagaaggagt catatgcccc cccgctgtta taatggagga
 721 ggaaccaagt agggttggga aagtgatgtc agcattgccg aaggaggact tgagtcacag
 781 cctagagccc tgcaccaaga tgaccatgca gctacggaag aatcacagca gttcccagtt
 841 tattgactca tatgtttgcc gaatgtgctc ccgaggggat gaagacgata agctacttct
 901 ttgtgatggc tgtgatgaca attaccacat cttctgccta ttgccacccc ttcctgaaat
 961 ccccagaggg gtctggaggt gcccaaagtg tatcatggcg gagtgtaaga ggccgcctga
1021 agcctttggc tttgaa
```

Annexe 15 : Séquence du gène SMCX équin [125].

LOCUS : ECU52363 929 bp mRNA MAM 06-MAR-1997
DEFINITION : Equus caballus SMCX mRNA.
ORGANISME : Equus caballus (Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla; Equidae; Equus).
CHROMOSOME ="X"
GENE = "SMCX" CDS<1..<929

Protéine

"PIAEKSGICKIRPPADWQPPFAVEVDNFRFTPRIQRLNELEAQTRVKLNYLDQIAKFWEIQG
SSLKIPNVERRILDLYSLSKIVVEEGGYEAICKDRRWARVAQRLNYPPGKNIGSLLRSHYERI
AYPYEMYQSGANLVQCNTRPFDNEEKDKEYKPHSIPLRQSVQPSKFNSYGRRAKRLQPDP
EPTEEDIEKNPELKKLQIYGAGPKMMGLGLMAKDKTLRKKDKEGPECPPTVVVKEESGSDV
KVESTSPKTFLESKEELSHSPEPCTKMTMRLRRNHSNAQFIESYICRMCSRGDEDDKLLLC
DG"

ADN

```
   1 acccatcgct gagaagtcgg gcatttgcaa gatccgccca cccgcggact ggcagccacc
  61 ctttgctgta gaagtggaca acttcaggtt tactccccga atccagaggc tgaatgaact
 121 agaggcccaa acaagagtga aactgaacta cttggaccag attgccaaat tctgggaaat
 181 ccagggctcc tctttaaaga ttcctaatgt agaacggcgg atcttggacc tctacagcct
 241 cagcaaaatc gtggtggagg aaggtggcta tgaagccatc tgcaaggacc gtcggtgggc
 301 ccgggtggcc cagcgcctca actacccacc aggcaaaaac attggctccc tgctacgctc
 361 ccactatgaa cgcatcgctt acccctatga gatgtaccag tctggagcca acctggtgca
 421 gtgcaacaca cgtccatttg ataatgagga gaaggacaag gaatataaac cccacagcat
 481 ccccttcga cagtctgtgc agccttctaa gttcaacagc tatggccggc gggcaaagag
 541 actgcagcct gatccggaac ccacagagga agacattgaa aagaatccag agctgaagaa
 601 gctacagatc tatggggcag gccccaagat gatgggccta ggcctcatgg ccaaggataa
 661 gactctgcgg aagaaagata aggaagggcc tgaatgtccc cccaccgtag tggtaaagga
 721 ggagtcaggc agcgacgtga aggtggagtc aacctcacct aagaccttcc tggaaagcaa
 781 ggaggaactg agtcacagcc cagagccctg taccaagatg accatgaggc tgcggaggaa
 841 ccacagcaat gcccagttta tcgagtcata tatatgccgg atgtgttccc gaggggatga
 901 ggatgacaag ctcctgctgt gtgatggct
```

Annexe 16 : Alignement des séquences SMCX et SMCY (logiciel Mc Vector®).

SMCXsou : séquence du gène SMCX de la souris (*mus musculus*). [126]
SMCYhu : séquence du gène SMCY de l'homme. [127]
SMC Ych : séquence du gène SMCY du cheval (*equus caballus*). [124]
SMCXch : séquence du gène SMCX du cheval (*equus caballus*). [125]
* Nucléotide commun aux différentes séquences.

```
SMCXsou     1                                                          0
SMCYhu      1 CCTGACGATTGCTTAGCATTAAGGCCCGACATGGAACCGGGGTGTGACGA      50
SMCYch      1                                                          0
SMCXch      1                                                          0


SMCXsou     1                                                          0
SMCYhu     51 GTTCCTGCCGCCACCGGAGTGCCCGGTTTTTGAGCCTAGCTGGGCTGAAT     100
SMCYch      1                                                          0
SMCXch      1                                                          0


SMCXsou     1                                    ACCCATCGCCGAGAAG     16
SMCYhu    101 TCCAAGACCCGCTTGGCTACATTGCGAAAATAAGGCCCATAGCAGAGAAG     150
SMCYch      1                                    GCCCATCGCGGAGAAG     16
SMCXch      1                                    ACCCATCGCTGAGAAG     16
                                                  ***** ** ******


SMCXsou    17 TCCGGCATTTGCAAGATCCGCCCACCCGCGGACTGGCAGCCACCCTTTGC     66
SMCYhu    151 TCTGGCATCTGCAAAATCCGCCCACCCGCGGATTGGCAGCCTCCTTTTGC    200
SMCYch     17 TCGGGTATTTGCAAGATTCGTCCACCCGCGGACTGGCAGCCTCCCTTTGC     66
SMCXch     17 TCGGGCATTTGCAAGATCCGCCCACCCGCGGACTGGCAGCCACCCTTTGC     66
              ** ** ** ***** ** ** *********** ******** ** *****


SMCXsou    67 CGTGGAAGTGGATAACTTCAGGTTTACTCCCCGAATCCAGAGGTTGAATG     116
SMCYhu    201 AGTAGAAGTTGACAATTTCAGATTTACTCCTCGCGTCCAAAGGCTAAATG     250
SMCYch     67 AGTAGAAGTTGACAATTTCAAGTTTACTCCTCGCATCCAGCGGCTAAATG     116
SMCXch     67 TGTAGAAGTGGACAACTTCAGGTTTACTCCCCGAATCCAGAGGCTGAATG     116
               ** ***** ** ** ****  ******** **  ****  ** * ****


SMCXsou   117 AGCTGGAGGCCCAGACAAGAGTGAAACTGAACTATTTGGACCAGATTGCC     166
SMCYhu    251 AACTGGAGGCCCAAACTAGAGTGAAATTGAACTATTTGGATCAGATTGCA     300
SMCYch    117 AATTAGAGGCTCAGACCAGGGTAAAACTGAATTATTTGGATCAGATTGCA     166
SMCXch    117 AACTAGAGGCCCAAACAAGAGTGAAACTGAACTACTTGGACCAGATTGCC     166
              *  * ***** ** ** ** ** *** **** ** ***** ********


SMCXsou   167 AAATTCTGGGAGATCCAGGGCTCATCCTTAAAGATTCCCAATGTAGAACG     216
SMCYhu    301 AAATTCTGGGAAATTCAAGGCTCCTCTTTAAAGATTCCCAATGTGGAGCG     350
SMCYch    167 AAATTCTGGGAAATCCAAGGTTCTTCATTAAAAATTCCCAATGTGGAGCG     216
SMCXch    167 AAATTCTGGGAAATCCAGGGCTCCTCTTTAAAGATTCCTAATGTAGAACG     216
              *********** ** ** ** ** ** ***** ***** ***** ** **


SMCXsou   217 GCGGATCTTGGACCTCTATAGCCTCAGCAAAATTGTGGTGGAAGAAGGTG     266
SMCYhu    351 GAAGATCTTGGACCTCTACAGCCTTAGTAAGATTGTGATTGAGGAAGGTG     400
SMCYch    217 GAAGATCTTGGACCTCTACAGCCTTAGTAAGATTGTGATGGAGGAAGGTG     266
SMCXch    217 GCGGATCTTGGACCTCTACAGCCTCAGCAAAATCGTGGTGGAGGAAGGTG     266
              *  *************** ***** ** ** ** *** * ** *******


SMCXsou   267 GTTATGAAACTATCTGCAAGGACCGTCGATGGGCCCGTGTGGCCCAGCGT     316
SMCYhu    401 GCTATGAAGCCATCTGCAAGGATCGTCGGTGGGCTCGAGTTGCCCAGCGT     450
SMCYch    267 GCTATGAAGCCATCTGCAAGGATCGTCGATGGGCCCGGGTTGCCCAGCGT     316
SMCXch    267 GCTATGAAGCCATCTGCAAGGACCGTCGGTGGGCCCGGGTGGCCCAGCGC     316
              * ****** * *********** ***** ***** ** ** ********


SMCXsou   317 CTCAACTACCCACCTGGCAAAAACATTGGTTCCTTGCTACGCTCTCACTA     366
SMCYhu    451 CTCCACTACCCACCAGGCAAAAACATTGGCTCCCTGCTACGATCACATTA     500
SMCYch    317 CTCAACTACCCACCAGGCAAAAACATTGGCTCGCTGCTAAGATCTCACTA     366
SMCXch    317 CTCAACTACCCACCAGGCAAAAACATTGGCTCCCTGCTACGCTCCCACTA     366
              *** ********** ************** **  ***** * ** ** **


SMCXsou   367 TGAACGCATTGTTTATCCCTATGAAATGTACCAGTCTGGAGCCAACCTTG     416
SMCYhu    501 CGAACGCATTATTTACCCCTATGAAATGTTTCAGTCTGGAGCCAACCATG     550
SMCYch    367 TGAGCGCATCATTTACCCTTATGAAATGTTTCAGTCTGGAGCCAACCTTG     416
SMCXch    367 TGAACGCATCGCTTACCCCTATGAGATGTACCAGTCTGGAGCCAACCTGG     416
               ** *****   *** ** ***** ****  ***************  *
```

```
SMCXsou   417 TGCAGTGTAACACACGCCCATTTGATAATGAGGAAAAGGACAAGGAATAT  466
SMCYhu    551 TGCAATGTAACACACACCCGTTTGACAATGAGGTAAAAGATAAGGAATAC  600
SMCYch    417 TGCCATGTGACACTCACCCATTTGACAATGAGGAAAAAGACAAAGAATAC  466
SMCXch    417 TGCAGTGCAACACACGTCCATTTGATAATGAGGAGAAGGACAAGGAATAT  466
              ***  **  **** *  ** ***** *******  ** ** ** *****

SMCXsou   467 AAACCCCACAGCATCCCCCTTCGACAGTCTGTGCAGCCTTCCAAGTTCAA  516
SMCYhu    601 AAGCCCCACAGCATCCCCCTTAGACAGTCTGTGCAGCCTTCAAAGTTCAG  650
SMCYch    467 AAACCCCACAGCATTCCCCTTAGACAGTCTGTGCAGCCTTCCAAGTTCAG  516
SMCXch    467 AAACCCCACAGCATCCCCCTTCGACAGTCTGTGCAGCCTTCTAAGTTCAA  516
              ** *********** ****** ****************** *******

SMCXsou   517 CAGTTATGGACGACGGGCAAAGAGACTACAGCCTGATCCGGAACCCACAG  566
SMCYhu    651 CAGCTACAGTCGACGGGCAAAAAGGCTACAGCCTGATCCAGAGCCTACAG  700
SMCYch    517 CAGCTATAGTCGGCGGGCAAAAAGACTTCAGCCTGATCCAGAGCCCACAG  566
SMCXch    517 CAGCTATGGCCGGCGGGCAAAGAGACTGCAGCCTGATCCGGAACCCACAG  566
              *** **  * ** ******** ** ** *********** ** ** ****

SMCXsou   567 AGGAAGACATTGAAAAGAATCCAGAACTGAAGAAATTACAGATATATGGA  616
SMCYhu    701 AGGAGGACATTGAGAAGCATCCAGAGCTAAAGAAGTTACAGATATATGGG  750
SMCYch    567 AGGAGGACATTGAGAGGAATCCAGAACTGAAGAAGCTGCAAATCTATGGG  616
SMCXch    567 AGGAAGACATTGAAAAGAATCCAGAGCTGAAGAAGCTACAGATCTATGGG  616
              **** ******** * * ******* ** *****  * ** ** *****

SMCXsou   617 GCAGGCCCCAAGATGATGGGGCTGGGCCTAATGGCCAAAGATAAGACTCT  666
SMCYhu    751 CCAGGTCCCAAAATGATGGGCTTGGGCCTTATGGCTAAGGATAAGGAT--  798
SMCYch    617 GCAGGTCCCAAGATGATGGGCTTGGGCCTTGTTCCCAAGGATAAGACTTT  666
SMCXch    617 GCAGGCCCCAAGATGATGGGCCTAGGCCTCATGGCCAAGGATAAGACTCT  666
               **** ***** ********  * *****  *  * ** ******  *

SMCXsou   667 GCGGAAAAAAGATAAAGAAGGGCCTGAGTGTCCCCCCACTGTGGTGGTAA  716
SMCYhu    799 -AAGACTGTGCATAAGAAAG---TCACATGCCCCCCAACTGTTACGGTGA  844
SMCYch    667 ACGGAAGAAAGATAAAGAAGGAGTCATATGCCCCCCCCGCTGTTATAATGG  716
SMCXch    667 GCGGAAGAAAGATAAGGAAGGGCCTGAATGTCCCCCCACCGTAGTGGTAA  716
                 **      ****  ***        ** *****  * **     *

SMCXsou   717 AGGAGGAATTAGGTGGGGATGTCAAGATGGAATCAACCTCACCCAAGACC  766
SMCYhu    845 AGGATGAGCAAAGTGGAGGTGGGAACGTGTCATCAACATTGCTCAAG---  891
SMCYch    717 AGGAGGAACCAAGTAGGGTTGGGAAAGTGATGTCAGCATTGCCGAAG---  763
SMCXch    717 AGGAGGAGTCAGGCAGCGACGTGAAGGTGGAGTCAACCTCACCTAAGACC  766
              **** **   * *  * *  *  **  **   *** * *  *  ***

SMCXsou   767 TTCCTAGAAGGCAAGGAGGAACTGAGTCATAGCCCTGAGCCCTGCACCAA  816
SMCYhu    892 ----------------------CAGCACTTGAGCCTAGAGCCCTGCACTAA  920
SMCYch    764 ---------------GAGGACTTGAGTCACAGCCTAGAGCCCTGCACCAA  798
SMCXch    767 TTCCTGGAAAGCAAGGAGGAACTGAGTCACAGCCCAGAGCCCTGTACCAA  816
                                  *      ****  ******** ** **

SMCXsou   817 GATGACCATGAGGCTTCGAAGGAACCACAGCAATGCCCAGTTTATTGAGT  866
SMCYhu    921 GACAACCATGCAACTTCGAAAGAATCACAGCAGTGCCCAGTTTATTGACT  970
SMCYch    799 GATGACCATGCAGCTACGGAAGAATCACAGCAGTTCCCAGTTTATTGACT  848
SMCXch    817 GATGACCATGAGGCTGCGGAGGAACCACAGCAATGCCCAGTTTATCGAGT  866
              **  ******   ** ** * *** ******* * ********** ** *

SMCXsou   867 CATACGTATGCCGAATGTGTTCCCGAGGAGATGAAGATGACAAACTCTTA  916
SMCYhu    971 CATATATTTGCCAAGTATGCTCCCGTGGGGATGAAGATAATAAGCTTCTT 1020
SMCYch    849 CATATGTTTGCCGAATGTGCTCCCGAGGGGATGAAGACGATAAGCTACTT  898
SMCXch    867 CATATATATGCCGGATGTGTTCCCGAGGGGATGAGGATGACAAGCTCCTG  916
              ****  * ****   * ** ***** ** ***** **  * ** **  *

SMCXsou   917 CTGTGTGATGGCTGTGATGACAATTACCACATCTTTTGCCTGCTGCCTCC  966
SMCYhu   1021 TTCTGTGATGGCTGTGATGACAATTACCACATCTTCTGCTTGTTACCACC 1070
SMCYch    899 CTTTGTGATGGCTGTGATGACAATTACCACATCTTCTGCCTATTGCCACC  948
SMCXch    917 CTGTGTGATGGCT                                     929
               * **********

SMCXsou   967 TTTGCCTGAAATCCCGAAAGGTGTCTGGAGGTGTCCAAAGTGTGTCATGG 1016
SMCYhu   1071 CCTTCCTGAAATCCCCAGAGGCATCTGGAGGTGCCCAAAATGTATCTTGG 1120
SMCYch    949 CCTTCCTGAAATCCCCAGAGGGGTCTGGAGGTGCCCAAAGTGTATCATGG  998
SMCXch    930                                                 929


SMCXsou  1017 CGGAGTGTAAGCGGCCCCCTGAAGCCTTTGGCTTTGAGCAAGCTACCCGG 1066
SMCYhu   1121 CGGAGTGTAAACAGCCTCCTGAAGCTTTTGGATTTGAACAGGCTACCCAG 1170
SMCYch    999 CGGAGTGTAAGAGGCCGCCTGAAGCCTTTGGCTTTGAA             1036
SMCXch    930                                                 929
```

```
SMCXsou  1067 GAATATACTCTGCAGAGCTTTGGAGAGATGGCTGACTCCTTTAAAGCTGA 1116
SMCYhu   1171 GAGTACAGTTTGCAGAGTTTTGGTGAAATGGCTGATTCCTTCAAGTCCGA 1220
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929

SMCXsou  1117 CTACTTCAACATGCCTGTGCATATGGTACCCACAGAACTTGTAGAGAAGG 1166
SMCYhu   1221 CTACTTCAACATGCCTGTACATATGGTGCCTACAGAACTTGTAGAGAAGG 1270
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1167 AGTTTTGGCGGCTGGTGAATAGCATCGAGGAAGACGTAACTGTGGAGTAT 1216
SMCYhu   1271 AATTCTGGAGGCTGGTGAGCAGCATTGAGGAAGACGTGACAGTTGAATAT 1320
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1217 GGGGCTGACATCCATTCCAAAGAATTTGGCAGCGGTTTCCCTGTCAGTGA 1266
SMCYhu   1321 GGAGCTGATATTCATTCCAAAGAATTTGGCAGTGGCTTTCCTGTCAGCAA 1370
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1267 CAGTAAGCGGCACCTAACCCCAGAGGAGGAGGAGTATGCTACAAGTGGTT 1316
SMCYhu   1371 TAGCAAACAAAACTTATCTCCTGAGGAGAAGG                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1317 GGAACCTGAATGTGATGCCTGTATTGGAGCAGTCTGTACTGTGCCACATC 1366
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1367 AATGCAGATATATCTGGCATGAAGGTACCGTGGCTGTATGTGGGAATGGT 1416
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1417 CTTCTCAGCCTTTTGCTGGCATATTGAAGATCACTGGAGTTACTCTATTA 1466
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1467 ACTACCTCCACTGGGGTGAGCCAAAAACCTGGTATGGAGTCCCATCGCTT 1516
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1517 GCAGCGGAACACTTGGAAGAAGTGATGAAGAAGCTGACACCTGAGCTTTT 1566
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1567 TGATAGCCAGCCTGATCTCCTTCACCAACTCGTCACCCTCATGAATCCTA 1616
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1617 ACACGCTCATGTCCCATGGTGTGCCGGTTGTCCGCACAAACCAGTGTGCA 1666
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  1667 GGAGAATTTGTCATCACTTTTCCTCGTGCTTACCACAGTGGTTTCAACCA 1716
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929
```

```
SMCXsou  1717 AGGCTACAACTTTGCTGAGGCAGTCAACTTTTGCACTGCTGACTGGCTGC 1766
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929

SMCXsou  1767 CTGCTGGGCGCCAATGCATTGAGCACTACCGCCGACTACGAAGATACTGT 1816
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  1817 GTCTTTTCTCATGAGGAGCTCATTTGCAAGATGGCTGCCTGCCCTGAGAA 1866
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  1867 ACTGGACCTGAACCTGGCAGCAGCTGTACATAAGGAGATGTTCATTATGG 1916
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  1917 TGCAAGAGGAGCGGCGTCTACGAAAGGCTCTGTTGGAAAAAGGTATCACC 1966
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  1967 GAGGCTGAGCGAGAGGCTTTTGAGCTGCTTCCAGATGATGAACGTCAGTG 2016
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  2017 CATAAAGTGCAAGACCACATGTTTCCTATCTGCCCTGGCTTGCTATGACT 2066
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  2067 GCCCAGATGGCCTTGTCTGTCTTTCTCACATCAATGACCTCTGCAAGTGC 2116
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  2117 TCCAGTAGCCGCCAGTACCTTCGGTATCGGTACACCTTGGATGAGCTCCC 2166
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  2167 TGCCATGCTGCATAAACTGAAAGTTAGAGCTGAGTCCTTTGACACCTGGG 2216
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  2217 CTAACAAAGTACGAGTGGCCCTGGAGGTGGAAGATGGGCGGAAGCGCAGC 2266
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  2267 CTGGAAGAACTGAGAGCACTAGAATCTGAGGCTCGTGAGCGAAGGTTTCC 2316
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929


SMCXsou  2317 TAACAGTGAGCTTCTACAGCGACTGAAAAACTGCCTGAGTGAAGCAGAGG 2366
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929
```

```
SMCXsou  2367 CTTGTGTGTCCCGGGCTCTGGGATTGGTCAGTGGCCAGGAAGCTGGCCCT 2416
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929

SMCXsou  2417 GACAGGGTGGCTGGCCTACAGATGACCCTGGCTGAGCTACGGGATTTTCT 2466
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2467 GGGCCAGATGAACAACCTGCCCTTGGCCATGCACCAGATTGGGGATGTCA 2516
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2517 AGGGTATTCTGGAACAGGTGGAAGCCTACCAGACTGAGGCCCGTGAGGCC 2566
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2567 CTGGTCTCACAGCCTTCCAGTCCAGGGCTGCTGCAGTCCTTGTTGGAGAG 2616
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2617 AGGACAACAGCTGGGTGTGGAGGTACCTGAAGCCCAGCAGCTCCAAAGGC 2666
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2667 AGGTGGAACAGGCGCGGTGGCTGGATGAGGTAAAACGCACGCTGGCTCCC 2716
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2717 TCTGCCCGAAGGGGTACCCTGGCCATCATGCGGGGACTGTTGGTTGCGGG 2766
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2767 CGCCAGTGTAGCCCCTAGCCCTGCTGTGGATAAGGCCCAGGCAGAGCTTC 2816
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2817 AGGAGCTGCTGACCATCGCTGAACGCTGGGAAGAGAAAGCCCACCTCTGC 2866
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2867 TTAGAGGCCAGGCAGAAGCATCCACCAGCCACACTTGAGGCCATAATCCA 2916
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2917 TGAAGCAGAAAACATCCCTGTTCACTTGCCCAATATCCAGTCTCTCAAGG 2966
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929


SMCXsou  2967 AGGCTCTTGCTAAGGCCCGGGCATGGATTGCTGATGTGGATGAGATCCAA 3016
SMCYhu   1403                                                  1402
SMCYch   1037                                                  1036
SMCXch    930                                                   929
```

```
SMCXsou  3017 AATGGTGACCACTACCCTTGCTTGGATGACTTGGAGGGCCTCGTAGCTGT 3066
SMCYhu   1403                                                 1402
SMCYch   1037                                                 1036
SMCXch    930                                                  929

SMCXsou  3067 GGGTCGGGACCTCCCTGTGGGGCTGGAGGAACCC 3100
SMCYhu   1403                                1402
SMCYch   1037                                1036
SMCXch    930                                 929
```

Bibliographie

1 ● **ABBAS N., BISHOP C., FELLOUS M.**
Le déterminisme génétique du sexe
La recherche, 1989 : 20 : 1036-1046.

2 ● **ABE S., MIYAKE Y.I., KAGEYAMA S.I., WATANABE G., TAYA K., KAWAKURA K.**
Deletion of the Sry region on the Y chromosoe detecte in a case of equine gonadal hypoplasia (XY female) with abnormal hormonal profiles.
Equine Veterinary Journal. 1999 ; 31 : 336-338

3 ● **AGULNIK A.I., BISHOP C.E., LERNER J.L., AGULNIK S.I., SOLOVYEV V.V.**
Analysis of mutation rates in the SMCY/SMCX genes shows that mammalian evolution is male driven..
Mamm. Genome 1997 ; 8 (2) : 134-138

4 ● **AMDOR J.**
A case report. Equine pseudohermaphroditism.
Iowa State University Vet. 195 ; 27 : 120-121.

5 ● **BARBAUX S., VILAIN E., MICELREAVEY K., FELLOUS M**.
Le point sur le déterminisme du sexe des mammifères.
Médecine /Science 1995 ; 11 : 529-536.

6 ● **BASRUR P.K., KANAGAWA H., GILMAN J.P.MW..**
An equine intersex with unilateral gonadal agenesis.
Canadian Journal of Comparative Medecine. 1969 ; 33 : 297-306.

7 ● **BASRUR P.K., KANAGAWA H., PODLIACHOUK L..**
Further studies on the cell populations of an intersex horse.
Canadian Journal of Comparative Medecine. 1970 ; 34 : 295-298.

8 ● **BERNARD P., TANG P., LIU S., DEWING P., HARLEY V.R., VILAIN E.**
Dimerization of Sox9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination.
Human Molecular Genetics, 2003 ; 12 : 1755-1765.

9 ● **BERTA P., HAWKINS J.R., SINCLAIR A.H., TAYLOR A., GRIFFITHS L., GOODFELLOW P. N., FELLOUS M.**
Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor.
Nature 1990 ; 348 : 448-450

10 ● **BERTRAND M.**
Les anomalies chromosomiques chez les mammifères domestiques.
Revue de Médecine Vétérinaire. 1979 ; 130 : 3136335.

11 ● **BLUE M.G., BRUERE A.N., DEWES H.F..**
The significance of the XO syndrome in infertility of the mare.
New Zaeland Veterinary Journal. 1978 ; 26 : 137-141

12 ● **BOINOT C.**
Diagnostic du freemartinisme par PCR (Polymerase Chain Reaction) : mise au point et comparaison de plusieurs couples d'amorces.
Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 2002, 117 pp.

13 ● **BORNSTEIN S..**
The genetic sex of two intersexual horses and some notes on the karyotypes of normal horses.
Acta Veterinaria Scandinavica. 1967 ; 8 : 291-300.

14 ● **BOUTERS R., VANDEPLASSCHE M., DE MOOR A**.
An intersex (male pseudohermaphrodite) horse with 64 XX-65 XXY mosaicism.
Equine Vet J. 1972 Jul;4(3):150-3.

15 ● **BOUTERS R., VANDEPLASSCHE M, MOOR A.** .
An intersex (male pseudohermaphrodite) horse with 64XX/65XXY mosaicism.
Journal of Reproduction anf Fertility. 1975 ; 23 : 375-376

16 ● **BOWLING A.T., MILLION L., HUGUES J.P..**
An update of chromosomal abnormalities in mares.
Journal of Reproduction and Fertility. 1987 ; suppl. 35 : 149-155.

17 ● **BREEN M., LANGFORD C.F., CARTER N.P., FISCHER P.E., MARTI E., GERSTENBERG C., ALLEN W.R., LEAR T.L., BINNS M.M..**
Detection of equine X chromosome abnormalities in equids using a horse X whole chromosome paint probe (WCPP).
The Veterinary Journal. 1997 ; 153 : 235-238

18 ● **BRUERE A.N., BLUE M.G., JAINE P.M., WALKER K.S., HENDERSON L.M., CHAPMAN H.M..**
Preliminary observations on the occurrence of the equine XO syndrome.
New Zealand Veterinary Journal. 1978 ; 26 : 145-146.

19 ● **BUGNO M., KLUKOWSKA J., SLOTA E., TISCHNER M., SWITONSKI M..**
A sporadic case of the sex-reversed mare (64,XY; SRY-negative): molecular and cytogenetic studies of the Y chromosome..
Theriogenology. 2003 ;59 (7) : 1597-1603.

20 ● **BUOEN L.C., EILTS B.E., RUSHMER A., WEBER A.F.**
Sterility associated with an XO karyotype in a Belgian mare.
Journal of the American Veterinary Medical Association. 1983 ; 182 : 1120-1121

21 ● **BUOEN L.C., ZHANG T.Q., RUTH G.R., WEBER A.F., KITTLESON S.L..**
Sterility associated with an XO karyotype in a miniature horse mare.
Equine Veterinary Journal. 1993 ; 25 : 164-165.

22 ● **BUOEN L.C., ZHANG T.O., WEBER A.F., RUTH G.R.**
SRY-negative, XX intersex horses: the need for pedigree studies to examine the mode of inheritance of the condition.
Equine Vet J. 2000 Jan;32(1):78-81.

23 ● **CAMMAERT S., CORYN M., de KRUIF A., SPINCEMAILLE J, DELBEKE F.T., DEBACKERE M..**
Three full sister mares with a stalion-like behaviour and a hight blood testosterone concentration.
Equine Veterinary Science. 1993 ; 13 : 220-222.

24 ● **CHANDLEY A.C., FLETCHER J., ROSSDALE P.D., PEACE C.K., RICKETTS S.W., MCENERY R.J., THORNE J.P., SHORT R.V., ALLEN W.R..**
Chromosome abnormalities as a cause of infertility in mares.
Journal of Reproduction and Fertility. 1975 ; suppl. 23 : 337-383.

25 ● **COLLECTIF**
Le manuel vétérinaire Merck
Editions d'Après, Paris, 2002, 2297 pp.

26 ● **CONSTANT S.B., LARSEN R.E., ASBURY A.C., BUOEN L.C., MAYO M**.
XX Male syndrome in a cryptorchid stallion.
Journal of the American Veterinary Medical Association. 1994 ; 205 : 83-85

27 ● **COTINOT C., GIANQUINTO L. FELLOUS M..** (1991).
Le determinisme du sexe et son contrôle génétique.
IN : THIBAULT C., LEVASSEUR M.C.. La reproduction chez les Mammifères et l'Himme.
Paris : Ed Marketting, Chap 12, 205-219. Collection INRA Ellipse.

28 ● **CRABBE B.G., FREEMAN D.A., GRANT B.D., KENNEDY P., WHITLATCH L., MacRAE K**.
Testicular feminization syndrome in a mare.
J Am Vet Med Assoc. 1992 ;200 (11) :1689-1691.

29 ● **CRIBIEU E.P..**
Caryotype normal et anomalies chromosomiques du cheval domestique (Equus caballus).
Recueil de Médecine Vétérinaire. 1984 ; 160 : 131-139.

30 ● **CRIBIU E.P.**
Quelques cas de dysgénésie gonadique chez la jument causés par différentes aberrations gonosomiques (monosomie X, mosaïque X/XX et caryotype XY).
Génétique, Sélection, Evolution. 1984 ; 16 : 397-404.

31 ● **CRIBIEU E.P., CHAFFAUX S.**
L'intersexualité chez les mammifères domestiques.
Reproduction, Nutrition et Developpement. 1990 ; (suppl. &) : 51 s-61s.

32 ● **CRIBIEU E.P.**
Cytogénétique et pathologie équine.
Recueil de Médecine Vétérinaire. 1992 ; 168 : 1005-1010.

33 ● **DAVIES T.G..**
Turner's syndorme (karyotype 63 XO) ina thoroughbred mare.
Equine Veterinary Education. 1995 ; 7 : 15-17.

34 ● **DUNN H.O., VAUGHAN J.T., McENTREE K..**
Bilaterally cryptorchid stallion with a female karyotype.
Cornell Vet 1974;64:265-275

35 ● **DUNN H.O., SMILEY D., DUNCAN J.R., MCENTEE K..**
Two equine true hermaphrodites with 64,XX/64XY and 63XO/64XY Chimerisme.
Cornell Veterinarian. 1981 ; 71 : 123-135.

36 ● **ENNIS S., VAUGHAN L., GALLAGHER T.F**..
The diagnosis of freemartinism in cattle using sex-specific DNA sequences.
Research in Veterinary Science. 1999 ; 67 : 111-112.

37 ● **FRETZ P.B., HARE W.C.D..**
A male pseudo-hermarphrodite horse with 63XO/64XX/65XXY mixoploidy.
Equine Veterinary Journal. 1976 ; 8 : 130-132.

38 ● **GASCA S., BOIZET-BONHOURE B., POULAT F., BERTA P**.
Détermination du sexe des mammifères : la mise à jour d'un trafic ?
Médecine/Science 2003 ;19 : 25-26.

39 ● **GERNEKE W.H., COUBROUGH R.I.**
Intersexuality in the horse.
Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 1970 ; 37 : 211-216.

40 ● **GILL J.JB., KEMPSKI H.M., HALLOWS B.J., WARREN A.M.**
A 64XX/65XXX mosaic mare (Equus caballus) and associates infertility.
Equine Veterinary Journal. 1988 ; 20 : 128-130.

41 ● **GLUHOVSCHI N., BISTRICEANU M., SUCIOL A., BRATU M..**
A case of intersexuality in the horse with type 2A-XXXY chromosome formula.
British Veterinary Journal. 1970 ; 126 : 522-525.

42 ● **HALNAN C.R.E., WATSON J.I.**
Detection by G- and C- band karyotyping of gonosome anomalies in horses of different breeds.
Journal of Reproduction and Fertility. 1982 ; suppl. 32 : 626-627.

43 ● **H HALNAN C.R.E., HUTCHNS D.R., BROWNLOW M.**
Failure to conceive in a standard-bred mare : karyotype 64,XX:64,XY.
Eq vet. Sci. 1985 ; 5 : 161-162.

44 ● **HALNAN C.R.E.**
Equine cytogenetics : role in equine veterinary practice.
Equine Veterinary Journal. 1985 ; 17 : 173-177.

45 ● **HALNAN C.R.E.**
Sex chromosomes mosaicism and infertility in mares.
Veterinary Record. 1985 ; 16 : 542-543.

46 ● **HAQQ C.M., KING C.Y., UKIYAMA E., FALSAFI S., HAQQ T.N., DONAHOE P.K., WEISS M.A.**
Molecular basis of mammalian sexual determination : activation of müllérian inhibiting substance gene expression by SRY.
Science, 1994 ; 266 : 1494-1500

47 ● **HARLEY V.R., GOODFELLOW P.N**.
The biochemical role of SRY in sex determination.
Molecular reproduction and development 1994 ; 39 : 184-193

48 ● **HARLEY V.R., CLARKSON M.J., ARGENTARO A.**
The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (Sex-Determining Region on the Y Chromosome) and SOX9 [SRY-Related High-Mobility Group (HMG) Box9]
Endocrine Reviews 2003 ; 24 : 466-487

49 ● **HASEGAWA T., ISHIDA M., HARIGAYA T., SATO F., ISHIDA N., MUKOYAMA H.**
Linear SRY Transcript in Equine Testis.
J. Vet Med Sci. 1999 ; 61 (1) :97-100

50 ● **HASEGAWA T., SATO F., ISHIDA N., FUKUSHIMA Y., MUKOYAMA H.**
Sex Determination by Simultaneous Amplification of Equine SRY and Amellogenin Genes.
J. Vet Med Sci. 2000 ; 62 (10) :1109-1110.

51 ● **HAYES H.M.**
Epidemiological features of 5009 cases of equine cryptorchidism.
Equine vet. J. 1986 ; 18 : 467-471.

52 ● **HOHN H., KLUG E., RIECK G.W**..
A 63XO/65XYY mosaic in a case of questionable equine male pseudohermaphroditis.
4th European Colloquium in Cytogenetics of Domestic Animals. 1980, 82-92.

53 ● **HUGHES J.P., BENIRSCHKE K., KENNEDY P.C., TROMMERSHAUSEN-SMITH A.**
Gonadal dysgenesis in the mare.
Journal of Reproduction and Fertility. 1975 ; suppl. 23 : 385-390.

54 ● **HUGHES J.P., KENNEDY P.C., BENIRSCHKE K.**
XO gonadal dysgenesis in the mare (report of two cases).
Equine Veterinary Journal. 1975 ; 7 : 109-112.

55 ● **HUGHES J.P., TROMMERSHAUSEN-SMITH A..**
Infertility in the horse associated with chromosomal abnormalities.
Australian Veterinary Journal. 1977 ; 53 : 253-257.

56 ● **HUGUES I.A.**
Minireview : Sex Differenciation.
Endocrinology 2001 ; 142 : 3281-3287.

57 ● **JAY P., GOZE C., SOULLIER S., DESCLOZEAUX M., POULAT F., LAUDET V., BERTA P**.
Le sexe et les sox.
Médecine/Science 1996 ; 12 : 1097-1104

58 ● **JEAYS-WARD K., HOYLE C., BRENNAN J, DANDONNEAU M., ALLDUS G., CAPEL B., SWAIN A.,**
Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad.
Development 2003 ; 130 : 3663-3670

59 ● **JOST A.**
Les péripéties d'une recherche : l'étude de la différenciation sexuelle.
Médecine/Science. 1991 ; 7 : 263-275.

60 ● **KAKOI H., HIROTA K., GAWAHARA H., KUROSAWA M., KUWAJIMA M.**
Genetic diagnosis of sex chromosome aberrations in horses based on parentage test by microsatellite DNA and analysis of X- and Y-linked markers.
Equine Veterinary Journal. 2005 ; 37 (2) : 143-147.

61 ● **KAPLAN J., DELPECH M**. (1993**)**
Biologie moleculaire et médecine. 2ème Edition.
Medecine-sciences Flammarion. Paris, 790pp.

62 ● **KAWAKURA K., MIYAKE Y.I., MURAKAMI R.K., KONDOH S., HIRATA T.I., KANEDA Y**.
Deletion of the SRY region on the Y Chromosome detected in bovine gonadal hypoplasia (XY female) by PCR.
Cytogenetics Cell Genetics. 1996 ; 72 : 183-184.

63 ● **KENT M.G., SHOFFNER R.N., BUOEN L., WEBER A.F.**
XY sex-reversal syndrome in the domestic horse
Cytogenet Cell Genet 1986 ; 42 : 8-18

64 ● **KENT M.G., SHOFFNER R.N., HUNTER A., ELLSTON K.O., SHRODER W. TOLLEY E., WATCHEL S.S**.
XY sex reversal syndrome in the mare : clinical and behavorial studies.
HY phenotype. Hum Genet.1988 ; 79 : 2321-2328.

65 ● **KENT M.G., MUALLEM A., FIRST N.L.**
Moleculare etiology of sex reversal in the horse
Cytogenet Cell Genet 1996 ; 74 : 227-244.

66 ● **KIEFFER N.M., BURNS S.J., JUDGE N.G.**
Male pseudohermaphroditism of the testicular feminizing type in a horse.
Equine Veterinary Journal. 1976 ; 8 (1) : 38-41.

67 ● **KLUNDER L.R., MC FEELY R.A. WILLARD J.P**.
Six separate anomalies in an Arabian mare.
Equine Veterinary Journal. 1990 ; 22 : 218-220

68 ● **KNOWER K.C., KELLY S., HARLEY V.R.**
Turning on the male-SRY,SOX9 and sex determination in mammals
Cytogenet Genome Res. 2003 ; 101 :185-198.

69 ● **KODAGALI S.B..**
Sexual behaviour in an intersex horse.
Veterinary Medecine and Small Animal Clinician. 1969 ; 64 : 422.

70 ● **KUBIEN E.M., POZOR M.A., TISCHNER M..**
Clinical, cytogenetic and endcrine evaluation of a horse with a 65,XXY kayotype.
Equine Veterinary Journal. 1993 ; 25 : 333-335.

71 ● **LEADON D.P.**
Aberrant sexual development in the horse.
Irish Veterinary Journal. 1987 ; 41 : 270.

72 ● **LEADON D.P.**
When is a filly not a filly ?
Equine Veterinary Journal. 1990 ; 22 : 149.

73 ● **LONG S.E.**
Chromosome anomalies and fertilitiy in the mare.
Equine Veterinary Journal. 1988 ; 20 : 89-93.

74 ● **LOVELL-BADGE R.**
The role of Sry in mammalian sex determination
INIST CNRS 1998 ; 162-177

75 ● **MAKELA O., GUSTAVSSON I., HOLLMEN T**.
A 64, X,i(Xq) karyotype in a standardbred filly
Equine vet. J. 1994 ; 26 : 251-254

76 ● **MAKINEN A., KATILA T., KOULLANEN M.T.**
XO syndrome in the mare.
Nordisk Veterinaer Medecine. 1986 ; 38 : 16-21.

77 ● **MAKINEN A., HASEGAWA T., MAKILA M, KATILA T..**
Infertility in two mares with XY and XXX sex chromosomes.
Equine Veterinary Journal. 2000 ; 32 : 358-360.

78 ● **MAKINEN A., KATILA T., ANDERSSON M. ; GUSTAVSSON I..**
Two sterile stallions with XXY-syndrome.
Equine Veterinary Journal. 2000 ; 32 : 358 – 360.

79 ● **MAKINEN A., L. SUOJALA, NIINI T., KAILA T., TOZAKI T., MIYAKE Y.-I., HASEGAWA T.**
X chromosome detection in an XO mare using a human X paint probe, and PCR detection of SRY and amelogenin genes in 3 XY mares.
Equine vet. J. (2001) 33 (5) 527-530.

80 ● **MARSHALL GRAVES J.A.**
The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex determining genes.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1995 ; 350 : 305-312

81 ● **MARSHALL GRAVES J.A.**
Sex chromosomes and sex determination in weird mammals.
Cytogenet Genome Res. 2002 ;96 : 161-168.

82 ● **McDONOUGH P.G.**
The Y-chromosome and reproductive disorders.
Reprod. Fertil. Dev., 1998, 10 : 1-16.

83 ● **McELREAVEY K., VILAIN E., ABBAS N., HERSKOWITZ I., FELLOUS M.**
A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination :
SRY represses a negative regulator of male development.
Proc. Natl. Acad. Sci. 1993 ; 90 : 3368-3372.

84 ● **McELREAVEY K., BARBAUX S., ION A., FELLOUS M**.
The genetic basis of murine and human sex determination : a review.
Heredity 1995 ; 75 : 599-611.

85 ● **McILWRAITH CW, OWEN RA, BASRUR PK.**
An equine cryptorchid with testicular ans ovarian tissues.
Equine Veterinary Journal. 1976 ; 8 : 156-160

86 ● **METENIER L., DRIANCOURT M.A., CRIBIU E.P.**
An XO chromosome constitution in a sterile mare (Equus caballus).
Annales de Génétique et de Sélection Animale. 1979 ; 11 : 161-163.

87 ● **MEYERS WALLEN V.N., HURTEN J., SCHLAFER D., TULLENERS E., CLELAND W.R., RUTH G.R., ACLAND G.M.**
SRY-negative XX true hermaphroditism in a Paso Fino horse.
Equine Veterinary Journal. 1997 ; 29 : 404-408.

88 ● **MILLIKEN J.E., PACCAMONTI D.L., SHOEMEKER R.S., GREEN W.H..**
XX male pseudohermaphroditism in a horse.
Journal of the American Veterinay Medical Association. 1995 ; 207 : 77-79

89 ● **MITTWOCH U.**
Sex reversal in the horse - 2 sides of a common coin.
Eqine Veterinary Journal. 1997 ; 29 : 333-334.

90 ● **MIYAKE Y.I., ISHIKAWA T., KAWATE K.**
Three cases of mares sterility with sex-chromosome abnormality (63X)
Zuchthyg. 1979 ; 14 : 145-150.

91 ● **MORENO-MILLAN M., DELGADO BERMEJO J.V., LOPEZ CASTILLO G**..
An intersex horse with X chromosome trisomy.
Veterinary Record. 1989 ; 124 : 169-170.

92 ● **NIE G.J., MOMONT H.W., BUOEN L..**
A survey of sex chromosome abnormalities in 204 mraes selected for breeding.
Journal of Equine Veterinary Science. 1993 ; 13 : 456-459.

93 ● **PAGET S., DUCOS A., MIGNOTTE F., RAYMOND O., PINTON A, SEGUELA A., BERLAND HM, BRUN-BARONNAT C., DARRE A., DARRE R., TAMZALI Y., BERGONIER D., BERTHELOT**
X. 63,XO/65,XYY mosaicism in a case of equine male pseudohermaphroditism.
Vet Rec. 2001;148 (1) : 24-25.

94 ● **PAGET, S**.
Etude cytogénétique et moléculaire d'un cas d'intersexualité chez le chien et le cheval.
Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul-Sabatier, Toulouse, 2001, 200 pp.

95 ● **PAILHOUX E., PELLINIEMI L., BARBOSA A., PARMA P., KUOPIO T., COTINOT C.**
Relevance of intersexuality to breeding and reproductive biotechnology programs : XX sex reversal in pigs.
Theriogenology 1997 ;47 : 93-102

96 ● **PASK J., WHITWORTH D.J., MAO C.A., WEI K.J., SAKOVIC N., GRAVES J.A.M., SHAW G., RENFREE M.B., BEHRINGER R.**
Marsupial anti-müllerian hormone gene structure, regulatory elements, and expression.
Biology of reproduction 2004 ; 70 : 160-167.

97 ● **POWER M.M..**
XY sex reversal in a mare.
Equine Veterinary Journal. 1986 ; 18 : 233-236.

98 ● **POWER M.M., LEADON D.P..**
Diploid-triploid chimaerism (64 XX/ 96XXY) in an intersex foal.
Equine Veterinary Journal. 1990 ; 22 : 211-214.

99 ● **RAUDSEPP T., SANTANI A., BARBARA W.,SRINIVAS R.K., CHENGWEI R., HONG-BIN ZHANG, WOMACK J.E., SKOW L.C., CHOWDHARY B.P.**
A detailed physical map of the horse Y chromosome.
Proc. Natl. Acad. Sci 2004 ; 101 : 9321-9326

100 ● **REBOUL E**.
L'intersexualité chez les Mammifères. Etude en espèce canine.
Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 2002, 217 pp.

101 ● **REID S.W., WEATHERSTONE J.F., ROBINSON B.N.**
X chromosome mosaicism and infertility in a mare.
Canadian Veterinary Journal. 1987 ; 28 : 533-534.

102 ● **SAEZ J.M., DURAND P**.
Rôle du facteur SF-1 dans le développement des gonades et des surrénales, et dans la stéroïdogenèse.
Médecine/Science 1994 ; 10 : 1315-1317.

103 ● **SCHAFER A.J., GOODFELLOW P.N**.
Sex determination in humans
Bioessays 1996 ;18 : 955- 963

104 ● **SHARP A.J., WACHTEL S.S., BENIRSCHKE K..**
H-Y antigen in a fertile XY female horse.
Journal of Reproduction and Fertility. 1980 ; 58 : 157-160.

105 ● **SHOOK T.E., LOKAI M.D., BUERGELT C.D., KIEHL A.R..**
Gonadal intersex in a mare.
Equine Practice. 1990 ; 12 : 7-10.

106 ● **SMALL C.L., SHIMA J.E., UZUNCU M., SKINNER M.K., GRISWOLD M.D.**
Profiling gene expression during the differenciation and development of the murine embryonic gonad.
Biology of reproduction 2005 ; 72 : 492-501.

107 ● **STEWARTSCOTT I.A..**
Infertile mares with chromosomes abnormalities.
New Zealand Veterinary Journal. 1988 ; 36 : 63-65.

108 ● **STEWARTSCOTT I.A., PEARCE P.D., BURKIN D.J..**
Cases of Equine sex chromosomes abnormalities.
New Zealand Veterinary Journal. 1990 ; 38 : 54-56.

109 ● **SWAIN A., NARVAEZ V., BURGOYNE P., CAMERINO G., LOVELL-BADGE R**.
Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination
Nature, 1998, 391 :761-767.

110 ● **TROMMERSHAUSEN-SMITH A., HUGHES J.P., NEELY D.P**.
Cytogenetic and clinical findings in mares with gonadal dysgenesis.
Journal of Reproduction and Fertility. 1979 ; suppl. 27 : 271-276.

111 ● **VAIMAN D., PAILHOUX E., SCHIBLER L., OUSTRY A., CHAFFAUX S., COTINOT C., FELLOUS M., CRIBIU E.P.**
Genetic mapping of the polled/intersex locus (PIS) in goats.
Theriogenology 1997 ; 47 : 103-109

112 ● **VAIMAN D.**
Fertility, sex determination, and the X chromosome.
Cytogenet Genome Res 2002 ; 99 : 224-228.

113 ● **VAUGHAN L., SCHOFIELD W., ENNIS S.**
SRY-Negative XX sex reversal in a pony : a case report.
Theriogenology. 2001 ; 55 (5) : 1051-1057

114 ● **VEITA R.A., NUNES M., McELREAVEY K., FELLOUS M**.
Genetic basis of human sex determination : an overview.
Theriogenology 1997 ; 47 : 83-91.

115 ● **WALKER K.S., BRUERE A.N.**
XO condition in mares.
New Zealand Veterinary Journal. 1979 ; 27 : 18-19.

116 ● **WEISSENBACH J., ROUYER F.**
Chromosome Y et détermination du sexe
Reprod Nutr Dev, 1990 suppl 1, 27s-38s.

117 ● **WERNER M.H., HUTH J.R., GRONENBORN A.M., CLORE G.M.**
Molecular determinants of mammalian sex.
Reviews, 1996, 21 : 302-308.

118 ● **WHITE D.J., FAREBROTHER D.A**.,.
A case of intersex in a horse.
Veterinary Record. 1969 ; 85 : 203-204.

119 ● **YAO H.H., DINAPOLI L, CAPEL B.**
Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads.
Development. 2003 ; 130(24) : 5895-902. Epub 2003 Oct 15.

Sites internet:

120 ● **Centre de recherche I.N.R.A. de Jouy en Josas** (Page consultée le 31 Mai 2005)
Horsemap Database [en ligne].
Adresse URL : http://dga.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/gene.operl?BASE=horse

121 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 10 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne],
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=2443358

122 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 10 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne],
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=5869570

123 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 10 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne],
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=5869568

124 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 10 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne],
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=1871157

125 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 10 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne].
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=1871155

126 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 10 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne].
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=603861

127 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 10 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne].
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=1871159

128 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 31 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne].
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=2791670

129 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 31 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne].
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=9957446

130 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 31 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne].
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=9957448

131 ● **National Center for Biotechnology Information** (Page consultée le 31 Mai 2005)
NCBI Sequence Viewer [en ligne].
Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=52078033

MATEOS Hervé

L'intersexualité en espèce équine (*Equus caballus) : mise au point d'un test de diagnostic moléculaire.*

Thèse Vétérinaire : Lyon *, 2005*

RESUME :

Le développement et la différenciation sexuels résultent d'un processus séquentiel complexe faisant intervenir plusieurs gènes dont les mécanismes de régulation restent incomplètement élucidés. Différentes anomalies chromosomiques et génétiques interfèrent avec le processus de différenciation sexuelle et sont responsables d'ambiguités sexuelles. L'état intersexué, défini par la présence conjointe de caractéristiques mâle et femelle, est décrit chez plusieurs espèces de Mammifère dont le cheval.

On distingue les hermaphrodites vrais (gonades composées de tissu testiculaire et ovarien), des pseudohermaphrodites mâles (possédant des testicules) et des pseudohermaphrodites femelles (possédant des ovaires). Le pseudohermaphrodisme mâle équin serait la forme d'intersexualité la plus fréquente devant le pseudohermaphrodisme femelle et l'hermaphrodisme vrai. Le nombre de ces cas serait probablement sous-évalué du fait de manifestations morphologiques relativement discrètes. Ainsi, l'hypothèse diagnostique d'intersexualité doit être évoquée face à des troubles persistants de la fertilité et ne peut en aucun cas être exclue à la simple réalisation de l'examen clinique.

La réalisation de caryotypes est fondamentale dans l'étude de l'intersexualité, mais demeure néanmoins insuffisante pour l'identification d'anomalies génétiques et pour une utilisation en dépistage de routine. C'est pourquoi, nous avons développé un test de diagnostic moléculaire, permettant d'identifier aisément la présence de séquences du chromosome Y dont le gène SRY. Ainsi, ce test permet de déceler la présence des gènes SRY, AmelY et SMCY portés en trois régions distinctes du chromosome Y et d'évaluer l'importance des remaniements affectant le chromosome Y qui sont suceptibles d'interférer avec la différenciation du sexe de l'animal.

La réalisation de ce test apporterait ainsi non seulement un élément de réponse au clinicien, mais permettrait aussi d'accroître le recrutement des cas et ainsi d'approfondir l'étude des mécanismes responsables de l'intersexualité en espèce équine.

MOTS CLES :

- intersexualité
- cheval
- Equus caballus
- PCR
- SRY
- Amel
- SMC

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur GUERIN
1er Assesseur :	Madame le Professeur GRAIN
2ème Assesseur :	Madame le Docteur VIALARD

DATE DE SOUTENANCE : 27 Juin 2005

ADRESSE DE L'AUTEUR : 50 rue de Saint-Denis
93120 LA COURNEUVE