

# Estimation du taux de gamètes génétiquement déséquilibrés dans la semence de verrats porteurs d'anomalies chromosomiques par la technique de « SpermFISH »

Alain PINTON (1), Alain DUCOS (1), Martine YERLE (2)

(1) UMR INRA-ENVT de cytogénétique des populations animales

Ecole nationale vétérinaire de Toulouse

23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex 3

(2) INRA Laboratoire de génétique cellulaire

Auzeville, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan cedex

## Estimation du taux de gamètes génétiquement déséquilibrés dans la semence de verrats porteurs d'anomalies chromosomiques par la technique de « SpermFISH »

De nombreuses anomalies chromosomiques sont détectées chaque année en France sur de jeunes verrats candidats à la reproduction. L'utilisation éventuelle de ces animaux nécessite de connaître l'effet potentiel des anomalies sur la prolificité de leurs conjointes. Cet effet peut être estimé en déterminant de façon précise le taux de spermatozoïdes déséquilibrés dans la semence des verrats porteurs (ces spermatozoïdes, normalement féconds, sont à l'origine d'une mortalité précoce des embryons, donc d'une réduction des tailles de portées). La technique de « spermFISH » (hybridation *in situ* fluorescente sur noyaux de spermatozoïdes décondensés) a été utilisée à plusieurs reprises, chez l'homme, avec des objectifs similaires. Nous l'avons appliquée, pour la première fois dans une espèce animale d'élevage, pour estimer les taux de déséquilibre dans la semence de quatre verrats porteurs d'anomalies chromosomiques : deux translocations réciproques, rcp(3;15)(q27;q13) et rcp(12;14)(q13;q21), et deux cas indépendants de trisomie 18 en mosaïque. Les taux de gamètes déséquilibrés étaient relativement élevés dans le cas des translocations réciproques (47,83 % et 24,33 %, respectivement). Ces valeurs s'écartaient des effets apparents des remaniements estimés à partir d'un nombre limité de portées : baisses de prolificité de 23 % (estimation obtenue à partir des résultats de 6 portées) et de 39 % (57 portées), respectivement pour les translocations 3/15 et 12/14. Les taux de déséquilibre étaient beaucoup plus faibles dans le cas des trisomies en mosaïque (0,58 % et 1,13 %), suggérant un effet très limité de ce type particulier d'anomalie chromosomique.

## Estimation of the level of genetically unbalanced spermatozoa in the semen of boars carrying chromosomal rearrangements using the "spermFISH" technique

In France, many chromosomal rearrangements are detected each year in young boars which are candidates for reproduction. The possibility of using these animals depends on possessing sufficient knowledge of the potential effect of the rearrangements on the prolificity of their mates. This effect can be estimated by accurately determining the level of unbalanced spermatozoa in the semen of carrier boars (these spermatozoa, which possess normal fertilising ability, are responsible for early embryonic mortality, and therefore a decrease in litter size). The "spermFISH" technique (fluorescent *in situ* hybridisation on decondensed sperm heads) has been used on several occasions in man, for similar objectives. We used it, for the first time in a livestock species, to estimate the levels of unbalance in the semen of four boars carrying chromosomal rearrangements : two reciprocal translocations, rcp(3;15)(q27;q13) and rcp(12;14)(q13;q21), as well as two independent cases of trisomy 18 mosaicism. The levels of unbalanced gametes were relatively high for the two reciprocal translocations (47.83% and 24.33%, respectively). These values differed from the apparent effects of the rearrangements estimated using a limited number of litters : decrease in prolificity of 23% (estimation obtained using the results of 6 litters) and 39% (using 57 litters) for the 3/15 and 12/14 translocations respectively. The unbalance levels were much lower for the trisomy mosaicism cases (0.58% and 1.13%), suggesting a very moderate effect of this special kind of chromosomal rearrangement on prolificity.

## INTRODUCTION

Les remaniements chromosomiques constitutionnels sont des anomalies génétiques relativement fréquentes dans la plupart des espèces animales. Chez l'homme, ils sont à l'origine de troubles de la reproduction (infertilité, avortements précoces) et responsables d'importantes anomalies congénitales (malformations et retards mentaux). Leur fréquence est de l'ordre de 0,7 % chez les nouveaux nés vivants (BERGER, 1998). Une fréquence comparable a été estimée récemment, chez le porc, dans un échantillon de jeunes verrats de race pure candidats à l'insémination artificielle (0,4 % - DUCOS et al., 2002a). L'impact principal des anomalies chromosomiques dans les espèces animales d'élevage se situe au niveau des performances de reproduction des animaux porteurs et/ou de leurs conjointes, en raison de la production potentielle, par les reproducteurs porteurs, de gamètes génétiquement déséquilibrés induisant une mortalité précoce des embryons. L'analyse chromosomique systématique de verrats hypoprolifères (dont la taille de portée moyenne des conjointes est très dégradée) a permis de mettre en évidence, dans le passé, de nombreux remaniements (voir par exemple PINTON et al., 2000). Les conséquences économiques de telles anomalies peuvent être extrêmement importantes si l'individu porteur a un nombre élevé de conjointes, comme c'est le cas pour les animaux utilisés en insémination artificielle par exemple (POPESCU et al., 1984). Ces considérations économiques ont motivé la mise en place de dispositifs de contrôle chromosomique systématique des candidats reproducteurs dans de nombreuses populations porcines sélectionnées (DUCOS et al., 1997 ; 2002a). Ces contrôles ont permis de mettre en évidence des remaniements variés (translocations réciproques, inversions péri- et paracentriques, trisomie en mosaïque ...) sur de jeunes animaux avant leur mise à la reproduction. Des analyses familiales ont, dans certains cas, permis de retrouver l'anomalie sur d'autres animaux apparentés. La fréquence d'anomalies particulières s'est avérée importante dans certaines populations sélectionnées (jusqu'à 10 % d'animaux porteurs). Ces remaniements chromosomiques ayant des effets potentiellement néfastes en élevage, leur éradication (réforme des candidats reproducteurs et des autres individus porteurs) était jusqu'à présent systématiquement conseillée. Toutefois, à plusieurs reprises, l'application de cette recommandation s'est avérée difficile. Dans certaines populations sélectionnées de petite taille, l'éradication de l'anomalie impliquait en effet l'élimination d'individus génétiquement très intéressants, induisant une baisse sensible de l'efficacité du programme de sélection. Dans ce type de situation, l'éradication du remaniement n'est pertinente que si ce dernier est effectivement responsable d'une dégradation des performances de reproduction. La connaissance des effets des anomalies est donc nécessaire pour ajuster au mieux la politique de sélection. L'effet d'une anomalie chromosomique sur les performances de reproduction peut être estimé en mettant volontairement à la reproduction les individus porteurs (contrôle de descendance). Cette stratégie a le double inconvénient du coût élevé et du temps important nécessaire à l'obtention d'un résultat. Les gamètes déséquilibrés (à l'origine de la mortalité embryonnaire, donc des baisses de prolificité) gardant intact leur pouvoir fécondant (POPESCU, 1989 ; DUCOS et al., 2000), une alternative intéressante consiste à analyser et quantifier directement, *in vitro*, les déséquilibres chromoso-

miques dans la semence des individus porteurs d'anomalies chromosomiques. Deux approches techniques, initialement développées dans l'espèce humaine, sont utilisables dans ce domaine. La première, proposée dès 1978 (RUDAK et al., 1978), est basée sur la pénétration d'ovocytes de hamster par les spermatozoïdes de l'individu étudié, suivie de la fixation des chromosomes du pronucleus. Cette approche, extrêmement lourde à mettre en œuvre (nécessité de disposer de hamster femelles superovulées ...), ne permet l'analyse que d'un nombre limité de gamètes et donne des résultats potentiellement biaisés dans la mesure où elle ne permet d'analyser que les gamètes ayant effectivement fécondé les ovocytes de hamster. Elle est généralement délaissée, depuis 1997, au profit d'une autre approche basée sur l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur noyaux de spermatozoïdes décondensés (« sperm-FISH »). Cette technique a prouvé son efficacité à maintes reprises pour l'étude des ségrégations méiotiques de remaniements chromosomiques dans l'espèce humaine (voir par exemple DOWNIE et al., 1997 ; VAN HUMMELEN et al., 1997 ; BLANCO et al., 1998 ; JAAROLA et al., 1998 ; CIFUENTES et al., 1999 ; HONDA et al., 2000). Elle a été appliquée pour l'analyse des déséquilibres chromosomiques dans la semence de quatre verrats porteurs d'anomalies chromosomiques. Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans la suite de cet article.

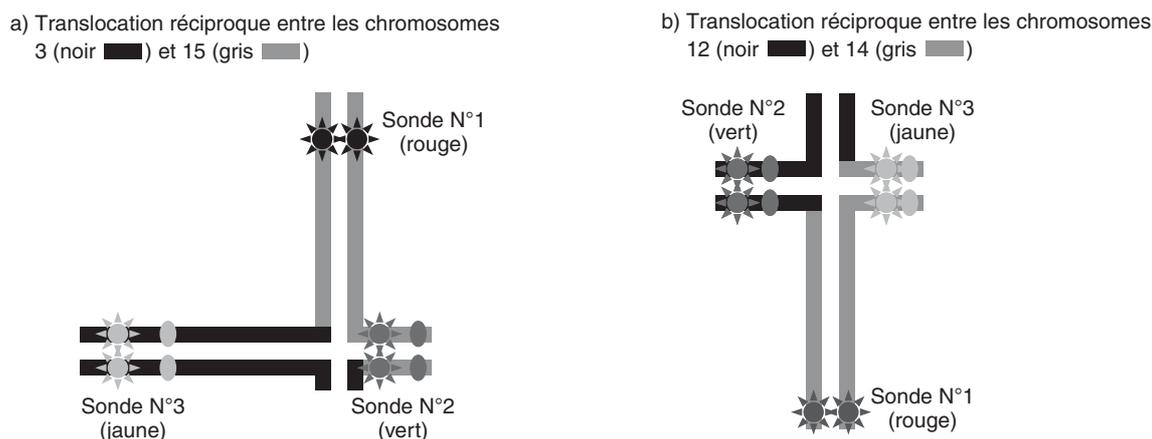
## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Animaux / Anomalies étudiées

Trois anomalies chromosomiques ont été considérées dans cette étude. Deux d'entre-elles étaient des translocations réciproques. La première, rcp(3;15)(q27;q13), a été identifiée sur un jeune verroat de race Large White contrôlé avant sa mise en service dans un centre d'insémination artificielle. Six portées ont été procréées avec ce verroat à des fins expérimentales. La taille moyenne de ces portées était inférieure de 23 % à celles issues des autres verrats contemporains de l'élevage (9,2 porcelets nés totaux contre 12). La seconde, rcp(12;14)(q13;q21), a été mise en évidence chez un verroat issu d'une lignée composite, utilisé dans un élevage de multiplication. Les portées issues de ce verroat (57 au total) étaient en moyenne de taille inférieure aux portées engendrées par les verrats contemporains de l'élevage (6,70 porcelets nés totaux contre 10,98, soit une baisse de prolificité de 39 %). La troisième anomalie chromosomique était une trisomie 18 en mosaïque. Elle a été diagnostiquée de façon indépendante chez deux verrats candidats à l'insémination artificielle (caryotypes  $2n = 38, XY / 39, XY, +18$ ). L'un était de race Landrace Français, l'autre de race Piétrain. Dans les deux cas, des cellules trisomiques 18 ont été retrouvées dans différents tissus (lymphocytes, fibroblastes de peau ...). La proportion moyenne de cellules trisomiques chez ces animaux était de 23 % et 50 %, respectivement. Ces deux verrats ont été réformés sans être utilisés pour la reproduction.

### 1.2. Principes de la technique de « SpermFISH »

La technique de « SpermFISH » permet théoriquement de distinguer, dans la semence d'individus porteurs de remaniements chromosomiques, les spermatozoïdes normaux et/ou



**Figure 1** - Quadrivalents attendus lors de la prophase I.  
Les signaux sur les chromosomes indiquent la localisation des sondes de FISH utilisées.

équilibrés des spermatozoïdes déséquilibrés (contenant du matériel génétique en excès ou en défaut).

Dans le cas des translocations réciproques, les premiers sont majoritairement issus d'une ségrégation dite « alterne », tandis que les seconds sont principalement produits par les ségrégations « adjacentes » (1 ou 2) et « 3:1 » (DUCOS et al., 1996). La distinction entre les produits de ségrégation (ou plus simplement entre gamètes équilibrés et gamètes déséquilibrés) nécessite l'hybridation simultanée de trois sondes sur des noyaux de sperme décondensés. Le choix des sondes est effectué après avoir caractérisé finement les remaniements (par la technique de peinture chromosomique par exemple ; PINTON et al., 1998 et DUCOS et al., 2002b). Deux des sondes sont choisies au niveau des parties non transloquées des chromosomes impliqués, et la troisième sur l'un des segments chromosomiques transloqués (figure 1). Chaque sonde est révélée par un fluorochrome différent (un rouge, un vert et un jaune). L'analyse des lames permet de révéler, pour chaque translocation, 18 « phénotypes

fluorescents » dans la population de gamètes (tableau 1). Un seul (un signal unique pour chaque sonde) correspond aux gamètes équilibrés (normaux ou transloqués équilibrés).

Dans les deux cas de trisomie 18 en mosaïque, une contamination de la lignée germinale (présence de cellules trisomiques) était suspectée. Les verrats porteurs de ce type d'anomalie étaient par conséquent susceptibles de produire des spermatozoïdes disomiques (2 chromosomes 18) avec une fréquence anormalement élevée. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à l'hybridation simultanée de deux sondes sur des préparations de sperme correspondant aux deux animaux porteurs et à un témoin (caryotype normal). L'une des sondes était spécifique du chromosome 18 (localisée en 18q23), et l'autre (sonde de référence) spécifique du chromosome 3 (la même que celle utilisée pour la translocation 3/15). L'intérêt de l'hybridation simultanée des deux sondes est notamment de pouvoir distinguer les spermatozoïdes disomiques pour le chromosome 18 des spermatozoïdes diploïdes. Les spermatozoïdes normaux sont censés

**Tableau 1** - Fréquence des différents produits de ségrégation dans la semence de verrats porteurs de translocations réciproques

A) translocation rcp (3 ; 15) (q27 ; q13)

ségrégation	alterne + adjacente-1			adjacente-2						3:1							
phénotype <sup>(1)</sup>	JRV <sup>(3)</sup>	JV	JRRV	RVV	JJR	JJ	JJRR	VV	RRVV	V	JJRRV	RV	JJRV	JR	JRVV	J	JRRVV
nombre <sup>(2)</sup>	<b>1565</b>	475	467	35	18	10	5	2	18	31	5	91	7	136	27	79	29
fréquence (%)	<b>52,17</b>	15,83	15,57	1,17	0,60	0,33	0,17	0,07	0,60	1,03	0,17	3,03	0,23	4,53	0,90	2,63	0,97
fréquence cumulée (%)	83,57			2,93						13,50							

B) translocation rcp (12 ; 14) (q13 ; q21)

ségrégation	alterne + adjacente-1			adjacente-2						3:1						diploïde		
phénotype <sup>(1)</sup>	JRV <sup>(3)</sup>	JV	JRRV	RVV	JJR	JJ	JJRR	VV	RRVV	V	JJRRV	RV	JJRV	JR	JRVV		J	JRRVV
nombre <sup>(2)</sup>	<b>2283</b>	332	116	101	10	35	3	20	1	6	3	26	3	21	7	37	0	2
fréquence (%)	<b>75,67</b>	11,00	3,84	3,35	0,33	1,16	0,10	0,66	0,03	0,20	0,10	0,86	0,10	0,70	0,23	1,23	0,00	0,07
fréquence cumulée (%)	90,52			5,63						3,41						0,07		

<sup>(1)</sup> signaux fluorescents mis en évidence sur les spermatozoïdes décondensés : J = jaune, R = rouge, V = vert

<sup>(2)</sup> nombre des spermatozoïdes présentant le phénotype correspondant

<sup>(3)</sup> JRV : spermatozoïdes équilibrés

**Tableau 2** - Nombre (et fréquence) des différents produits de ségrégation dans la semence de deux verrats porteurs de trisomie 18 en mosaïque et dans la semence d'un verrat témoin à caryotype normal

statut chromosomique	nullisomie 3	nullisomie 18	disomie3	disomie 18	diploïdie	normal
animal témoin	8 (0,08 %)	3 (0,03 %)	3 (0,03 %)	2 (0,02 %)	2 (0,02 %)	<b>10081</b> <b>(99,82 %)</b>
animal 1 (mosaïque)	17 (0,17 %)	2 (0,02 %)	11 (0,11 %)	24 (0,24 %)	4 (0,04 %)	<b>10000</b> <b>(99,42 %)</b>
animal 2 (mosaïque)	25 (0,25 %)	6 (0,06 %)	10 (0,1 %)	72 (0,71 %)	2 (0,02 %)	<b>10088</b> <b>(98,87 %)</b>

présenter un signal unique pour chacune des sondes. Les déséquilibres mis en évidence sont les disomies, les nullisomies, et les diploïdies (tableau 2).

### 1.3. Préparation des échantillons de semence (décondensation) et hybridation

Les échantillons de semence, pour les animaux porteurs des remaniements comme pour les témoins, ont été obtenus sous forme de doses d'insémination artificielle. Dès leur arrivée au laboratoire les suspensions ont été centrifugées 6 minutes à 1200 trs/mn et les spermatozoïdes congelés à -20°C dans un mélange sérum de veau fœtal 90 %, glycérol 10 %. Avant étalement sur lame, les échantillons ont été décongelés à température ambiante et lavés dans du PBS. Une fois le surnageant éliminé, la suspension a été étalée par frottis (100 µl par lame) avant d'être séchée à l'air libre et température ambiante pendant une nuit. Le lendemain, les préparations ont été fixées 20 minutes dans du Carnoy (éthanol 3 volumes, acide acétique 1 volume) et séchées à l'air libre. L'étape de décondensation des noyaux de spermatozoïdes a été réalisée en s'inspirant du protocole développé par HASSANANE et al. (1999) consistant en une incubation dans 200 µl de DTT et papaine (1,250 g papaine, 0,155g DTT dissous dans 100 ml de tampon Tris 0,2M, pH 8,6) à température ambiante. Le temps de décondensation optimal a été déterminé expérimentalement entre 8 et 9 minutes. La décondensation a été arrêtée par immersion de la lame dans un bain de PBS.

Toutes les sondes utilisées étaient de type BAC, et contenaient des gènes ou des marqueurs microsatellites préalablement localisés sur les cartes porcines (cartes cytogénétique, génétique et d'hybrides d'irradiation). Ces sondes ont été marquées en utilisant une combinaison de deux fluorochromes (Alexa 488 et Alexa 594, Molecular Probes). Les hybridations ont été réalisées suivant un protocole préalablement décrit par YERLE et al. (1994). Les lames ont été analysées sur un microscope Zeiss AXIOSKOP à épifluorescence équipé d'un filtre triple bande (DAPI / FITC / Texas Red). Seuls les noyaux de spermatozoïdes présentant des signaux d'hybridation d'égale intensité séparés d'au moins une distance équivalente à la taille d'un signal ont été comptés. Un nombre minimum de 3000 noyaux a été compté pour chaque translocation réciproque. Ce nombre a été porté à 10000 pour les trisomies 18 en mosaïque.

## 2. RESULTATS

L'efficacité d'hybridation des sondes sur les noyaux de spermatozoïdes décondensés était dans tous les cas supérieure à

99 %. Les résultats obtenus pour les différentes anomalies sont détaillés dans les tableaux 1 et 2 et résumés ci-dessous.

Dans le cas de la translocation rcp(3;15)(q27;q13), la proportion de spermatozoïdes issus des ségrégations alterne et adjacente-1 était égale à 83,57 %. La ségrégation adjacente-2 était responsable de la production de 2,93 % des spermatozoïdes. Une proportion plus importante (13,5 %) était issue de ségrégation 3:1. Cette expérience a permis de déterminer les proportions de spermatozoïdes génétiquement équilibrés (1 signal unique de chaque sonde) et déséquilibrés (52,17 % et 47,83 %, respectivement).

Des proportions sensiblement différentes ont été estimées pour la translocation rcp(12;14)(q13;q21). Les ségrégations alterne et adjacente-1 représentaient globalement 90,52 % des spermatozoïdes analysés, contre 5,63 % pour la ségrégation adjacente-2 et 3,41 % pour la ségrégation 3:1. Contrairement à la translocation 3/15, deux spermatozoïdes diploïdes ont également été mis en évidence lors de cette analyse. Les proportions de spermatozoïdes génétiquement équilibrés et déséquilibrés étaient de 75,67 % et 24,33 %, respectivement.

Plus de 10 000 noyaux de spermatozoïdes ont été analysés pour chaque animal porteur de trisomie 18 en mosaïque et pour l'animal témoin. Dans le premier cas, une très grande majorité de noyaux (99,42 %) présentait un phénotype équilibré (deux signaux d'hybridation de couleur différente). La proportion estimée de spermatozoïdes disomiques pour le chromosome 18 (double signal d'hybridation pour le chromosome 18 et signal unique pour le chromosome 3 de référence) était de 0,24 %. Cette proportion était supérieure à celle estimée pour les spermatozoïdes disomiques 3 (0,11 %). Pour le deuxième animal, la proportion estimée de gamètes génétiquement équilibrés était légèrement inférieure (98,87 %). La proportion de gamètes disomiques 18 (0,71 %) était significativement supérieure à celle estimée pour le premier individu ( $P < 0,0001$ ), mais restait globalement très faible. Les proportions de gamètes disomiques 18 étaient significativement plus élevées chez les deux individus porteurs de la trisomie 18 en mosaïque que chez l'animal témoin ( $P < 0,0001$ ).

## 3. DISCUSSION

L'utilisation de la technique de « spermFISH » pour l'analyse des produits de ségrégation dans la semence d'individus porteurs d'anomalies chromosomiques a été rapportée à de nombreuses reprises chez l'homme (voir par exemple la

revue de GUTTENBACH et al., 1997). A l'inverse, une telle application n'avait jamais été mise en oeuvre jusqu'à présent dans une espèce animale d'élevage.

Cette méthode, en raison du nombre très important de gamètes examinés, permet une estimation précise des proportions de gamètes équilibrés et déséquilibrés. Elle ne permet pas par contre, dans le cas des translocations réciproques, de faire la distinction entre les deux types de gamètes équilibrés (normaux et transloqués équilibrés). Ces deux types de gamètes sont néanmoins issus des mêmes mécanismes de ségrégation méiotique et devraient donc être représentés dans la semence dans des proportions comparables. La technique de « spermFISH » ne permet pas non plus, toujours dans le cas des translocations réciproques, de déterminer de façon précise les profils de ségrégation des anomalies (estimation des proportions de gamètes issus de tous les types de ségrégation). Les trois premiers phénotypes présentés dans le tableau 1 peuvent en effet être produits par différents mécanismes de ségrégation (alterne, ou ségrégation adjacente-1 avec recombinaison(s) interstitielle(s) – voir par exemple OLIVER-BONET et al., 2001), ce qui nécessite de les considérer conjointement. Ces deux limites n'ont cependant aucune conséquence sur l'estimation des taux de gamètes (dés)équilibrés, qui reste le principal objectif de nos travaux.

Les résultats obtenus pour les deux translocations réciproques considérées dans cette étude sont conformes à certaines observations faites chez l'homme. La première est la prépondérance des ségrégations alterne et adjacente-1. Sur les 34 translocations réciproques humaines passées en revue par FARAUT et al. (2000), cette proportion variait entre 58 % et 100 %. Les valeurs de 83,57 % et 90,52 % estimées ici sont assez voisines de celles rapportées chez l'homme pour de nombreuses translocations réciproques. La variabilité des proportions de gamètes déséquilibrés mise en évidence dans cette étude (47,83 % et 24,33 %, respectivement pour les deux translocations) est également cohérente avec ce qui est connu chez l'homme (taux de déséquilibre estimés variant entre 18 % et 77 % - PELLESTOR et al., 1997). Cette variabilité existe aussi au niveau des proportions estimées pour les différents produits de ségrégation : 31,4 % (translocation 3/15) contre 14,84 % (translocation 12/14) pour la ségrégation adjacente-1 ; 2,93 % (translocation 3/15) contre 5,63 % (translocation 12/14) pour la ségrégation adjacente-2 ; 13,5 % (translocation 3/15) contre 3,41 % (translocation 12/14) pour la ségrégation 3:1. Les mécanismes particuliers mis en oeuvre lors de la méiose chez un individu hétérozygote pour une translocation réciproque sont directement responsables de cette variabilité. Lors de la prophase de première division méiotique (stade pachytène, prophase I), les chromosomes normaux et transloqués (des paires chromosomiques concernées par l'anomalie) s'associent par leurs parties homologues pour former un quadrivalent (figure 1). La forme de ce quadrivalent est directement liée à la forme des chromosomes et à la taille des segments chromosomiques impliqués dans le remaniement (segments centriques et segments transloqués, dont les tailles respectives dépendent de la localisation des points de cassure). La structure du quadrivalent détermine en grande partie la dis-

position des chiasmata sur les différents segments (un chiasma, ou crossing-over, est d'autant plus probable que la taille des segments chromosomiques est importante). La présence de ces chiasmata détermine à son tour l'évolution des configurations méiotiques lors de la ségrégation (formation d'anneaux, de chaînes, ...). Les configurations adoptées déterminent enfin l'orientation des multivalents (orientations adjacentes ou alterne), donc les profils de ségrégation et la probabilité d'apparition de gamètes déséquilibrés (GOLDMAN et HULTEN, 1993a, 1993b ; TEASE, 1996, 1998).

Les taux de déséquilibre estimés pour les deux translocations réciproques sont assez élevés et justifient les programmes d'éradication mis en oeuvre par les organisations de sélection. Dans le cas de la translocation 3/15, le taux de déséquilibre estimé (47,83 %) est sensiblement supérieur à l'effet apparent du remaniement (portées réduites de 25 % en moyenne). Même si cette dernière valeur doit être considérée avec prudence (6 portées seulement ont été prises en compte), il est logique d'observer un effet sur la prolificité inférieur au taux de gamètes déséquilibrés. Le nombre d'embryons après implantation étant réduit dans les portées issues d'un reproducteur transloqué, la compétition utérine est plus faible, et les porcelets plus vigoureux à la naissance. Les taux de mortalité pendant la gestation et la période périnatale devraient donc être réduits, ce qui pourrait contribuer à atténuer l'effet négatif de l'anomalie chromosomique sur la prolificité. Un résultat inverse est cependant observé pour la translocation 12/14 (effet apparent de l'anomalie supérieur au taux de déséquilibre estimé). Diverses explications peuvent être avancées. La première est le hasard (l'effet de l'anomalie a été estimé dans un échantillon de 57 portées seulement ; d'autres échantillons auraient pu donner des résultats différents). Une éventuelle variation du taux de déséquilibre au cours de la vie de l'animal pourrait également expliquer ce type de résultat. Dans une telle situation en effet, une estimation ponctuelle du taux de gamètes déséquilibrés pourrait ne pas être représentative de l'effet de l'anomalie sur l'ensemble de la carrière du verrat. Enfin, des effets directs des verrats sur la prolificité de leurs conjointes ont été mis en évidence à plusieurs reprises (BEAUVOIS et al., 1997 ; TRIBOUT et al., 2000). L'hypoprolificité de certains verrats à caryotypes normaux est constatée lors de chaque évaluation génétique (TRIBOUT et al., 2000). Dans le cas présent, l'effet de facteurs autres que chromosomiques pourrait être cumulé à la baisse de prolificité liée à la translocation, et par conséquent expliquer un effet réel supérieur à celui prédit par le seul taux de spermatozoïdes déséquilibrés. Ces incertitudes rendent indispensable la réalisation d'expériences complémentaires (analyse d'autres remaniements, estimation des effets réels sur la prolificité à partir d'un nombre plus important de portées, suivi longitudinal des taux de déséquilibres pour quelques reproducteurs porteurs d'anomalies variées ...) dans une perspective de validation de la méthode de « spermFISH » (taux de gamètes déséquilibrés) comme prédicteur de l'effet potentiel d'une anomalie chromosomique.

Les résultats obtenus dans les cas de trisomie en mosaïque (taux de spermatozoïdes disomiques supérieurs chez les animaux porteurs du remaniement) confirment la contamination

de la lignée germinale chez ces animaux. Les très faibles taux de spermatozoïdes déséquilibrés estimés (<2 %) nous conduisent cependant à penser que cette anomalie particulière ne devrait avoir qu'un effet très faible voire nul sur la prolificité d'éventuelles conjointes (aux réserves formulées plus haut près). Les verrats ayant été réformés avant leur mise en service, la validation de cette hypothèse s'est malheureusement avérée impossible.

L'analyse du sperme d'un animal témoin a permis de déterminer les taux normaux d'aneuploïdie (anomalie chromosomique de nombre) pour les chromosomes 3 et 18. Ce type de résultat avait été précédemment obtenu chez le porc pour les chromosomes 1, 10 et X uniquement (RUBES et al., 1999). Les résultats obtenus dans la présente étude (taux de disomie ou de nullisomie compris entre 0,02 et 0,08 %) sont légèrement plus faibles mais du même ordre de grandeur que ceux rapportés par RUBES et al. (1999) pour les autosomes (0,075 % et 0,067 % pour les chromosomes 1 et 10, respectivement). Ces valeurs sont par contre assez nettement inférieures à celles estimées pour les autosomes chez l'homme (taux de disomie identiques pour les différents chromosomes et de l'ordre de 0,24 % - RIVES et al., 1998).

## CONCLUSION

La technique de « spermFISH » présentée dans cet article permet d'estimer le taux de gamètes génétiquement déséquilibrés dans la semence d'un reproducteur porteur d'une anomalie chromosomique. Ce taux permet en théorie de prédire l'effet des anomalies chromosomiques sur la prolificité des conjointes. Les résultats présentés montrent que cette technique est désormais opérationnelle mais que des travaux complémentaires sont nécessaires à sa validation.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier les éleveurs, ainsi que les personnels des groupements et des centres d'insémination pour leur contribution à cette communication. Nous remercions également Claire ROGEL-GAILLARD et François PIUMI pour la mise à disposition des sondes.

Travail réalisé avec le soutien financier du Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales (DPEI)

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEAUVOIS E., LABROUE F., BIDANEL J.P., 1997. Journées Rech. Porcine, 29, 353-360.
- BERGER R., 1998. In « Principes de génétique humaine ». 33-58. Hermann éd., Paris, 586p.
- BLANCO J., EGOZCUE J., CLUSELLAS N., VIDAL F., 1998. Cytogenet. Cell Genet., 83, 275-280.
- CIFUENTES P., NAVARRO J., BLANCO J., VIDAL F., MIGUEZ L., EGOZCUE J., BENET J., 1999. Eur. J. Hum. Genet., 7, 231-238.
- DOWNIE S. E., FLAHERTY S. P., MATTHEWS C. D., 1997. Mol. Hum. Reprod., 3, 585-598.
- DUCOS A., BERLAND H.M., PINTON A., SEQUELA A., DARRE R., 1996. Rev. Méd. Vét., 147(2), 101-108.
- DUCOS A., BERLAND H.M., PINTON A., SEQUELA A., BLANC M.F., SANS P., DARRE R., 1997. Journées Rech. Porcine, 29, 375-382.
- DUCOS A., DUMONT P., SEQUELA A., PINTON A., BERLAND C., BRUN-BARONNAT C., DARRE A., MARQUANT-LE GUIENNE B., HUMBLLOT P., BOICHARD D., DARRE R., 2000. Genet. Sel. Evol., 32, 589-598.
- DUCOS A., PINTON A., BERLAND H.M., SEQUELA A., BRUN-BARONNAT C., BONNET N., DARRE R., 2002a. Journées Rech. Porcine, 34, 269-275.
- DUCOS A., PINTON A., YERLE M., SEQUELA A., BERLAND H.M., BRUN-BARONNAT C., BONNET N., DARRE R., 2002b. Genet. Sel. Evol., 34, 389-406.
- FARAUT T., MERMET M.A., DEMONGEOT J., COHEN O., 2000. Cytogenet. Cell Genet., 88, 15-21.
- GOLDMAN A. S., HULTEN M. A., 1993a. Cytogenet. Cell Genet., 63, 16-23.
- GOLDMAN A. S., HULTEN M. A., 1993b. Chromosoma, 102, 102-111.
- GUTTENBACH M., ENGEL W., SCHMID M., 1997. Hum. Genet., 100, 1-21.
- HASSANANE M., KOVACS A., LAURENT P., LINDBLAD K., GUSTAVSSON I., 1999. Mol. Reprod. Dev., 53, 407-412.
- HONDA H., MIHARU N., SAMURA O., HE H., OHAMA K., 2000. Hum. Genet., 106, 188-193.
- JAAROLA M., MARTIN R. H., ASHLEY T., 1998. Am. J. Hum. Genet., 63, 218-224.
- OLIVER-BONNET M., NAVARRO J., CODINA-PASCUAL M., CARRERA M., EGOZCUE J., BENET J., 2001. Eur. J. Hum. Genet., 9, 395-403.
- PELLESTOR F., GIRARDET A., COIGNET L., ANDREO B., LEFORT G., CHARLIEU J.P., 1997. Cytogenet. Cell Genet., 78, 202-208.
- PINTON A., DUCOS A., SEQUELA A., BERLAND H.M., DARRE R., DARRE A., PINTON P., SCHMITZ A., CRIBIU E., YERLE M., 1998. Chromosome Research, 6, 361-366.
- PINTON A., DUCOS A., BERLAND H.M., SEQUELA A., BRUN-BARONNAT C., DARRE A., DARRE R., SCHMITZ A., YERLE M., 2000. Hereditas, 132, 55-62.
- POPESCU C.P., 1989. In « Cytogénétique des mammifères d'élevage ». 73-89. INRA éd., Paris, 114 p.
- POPESCU C. P., BONNEAU M., TIXIER M., BAHRI I., BOSCHER J., 1984. J. Hered., 75, 448-452.
- RIVES N., MAZURIER S., BELLET D., JOLY G., MACE B., 1998. Hum. Genet., 102, 616-623.
- RUBES J., VOZDOVA M., KUBICKOVA S., 1999. Cytogenet. Cell Genet., 85, 200-204.
- RUDAK E., JACOBS P. A., YANAGIMACHI R., 1978. Nature, 274, 911-913.
- TEASE C., 1996. Chromosome Res., 4, 61-68.
- TEASE C., 1998. Chromosoma, 107, 549-558.
- TRIBOUT T., DUCOS A., MAIGNEL F., BIDANEL J.P., 2000. Techniporc, 23(2), 19-24.
- VAN HUMMELEN P., MANCHESTER D., LOWE X., WYROBEK A.J., 1997. Am. J. Hum. Genet., 61, 651-659.
- YERLE M., GOUREAU A., GELLIN J., LE TISSIER P., MORAN C., 1994. Mamm. Genome, 5, 34-37.