

L'INTERSEXUALITÉ CHEZ LE PORC

Aspects physiologiques et génétiques

E. PAILHOX (1), C. COTINOT (1), P. POPESCU (2), P. DANDO (3), J. GOGUÉ (3), C. LEGAULT (4)

Institut National de la Recherche Agronomique

(1) *Station de Biologie Cellulaire et Moléculaire - 78352 Jouy en Josas Cedex*

(2) *Station de Cytogénétique - 78352 Jouy en Josas Cedex*

(3) *Domaine de Galle - 18520 Avord*

(4) *Station de Génétique Quantitative et Appliquée - 78352 Jouy en Josas Cedex*

La fréquence de l'intersexualité varie de 0,1 à 0,6% chez le porc. Dans un élevage expérimental de l'INRA, la fréquence observée est de 0,34% des animaux. Vingt neuf cas, décrits dans cette étude, sont classés en 4 catégories selon leurs phénotypes internes et externes et leurs constitutions chromosomiques. Tous les intersexués présentent un caryotype 38,XX, exceptés 3 mosaïques XX/XY. Les phénotypes varient de la truie hermaphrodite vrai fertile au mâle XX sans ambiguïté. La plupart de ces animaux sont stériles, certains développent des infections uro-génitales et la moitié d'entre eux présente un taux d'androsténone supérieur à la valeur seuil. Des croisements raisonnés démontrent le caractère héréditaire de cette pathologie et semblent confirmer un mode de transmission autosomique récessif.

Pig intersexuality: physiological and genetic analysis.

In pigs, the frequency of intersexuality ranges from 0,1 to 0,6%, depending on the breed. In an isolated pig herd at INRA an intersex condition was observed in 0,34% of the animals. The present study describes 29 animals divided into 4 groups depending on their chromosomal constitution and their internal and external genitalia. All the animals had a 38,XX karyotype except 3 which had an XX/XY mosaicism. Phenotypically, they ranged from fertile sow true hermaphrodite to XX male without ambiguity. Most of the animals were sterile, some developed genital infections and half of them had an androstenone level that was greater than the threshold value. The results of analytical crosses suggest that intersexuality is inherited as an autosomal recessive trait.

INTRODUCTION

Parmi les espèces d'élevage, l'intersexualité est principalement observée chez la chèvre et le porc. Pour l'espèce porcine, les fréquences de l'anomalie varient de 0,1 à 0,6% (ALBERTSEN, 1951; KOCH, 1963). La majorité des animaux intersexués présente un phénotype pseudohermaphrodite mâle avec deux testicules et possède à la fois des dérivés des canaux de Müller (pavillon, oviducte, cornes utérines) et des canaux de Wolff (épididyme, canaux déférents, vésicules séminales). Le sexe génital externe est souvent ambigu. Dans la plupart des cas une hypertrophie clitoridienne est observée (McFEELY et al., 1967; HUNTER et al., 1982). Un second phénotype fréquemment décrit est l'hermaphrodisme vrai caractérisé par la présence des deux types de gonades dans le même individu (HUNTER et al., 1984). Un cas d'hermaphrodite vrai fertile dans le sens femelle a également été rapporté (HULLAND, 1964). Ces différents phénotypes semblent avoir une origine génétique commune puisqu'ils peuvent co-exister au sein d'une même portée (SITTMANN et al., 1980). Plusieurs auteurs ont mis en évidence le caractère héréditaire de l'intersexualité. D'après SITTMANN et al. (1980), un petit nombre de gènes serait à l'origine de la pathologie. Par contre, JOHNSTON et al. (1958) défendent l'hypothèse selon laquelle un seul gène récessif serait impliqué. D'un point de vue chromosomique, la plupart des intersexués présentent un caryotype 38,XX (BÄCKSTRÖM et HENRICSON, 1971), mais quelques cas de mosaïcisme 38,XX/38,XY ont également été décrits (McFEE et al., 1966; DE GIOVANNI et al., 1993).

Le but de ce travail consiste à établir une classification précise des intersexués, démontrer le caractère héréditaire de cette anomalie, et enfin, déterminer si l'intersexualité chez le porc peut servir de modèle à certaines pathologies humaines de la différenciation sexuelle. Dans cette étude, 29 animaux intersexués sont caractérisés d'un point de vue morphologique, chromosomique et histologique. Des techniques de biologie moléculaire sont utilisées afin de réaliser une classification précise des différents cas observés. Le déterminisme génétique de la pathologie est également abordée par l'analyse de croisements raisonnés. Enfin, les conséquences zootechniques de l'anomalie sont analysées notamment, sous l'angle de la viabilité des animaux et des risques d'odeurs sexuelles dans la viande.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Origine des animaux

L'étude a été réalisée dans le troupeau expérimental de Galle (18 - Avord) qui comprend environ 160 truies de race Large White réparties en 4 lignées dont une témoin (T) et 3 sélectionnées en faveur soit du taux d'ovulation (TO), de la survie prénatale (SP) ou du potentiel glycolytique du muscle (PG). Ce troupeau a été créé en 1988 à partir de 42 truies fondatrices originaires de l'élevage INRA de St Gilles et de 19 verrats de centres d'insémination artificielle. Les observations ont été faites sur les animaux des générations 3 et 4 de sélection alors que le coefficient de consanguinité moyen variait de 4 à 9% selon la lignée. Tous les animaux font l'objet d'un examen morphologique pour détecter visuellement les signes externes d'ambiguïtés sexuelles. De plus, la majorité des femelles des lignées T, TO et SP sont soumises, dès la puberté, à un examen des ovaires par endoscopie afin de dénombrer les

corps jaunes. Les reproducteurs ayant un descendant intersexué sont conservés en vue d'accouplements raisonnés.

1.2. Protocole d'étude des intersexués

Les animaux intersexués apparus spontanément dans l'élevage sont abattus vers le poids moyen de 110 kg, les porcelets issus de croisements raisonnés sont abattus peu de temps après le sevrage. Le tractus génital interne est prélevé, photographié et minutieusement disséqué. Des échantillons de gonades sont placés dans du fixateur pour être étudiés en histologie, d'autres sont congelés directement dans l'azote liquide pour l'extraction d'ADN. Un échantillon de tissu adipeux est prélevé sur la bardière afin de déterminer le taux d'androsténone. Des échantillons de sang sont prélevés sur les frères et soeurs des intersexués afin d'observer leurs chromosomes sexuels. Les ovaires des femelles de la portée sont observées par endoscopie dans le but de détecter l'éventuelle présence de tissu testiculaire.

1.3. Caryotype

Les caryotypes ont été réalisés à partir de cultures cellulaires de sang, rein ou poumon. L'observation des chromosomes a été faite en bandes R (VIEGAS-PEQUIGNOT et al., 1989).

1.4. Histologie des gonades

Des échantillons des gonades des animaux intersexués ont été fixées dans du paraformaldéhyde 10%. Après inclusion en paraffine, des coupes ont été réalisées puis colorées par l'hématoxyline et l'éosine avant l'observation.

1.5. Test de la présence du chromosome Y

L'ADN génomique extrait soit du sang, soit des gonades des intersexués a été isolé selon la technique de SAMBROOK et al. (1989). La recherche de la présence du chromosome Y a été effectuée par amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de trois marqueurs spécifiquement portés par ce chromosome. Ces trois marqueurs sont: le gène SRY (Sex Region of Y chromosome) inducteur primaire de la différenciation testiculaire, le gène ZFY (Zinc Finger of Y chromosome) et une séquence répétée spécifique du chromosome Y porcin (DYZ1).

2 - RÉSULTATS

2.1. Description des cas

Sur les 29 animaux décrits dans cette étude, 21 sont apparus spontanément dans l'élevage, les 8 autres sont issus de croisements raisonnés d'animaux "à risques". Les 21 cas ont été observés sur une population de 6116 individus comprenant 3124 mâles nés vivants et 2992 femelles nées vivantes. Ce qui représente une fréquence globale de l'anomalie de 0.34% de tous les individus et de 0.7% des femelles. Cette fréquence est certainement sous estimée étant donné que toutes les femelles de l'élevage ne sont pas observées par endoscopie et que tous les mâles ne sont pas étudiés pour la présence du chromosome Y.

Les 29 animaux de cette étude présentaient un caryotype 38,XX. Par cette technique aucune anomalie chromosomique n'a pu être détectée. Cependant, la présence du chromo-

some Y a été mise en évidence dans 3 cas (tabl.1), par utilisation de la technique très sensible d'amplification par PCR. Ces 3 animaux présentent un mosaïcisme (ou chimérisme) 38,XX/38,XY. Le nombre de cellules 38,XY, toujours inférieur à 5% varie selon les individus et les tissus étudiés. Ces animaux représentent une première catégorie dans laquelle l'intersexualité résulte de la présence anormale du chromosome Y (présence dans la même gonade de cellules des deux sexes). D'un point de vue phénotypique (figure 1), ces 3 cas sont très masculinisés: sexe externe ambigu (présence d'un scrotum et clitoris proéminent), sexe interne mâle (absence de dérivés Müllériens). Les gonades sont des testicules hypoplasiques dépourvus de cellules germinales.

Les 26 autres cas, dépourvus de chromosome Y présentent des degrés de masculinisation variables. Ils sont classés en 3 catégories selon le type de la gonade et le phénotype

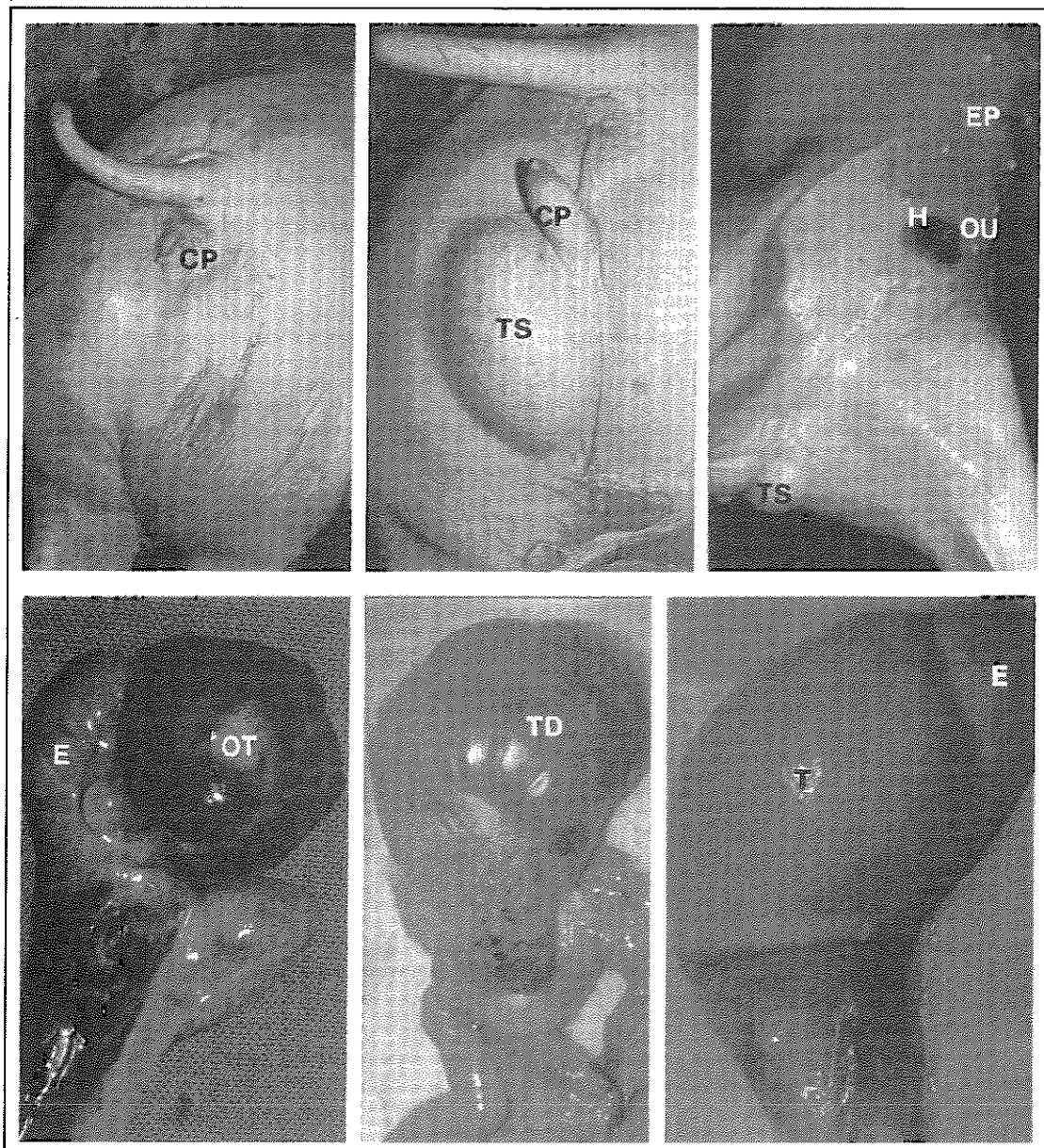
Tableau 1 - Fréquences des différents phénotypes observés parmi 29 porcs intersexués.

Phénotypes	Nombre de cas	Fréquence
Mosaïque 38,XX/38,XY	3	10%
38,XX hermaphrodite vrai	13	45%
38,XX mâle avec ambiguïtés	12	42%
38,XX mâle sans ambiguïté	1	3%

externe (Tabl.1). L'hermaphrodite vrai se caractérise par la présence simultanée de tissu ovarien et testiculaire. Différentes combinaisons sont rencontrées: 1 ovaire/1 ovotestis, 2 ovotestis, 1 ovaire/1 testicule, 1 testicule/1 ovotestis. Le phénotype externe est de type femelle avec dans certains cas un clitoris proéminent (figure 1). Le tractus génital interne

Figure 1 - Haut : exemples de différents phénotypes externes ; [de gauche à droite : femelle avec un clitoris proéminent (CP), femelle avec un clitoris proéminent et un testicule scrotal (TS), mâle XX avec hypospadias (H), l'orifice urinaire (OU) ne se situe pas à l'extrémité du pénis (EP)].

Bas : degrés variables de masculinisation de la gonade ; [de gauche à droite: ovotestis (OT) avec épидидyme (E), testicule désorganisé (TD), testicule différencié (T)].



comporte les deux types de canaux. Les cornes utérines sont présentes dans tous les cas, l'oviducte et le pavillon uniquement lorsque la gonade est un ovaire. Par contre, lorsque la gonade est un testicule ou un ovotestis, un épидидyme plus ou moins développé est visible. Certains de ces individus possèdent des canaux déférents. Les vésicules séminales n'ont jamais été observées. Treize cas de ce type (45%) ont été détectés. Parmi eux, une truie était naturellement fertile et deux autres le sont devenues après ablation chirurgicale de leur ovotestis unilatéral.

Le deuxième phénotype fréquemment rencontré (42%) est le mâle XX avec ambiguïtés génitales. Les gonades de ces individus sont toujours des testicules (figure 1) qui peuvent être en position abdominale, inguinale ou dans le scrotum. Le sexe externe est toujours ambigu. Il peut être de type mâle (figure 1) avec comme seule ambiguïté un hypospadias (orifice urétral sur la face interne du pénis). Le tractus interne comprend des dérivés du canal de Müller (uniquement les cornes utérines) plus ou moins développés selon le degré de différenciation des testicules. Des épидидymes sont visibles dans tous les cas, très souvent des canaux déférents et quelque fois des vésicules séminales.

Le troisième phénotype, mâle XX sans ambiguïté semble assez rare (1 cas sur 29) et n'avait jamais été rapporté dans la littérature pour l'espèce porcine. L'animal présentait un phénotype externe et interne de type mâle. La seule anomalie visible était une cryptorchidie du testicule gauche. Le caryotype et l'analyse moléculaire ont permis de mettre en évidence l'absence totale du chromosome Y.

D'un point de vue histologique, les testicules de tous ces animaux présentent des tubes séminifères dépourvus de cellules germinales. L'état de différenciation des tubes est variable selon la gonade étudiée et parfois selon la région observée d'une même gonade. La glande interstitielle, conte-

nant les cellules de Leydig sécrétrices d'androgènes, est également plus ou moins développée selon les régions étudiées. L'albuginée est fréquemment discontinuée.

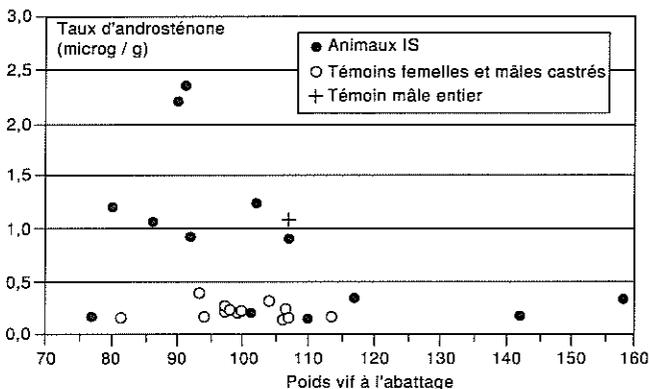
2.2. Incidence zootechnique

L'intersexualité se traduit dans la plupart des cas par une stérilité totale et irréversible de l'individu et dans les cas de moindre expressivité, par des troubles de la reproduction (absence de puberté, refus du mâle, retours en chaleur répétés). Ceci laisse supposer que cette anomalie est responsable d'une fraction méconnue des échecs de reproduction, avec des conséquences défavorables sur l'intensité de sélection et l'équilibre économique de l'élevage.

Les malformations de l'appareil uro-génital entravent le bon fonctionnement du système urinaire et provoquent des infections pouvant causer la mort de l'animal. Sur les 29 intersexués observés, la moitié environ étaient atteints d'infection et 3 cas de mortalité ont été enregistrés parmi les animaux les plus masculinisés. Ces troubles entraînent une chute de l'appétit et un ralentissement de croissance. Les intersexués figurent généralement en queue de distribution dans les bandes d'engraissement.

Au même titre que les verrats et les cryptorchides, les intersexués sont déclassés à l'abattoir à cause du risque d'odeurs sexuelles. Pour vérifier le bien fondé de cette pratique, l'androsténone a été dosée chez 13 intersexués et autant d'animaux témoins femelles et mâles castrés. Comme l'illustre la figure 2a, environ la moitié des intersexués présente un taux d'androsténone inférieur au seuil de sécurité (0,5 mg/g), l'autre moitié a un taux supérieur au seuil d'alerte (1 mg/g). Pour clarifier la situation, une "note de masculinisation" comprise entre 0 et 1 a été attribuée à chaque intersexué. Une liaison très étroite entre le degré de masculinisation et le taux d'androsténone ($r = 0,79$) est alors mise en évidence (figure 2b).

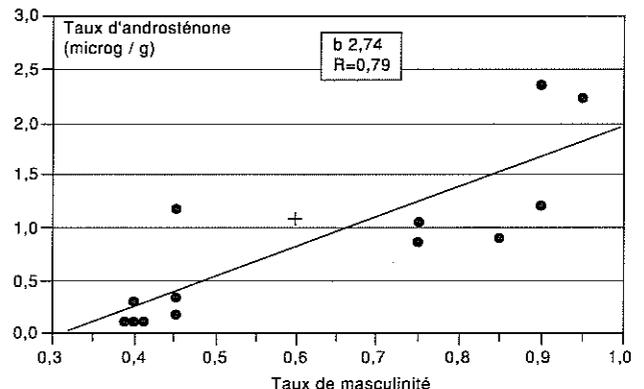
Figure 2a - Répartition du taux d'androsténone en fonction du poids d'abattage chez les animaux IS et témoins



2.3. Déterminisme génétique

Afin de s'assurer de l'héritabilité de l'intersexualité et de comprendre le déterminisme génétique de cette pathologie, différents types de croisements raisonnés ont été réalisés : (i) répétition du croisement initial, afin de vérifier s'il est possible d'obtenir de nouveau des animaux intersexués; (ii) test de complémentation entre différents parents ayant produit des

Figure 2b - Régression du taux d'androsténone sur le taux de masculinité chez les IS

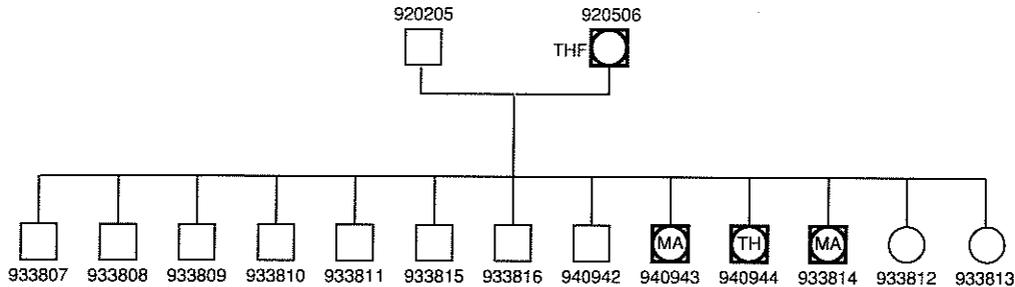


intersexués, afin de tester s'il s'agit de la même mutation; (iii) utilisation de truies hermaphrodites fertiles, afin de voir si la fréquence d'intersexués augmentent dans ces portées. Les résultats de ces premiers croisements, indiquent que la pathologie est héréditaire (la répétition du même croisement reproduit des intersexués). De plus, les résultats semblent conforter l'hypothèse d'un seul gène autosomique impliqué, se transmettant selon un mode récessif (figure 3). Sur

4 croisements (1 répétition et 3 complémentations), le nombre d'intersexués observés est de 4 sur 22 animaux 38,XX (18%). Deux truies hermaphrodites fertiles (homozygotes selon l'hypothèse) croisées avec 2 verrats parents d'intersexués (hétérozygotes) ont produit 4/9 animaux atteints parmi

les 38,XX (45%). Ces fréquences observées ne sont pas significativement différentes de celles attendues, 25 et 50% respectivement. Les différents phénotypes observés au niveau des cas sporadiques, se retrouvent parmi les intersexués d'une même portée (figure 3).

Figure 3 - Croisement raisonné d'un hermaphrodite vrai (THF) par un verrot hétérozygote.
(MA = Mâle XX avec Ambiguïtés ; TH = Hemaphrodite vrai)



3. DISCUSSION

Cette étude montre que chez le porc, l'intersexualité peut avoir au moins deux origines. La première qui représente un pourcentage limité de cas serait la conséquence d'une anomalie où des cellules des deux sexes sont présentes dans le même individu. Ce type d'anomalie peut résulter soit de chimérisme pour lequel les deux types cellulaires proviennent de deux individus différents (free-Martinisme, fusions de deux zygotes XX et XY); soit de mosaïcisme s'ils dérivent d'un seul zygote. Pour les trois cas décrits dans cette étude, la population cellulaire XY étant très minoritaire, il sera difficile de l'étudier afin d'en connaître l'origine.

La deuxième catégorie d'intersexués (90%) se compose d'individus 38,XX présentant des degrés de masculinisation très variables (de la truie hermaphrodite vraie fertile, au verrot XX sans ambiguïté). Ce type de pathologie est rencontré dans d'autres espèces comme le chien (MEYERS-WALLEN, 1993), la chèvre (PAILHOUX et al., 1994) et l'homme (ABBAS et al., 1990). Chez la chèvre et le chien l'intersexualité résulte d'une mutation récessive d'un seul gène autosomique. Dans ces deux espèces, l'expressivité de la mutation est très variable et conduit à deux phénotypes: l'hermaphrodite vrai et le mâle XX avec ambiguïtés. Aucun cas de mâles XX sans ambiguïté n'a été rapporté dans ces espèces mais ce type de cas est difficile à détecter.

La variabilité des phénotypes externes et internes s'explique par la quantité variable de tissu testiculaire présent dans l'individu. En d'autres termes, plus les gonades sont masculinisées, plus les androgènes sont abondants et plus les tissus cibles se différencient dans le sens mâle. Il en va de même pour l'odeur sexuel de la viande d'intersexués. Le fait qu'une seule et même mutation entraîne une variabilité importante de la gonade reste difficile à expliquer. Elle pourrait résulter soit d'un décalage dans le temps de l'expression du

gène muté, soit d'un niveau d'expression variable selon les individus.

Les testicules de tous ces animaux intersexués sont non fonctionnels car dépourvus de cellules de la lignée germinale. Des coupes histologiques de testicules de jeunes porcs intersexués révèlent cependant la présence de quelques rares cellules germinales souches (gonies). Ces cellules disparaissent ensuite car aucune cellule germinale n'est visible chez les porcs adultes. Ce phénomène est très certainement lié à l'absence des gènes nécessaires à la spermatogénèse qui sont localisés sur le chromosome Y.

La classification précise des différents cas d'intersexués porcins, montre une grande similitude avec les observations réalisées chez les hommes XX (de la CHAPELLE, 1987). De ce fait, le porc semble constituer un très bon modèle pour étudier le mode de transmission du caractère et surtout rechercher le ou les gène(s) impliqués dans cette anomalie. L'isolement du ou des gène(s) en cause permettrait de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la différenciation testiculaire chez les mammifères. Il serait également possible de mieux contrôler la propagation de la mutation (diagnostic pré-natal chez l'homme dans les familles à risques et dépistage chez les verrats d'insémination) et à terme de l'éradiquer dans l'espèce porcine.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Hervé LAGANT qui assure la gestion informatisée du troupeau ainsi que Michel BONNEAU de la Station de Recherches Porcines de St Gilles qui a effectué les dosages d'androsténone.

Ce travail est financé par l'INRA et l'INSERM (contrat No. 930705).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABBAS N.E., TOUBLANC J.E., BOUCEKKINE C., TOUBLANC M., AFFARA N.A., JOB J.-C., FELLOUS M., 1990. *Hum. Genet.*, 84, 356-360.
- ALBERTSEN K., 1951. *Nord. Vet.-Med.*, 3, 849-868.
- BÄCKSTRÖM L., HENRICSON B., 1971. *Acta Vet. Scand.*, 12, 257-273.
- CHAPELLE A. de la, 1987. *Development*, 101, 33-38.
- DE GIOVANNI A.M., MOLTENI L., PARMA P., POPESCU P., BOSCHER J., 1993. 10th European colloquium on cytogenetics of domestic animal, Utrecht, 57-61.
- HULLAND T.J., 1964. *Canad. Vet. J.*, 5, 39-41.
- HUNTER R.H.F., BAKER T.G., COOK B., 1982. *J. Reprod. Fert.*, 64, 217-222.
- HUNTER R.H.F., COOK B., BAKER T.G., 1984. *J. Endocrinol.*, 106, 233-242.
- JOHNSTON E.F., ZELLER J.H., CANTWELL G., 1958. *J. Hered.*, 49, 254-261.
- KOCH W., 1963. In *Intersexuality*. C. Overzier (Ed.), Academic Press, New York, 563 p.
- McFEE A.F., KNIGHT M., BAUNER M.W., 1966. *Canad. J. Genet.*, 8, 502-505.
- McFEELY R.A., HAREM C.D., BIGGERS J.D., 1967. *Cytogenetics*, 6, 242-253.
- MEYERS-WALLEN V.N., 1993. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 47, 441-452.
- PAILHOUS E., CRIBIU E.P., CHAFFAUX S., DARRE R., FELLOUS M., COTINOT C., 1994. *J. Reprod. Fert.*, 100, 491-496.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T., 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- SITTMANN K., BREEUWSMA A.J., te BRAKE J.H.A., 1980. *Can. J. Genet. Cytol.*, 22, 507-527.
- VIEGAS-PEQUIGNOT E., DUTRILLAUX B., MAGDELENAT H., COPPEY-MOISAN M., 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 582-586.