1992. JOURNÉES RECH. PORCINE EN FRANCE, **24**, 363-368.

MÉTHODE DE DÉTECTION DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES PORTÉES PAR LES SPERMATOZOÏDES DE VERRAT

M. BONNEAU (1), M. BENKHALIFA (2), P. POPESCU (3)

(1) I.N.R.A. - Installations Expérimentales Porcines, 78352 Jouy-en-Josas Cedex.
(2) Faculté de Médecine - Laboratoire de Cytogénétique médicale, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand Cedex.
(3) I.N.R.A. - Laboratoire de Cytogénétique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex.

Des ovocytes de hamster ont été utilisés dans un test de fécondation «*in-vitro*» pour apprécier le taux de fécondance du sperme de verrat, c'est à dire l'aptitude d'un spermatozoïde à pénétrer et pour visualiser les chromosomes du complément. Le verrat est porteur d'une translocation réciproque trcp(3;7) et a un spermogramme normal.

Cinq cent soixante trois ovocytes ont été inséminés avec les spermatozoïdes de ce verrat. Le taux de fécondation est de 68,8%. L'étude de 23 caryotypes de spermatozoïdes est effectuée. Neuf anomalies sont observées, dont 26,1% d'hypoploïdies ou d'hyperploïdies et 13,1% d'anomalies structurales.

Les résultats observés sur ces échantillons de sperme font apparaître un nombre d'anomalies supérieur à celui décrit dans la littérature. Cette technique est une méthode de détection des sujets à risque et de haute valeur génétique, dès la puberté.

Method of detection of chromosome abnormalities in boar sperm

An «*in-vitro*» fertilization test using zona-free hamster eggs, was used to analyse the fertilization capacity of boar spermatozoa. We have evaluated their ability to penetrate in zona-free hamster ova to visualize the male chromosome complement. The boar carried a reciprocal translocation trcp(3;7). The spermogram was normal.

A total of 563 eggs were inseminated with spermatozoa of this boar and the fertilization rate was 68,8%. A study of 23 karyotypes was carried out. Nine abnormalities were observed, which 26,1% were hyperploïdies or hypoploïdies and 13,1% showed structural abnormalities.

The results found in this sample of motile sperms show a higher incidence of abnormalities than those previously described in the literature. This technique is a tool for early detection of reproduction troubles in animals with a high genetic interest.

INTRODUCTION

Les travaux de YANAGIMACHI et al., (1976), ont montré que les spermatozoïdes humains sont capables de pénétrer l'ovocyte de hamster «dépellucidé». Par la suite, à l'occasion d'une telle fécondation hétérospécifique RUDAK et al., 1978 ont visualisér les chromosomes du spermatozoïde humain. Cette technique d'analyse des chromosomes des spermatozoïdes a été étendue aux espèces domestiques telles que les bovins (BIRD et HOUGHTON, 1988, TATENO et MIKAMO, 1987) et le porc (CREIGTHON et HOUGHTON, 1989, BENKHALIFA et al., 1991). Cette approche a été récemment mise en application au laboratoire de cytogénétique de l'INRA. Ce modèle de fécondation hétérospécifique constitue un moyen unique d'investigation pour l'analyse du mode de ségrégation méïotique au cours de la spermatogénèse, permettant ainsi de mieux comprendre le rôle des anomalies chromosomiques dans les échecs de la reproduction. En effet, si l'on se réfère à l'espèce humaine, les avortements spontanés du premier trimestre ont pour origine dans plus de 50% des cas des causes chromosomiques.

L'étude ci-après se rapporte à l'analyse cytogénétique des gamètes mâles d'un verrat porteur d'une translocation réciproque trcp(3;7) réduisant la taille des portées de 45%. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus sont un premier bilan des conséquences de la translocation sur la mortalité embryonnaire. Jusqu'à ce-jour, certains signes d'appel, représentés ici par des verrats dits «hypoprolifiques» (POPESCU et LEGAULT, 1989), ont permis de détecter des verrats à caryotypes anormaux. Notre deuxième objectif est de voir si un test gamétique peut permettre de déceler précocement des verrats susceptibles d'entrainer des baisses de prolificité avant qu'ils aient servi pour la reproduction.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Un verrat de race Large-White est porteur d'une anomalie structurale, détectée en France dans plusieurs élevages ; elle a été décrite pour la première fois par POPESCU et al., (1983), et a été identifiée avec un caryotype 38,XY,trcp(3;7)(p1.3;q2.1). La réduction de la taille des portées a été estimée à 45%. Le spermogramme réalisé par BONNEAU et al., (1991) s'est révélé normal.

Cytogénétique des spermatozoïdes

La méthode originale (RUDAK et al., 1978) n'a jamais pu être reproduite ; aussi, les techniques employées dans différents laboratoires ont elles été successivement modifiées. La technique que nous avons adoptée a été précédemment décrite par BENKHALIFA et al., (1992). L'analyse chromosomique des spermatozoïdes est réalisée par fécondation hétérospecifique avec des ovocytes de hamsters après stimulation ovarienne. Les ovocytes «dépellucidés» sont inséminés avec du sperme capacité à froid selon la technique de FALK et al., (1990). Les oeufs fécondés sont cultivés dans un milieu de Ham's F10 supplémenté de sérum de veau foetal. A l'issue de cette culture, complétée d'une adjonction de colchicine, les oeufs font l'objet d'un choc hypotonique suivi d'un étalement sur lame et d'une fixation. Les pronucléi mâles de porc et femelles de hamster peuvent ainsi évoluer jusqu'au stade métaphasique qui précéderait l'amphimixie; de ce fait, leurs caryotypes peuvent être établis.

2. RÉSULTATS

Le taux de pénétration est relativement satisfaisant avec 68,8% de fécondation. La polyspermie est importante et peut être due aux traitements enzymatiques. Sur 18 fécondations fournissant un caryotype interprétable, 7 (soit 38,9%) sont polyspermiques.

Le rendement en caryotype interprétable est peu élevé. (tableau 1).

La répartition des caryotypes est présentée dans le tableau 2. On observe un pourcentage important de caryotypes déséquilibrés. Il existe deux catégories d'anomalies : des anomalies numériques (26,1%) dont 4,4% d'hyperhaploïdies) et 21,8%

Tableau 1 - Rendement de chaque manipulation en caryotypes interprétables

Numéro de manipulation	1	2	3	4	5
Nombre d'ovocytes récoltés	115	93	68	150	137
Nombre de caryotypes hamsters	2	1	3	13	0
Nombre de caryotypes verrats	3	2	10	0	8

Tableau 2 - Distribution de 42 caryotypes : 23 caryotypes de spermatozoïdes porcins, 19 caryotypes d'ovules de hamsters-dorés

	Euploïdes		Hypo.		Hyper.		Anomal. struct.		TOTAL	
	19,X	19,Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
verrat (3;7)	7	7	4	1	0	1	1	2	12	11
	22,X		X	Y	X	Y	X	Y	X	
hamsters	16		2	0	1	0	0	0	19	

d'hypohaploïdies, les anomalies structurales représentent 13,1%. Le taux global d'anomalies est de 39,2% dans les spermatozoïdes du verrat et de 15,8% dans les ovules de hamsters. Dans cette étude, l'aneuploïdie ovocytaire est inférieure à celle observée par SELE et al., (1985) qu'ils estiment à 20%.

Sur l'ensemble des caryotypes analysés, le sex-ratio est de 1 : 1, avec 52,2% de spermatozoïdes -X et 47,8% de spermatozoïdes -Y.

Les figures 1, 2, 3, 4, (p. 366), illustrent des exemples de caryotypes analysés dans cette étude et montrent la présence de caryotypes de spermatozoïdes du verrat trcp(3;7), un caryotype d'ovocyte de hamster doré et une métaphase stade II d'ovocyte non fécondé.

3. DISCUSSION

Rappelons qu'une translocation réciproque lorsqu'elle est présente à l'état hétérozygote sur un animal, produit trois types de gamètes :

- *gamètes normaux,* qui perpétuent une population d'animaux normaux

- *gamètes porteurs de la translocation à l'état équilibré* (il n'y a pas de perte ou de gain de matériel chromosomique). Ces gamètes diffusent l'anomalie dans la population normale

- *gamètes à caryotype déséquilibré* qui ont un fragment chromosomique en plus ou en moins. Ceci est dû à une mauvaise ségrégation méïotique des chromosomes impliqués dans la translocation et de leurs chromosomes libres.

  Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes à caryotype déséquilibré n'est pas affecté. Les spermatozoïdes fécondent normalement mais produisent des embryons non-viables, qui sont expulsés très tôt. Ce sont ces embryons éliminés, qui expliquent la réduction de la taille des portées observée chez un verrat porteur d'une translocation réciproque.

Les proportions de chaque type de gamètes varient d'une anomalie à une autre. Pour établir la fréquence des gamètes à caryotype déséquilibré, deux approches sont possibles :

- *La première est l'étude des caryotypes d'embryons.* Ceci nécessite un échantillonnage important, d'où le sacrifice de nombreux embryons. Cette approche a deux inconvénients : on comptabilise les anomalies ovocytaires et les embryons expulsés très précocement ne sont pas pris en compte.

- *La deuxième approche est la recherche des caryotypes déséquilibrés* dans les spermatozoïdes mêmes, par la technique décrite dans cet article.

Les premiers résultats d'analyse cytogénétique des gamètes mâles ont été présentés par BIRD et HOUGHTON (1990) sur 2 verrats normaux. Ils estiment à 4,4% la fréquence d'hypohaploïdie et d'hyperhaploïdie. Les anomalies de structures sont plus élevées avec 7,1%. MARTIN et al., (1991) dans une revue comparative portant sur 8356 caryotypes humains, issus de donneurs normaux, montre que la fréquence des aneuploïdies est en moyenne de 3,8% et le taux d'anomalies de structures de 5,3%. On constate donc une légère supériorité du taux d'anomalies chromosomiques chez le porc. Toutefois ces données restent peu importantes par rapport aux résultats publiés pour l'espèce humaine. Les résultats obtenus chez l'homme sont légèrement différents suivant les auteurs et se rapprochent des données obtenues chez le porc pour les études les plus importantes (MARTIN et al., 1987, SELE et al., 1985). Il est cependant important de constater un taux plus élevé d'anomalies de structures chez le sperme de verrat, avec 2,6% de fragments acentriques. Ceci est similaire aux données rapportées chez l'homme où 50% des cassures interviennent au niveau du centromère.

Pour les translocations réciproques, seuls existent comme référence les résultats obtenus chez 3259 spermatozoïdes de donneurs humains (MARTIN et al., 1991). Les moyennes de toutes les études confondues donnent 6,5% d'anomalies de nombre et 9,7% d'anomalies de structure. Le taux d'anomalies chromosomiques obtenu chez le verrat que nous avons étudié (39,2%) est plus élevé que les résultats chez l'homme. Toutefois, suivant les auteurs, les résultats divergent sur le nombre d'aneuploïdies et d'anomalies de structures, avec 13,1 % d'anomalies de structures et surtout un nombre très élevé d'aneuploïdies (26,1%). Nos valeurs vont dans le sens de TEMPLEDO et al (1988) PELLESTOR et al (1987, 1989, 1990) chez l'homme. Si ces résultats se confirment, il serait intéressant de voir dans quelle mesure certains groupes de chromosomes sont plus affectés que d'autres, et d'analyser les variations de ce phénomène selon l'anomalie. Toutefois, nous pouvons déjà constater que la proportion de spermatozoïdes à caryotype anormal atteind des taux supérieurs aux taux étudiés chez des verrats à caryotype normal. Ceci permet de dire : d'une part que le mécanisme de sélection se fait après fécondation et donc que le pouvoir fécondant reste intact, d'autre part qu'avec un taux d'anomalies chromosomiques supérieur à 10% pour le gamète mâle le verrat peut être porteur équilibré d'une translocation chromosomique. Cependant, ce résultat préliminaire nécessite d'autres études pour confirmer et proposer cette méthode d'investigation précoce.

Enfin, il est clairement démontré dans ce travail comme cela à été souligné par BIRD et HOUGTHON (1990) que des anomalies de nombre se rencontrent au niveau gamétique. Ceci n'a que très rarement été constaté au niveau des produits de la conception chez le porc. En effet, les études sur blastocystes (McFEELY, 1967; LONG et WILLIAMS 1982) morula (DE BOER et al., 1986) ou sur embryon post-implantatoire de 76 jours (SMITH et MARLOW, 1971) chez le porc, indiquent un taux d'aneuploïdie très rare. Ceci n'est pas le cas chez l'homme où KAJII et MIKAMO (1986) rapportent un taux de 1,8% sur embryon de 30 jours ; par contre ANGELL et al (1986) estiment un taux d'anomalie de 24% dans l'embryon avant implantation.

Cette étude nous permet de constater que la cytogénétique des gamètes chez le porc est utile pour mieux analyser la contribution des anomalies chromosomiques sur la mortalité embryonnaire précoce. Toutefois, des conclusions générales ne peuvent pas être tirées de données aussi limitées. Nous ne pouvons pas aujourd'hui expliquer le rôle joué par les translocations sur le type de ségrégation méïotique produit et la fréquence des anomalies chromosomiques non liées à la translocation. Pour répondre à cette question fondamentale qui touche à l'étiologie et aux mécanismes de non-disjonction méïotiques, des études complémentaires sont nécessaires pour mieux appréhender le rôle des gamètes des 2 sexes dans la génèse des anomalies de l'embryon.

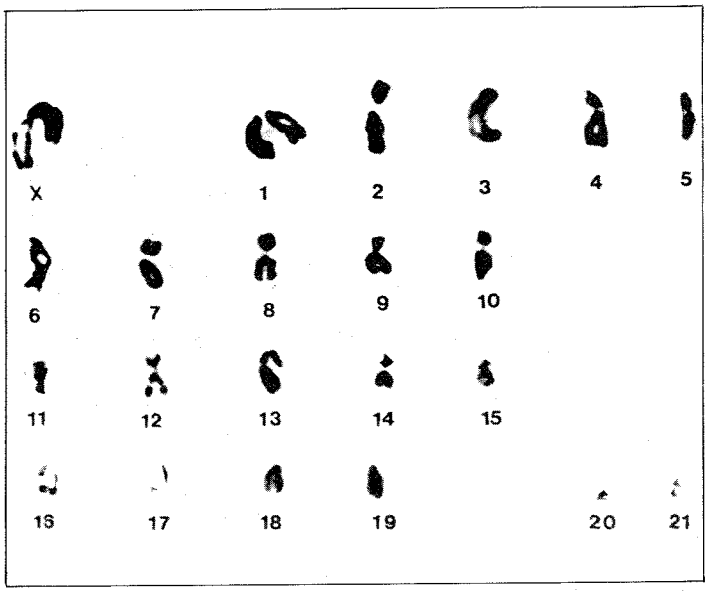

Figure 1 - Caryotype haploïde 22, X. du pronucléus femelle de hamster doré

Figure 2 - Métaphase haploïde d'un ovocyte II de hamster doré : échec de fécondation

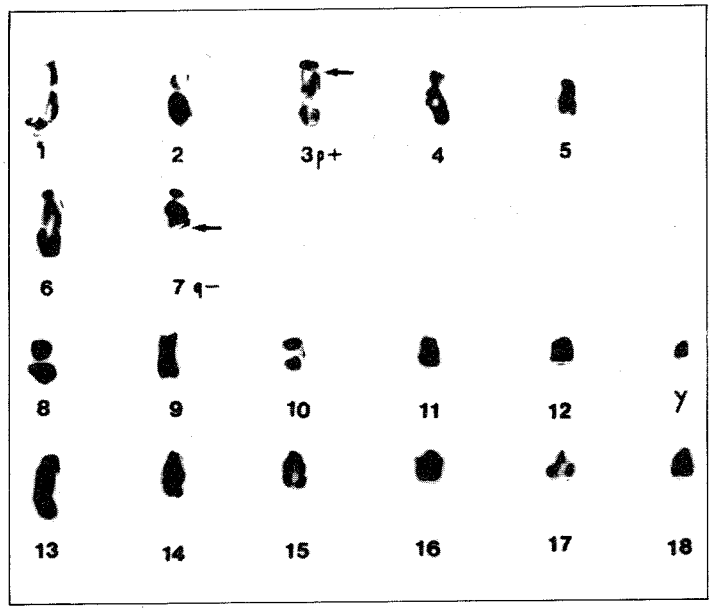

Figure 3 - Caryotype d'un spermatozoïde porteur de la translocation équilibré trcp (3 ; 7).

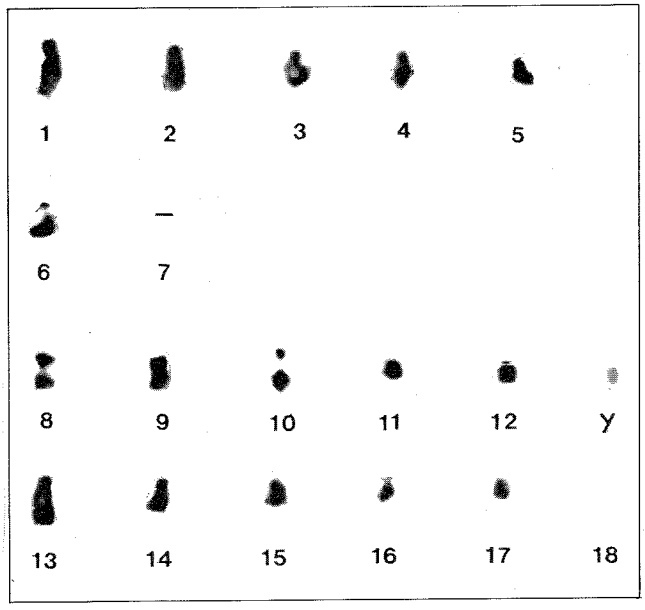

Figure 4 - Caryotype haploïde déséquilibré 18,Y,-7 résultant d'une ségrégation de type adjacente

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANGELL RR., TEMPLETON AA., AITKEN RJ., 1986, Hum. Genet., 72, 333-339.
- BENKHALIFA M., BONNEAU M., POPESCU P., BOSCHER J., BOUCHER D., MALET P., 1991, Proceedings of 7th north American Colloquium on domestic animals cytogenetics and gene mapping, 8-13.
- BENKHALIFA M., BONNEAU M., POPESCU P., BOSCHER J., BOUCHER D., MALET P., 1992, Ann Génét., 37, (sous presse).
- BIRD J.M., HOUGHTON J. A., 1988, Proceedings from the 11th International Conference on Animal Reproduction and AI, 3, 320-330.
- BIRD J.M., HOUGHTON J. A., 1990, Archives of Andrology 25, 45-57.
- BONNEAU M., BOSCHER J., POPESCU P., LEGAULT C., 1991, Journées Rech. Porcine en France, 23, 395-400.
- CREIGTHON P., HOUGHTON J.A., 1989, J. Reprod.Fert., 80, 619-622.
- DeBOER P., HOEVEN FA., CUIJPERS MP., 1986, Sreenan JM, Diskin MG (Eds). The Netherlands : Martinus Nijhoff, pp 207-215.
- FALK RM., SILVERBERG KM., FETTEROLF PM., KIRCHNER FK., ROGERS BJ., 1990, Fertil. Steril., 54, 121-126.
- KAJII T., MIKAMO K., 1986, Am. J. Hum. Genet., 38, 724-740.
- LONG SE., WILLIAMS CV., 1982, J. Reprod. Fert., 66, 645-648.
- MARTIN RH., RADEMAKER AW., HILDEBRAND K., LONG-SIMPSON L., PETERSON D., YAMAMOTO J., 1987, Hum. Genet., 77, 108-114.
- MARTIN RH., KO E., RADEMAKER A., 1991, American Journal of Medical Genetics, 39, 321-331.
- McFEELY RA., 1967, J. Reprod. Fert., 74, 597-604.
- PELLESTOR F., SELE B., JALBERT H., 1987, Hum. Genet., 76, 116-120.
- PELLESTOR F., SELE B., JALBERT H., JALBERT P., 1989, Am. J. Hum. Genet., 44, 464-473.
- PELLESTOR F., 1990, Hum. Genet., 85, 49-54.
- POPESCU CP., LEGAULT C., 1989, Journées Rech Porcine en France. 20, 297-304.
- POPESCU CP., BOSCHER J., TIXIER M., 1983, Génét. Sél. Evol., 15, 479-488.
- SELE B., PELLESTOR F., JALBET P., ESTRADE C., OSTOREDO C., GELAS M., 1985, Ann. Genet, 28, 81-85.
- SMITH JH., MARLOWE TJ, 1971, Cytogenetics, 10, 199-207.
- TATENO M., MIKAMO K., 1987, J. Reprod. Fert., 81, 1-7.
- TEMPLADO C., NAVARO J., BENET J., GENESCA A., MAR PERREZ M., EGOZCUE J., 1988, Hum. Genet., 79, 24-28.
- RUDACK E., JACOBS P.A., YANAGIMACHI R., 1978. Nature, 274, 911-913.
- YANAGIMACHI R., YANAGIMACHI H., ROGERS B.J. 1976. Biol. Reprod., 15, 471-476.