

Détection et détermination des proportions de spermatozoïdes bovins porteurs des chromosomes X et Y par hybridation *in situ* fluorescente (FISH)

Detection and determination of chromosomes X- and Y-bearing bovine spermatozoa ratios using fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

F. PIUMI (1), D. VAIMAN (2), E.P. CRIBIU (2), B. GUERIN (1), P. HUMBLLOT (1).

(1) UNCEIA, Services Techniques, Maisons-Alfort

(2) INRA, Groupe Petits Ruminants, Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, Jouy-en-Josas

INTRODUCTION

Le tri des spermatozoïdes bovins permettant potentiellement la naissance de veaux de sexe mâle ou femelle est d'une grande importance économique en élevage laitier et allaitant. Quelque soit la technique de tri utilisée, il importe de vérifier l'efficacité du procédé tant pour sa mise au point que pour son utilisation ultérieure en routine. L'objectif de ce travail était de déterminer les proportions de spermatozoïdes bovins porteurs des chromosomes X et Y présents dans le sperme en détectant ces chromosomes par la technique d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. SONDES SPÉCIFIQUES DES CHROMOSOMES X ET Y

1.1.1 Chromosome Y

BRY4a est une séquence de 470 paires de bases répétée sur les 3/4 du chromosome Y bovin. Ce fragment a été obtenu par PCR puis cloné. Le marquage a été effectué par PCR par incorporation de nucléotides biotinylés.

1.1.2. Chromosome X

Une série de clones de 250 kilobases ont été isolés par criblage d'une banque de fragments d'ADN caprin clonés dans des chromosomes artificiels de bactéries (BACs) à l'aide de microsatellites bovins spécifiques du chromosome X. Le clone contenant le microsatellite DVEPC76 a été sélectionné car il donnait les signaux les plus forts après hybridation sur métaphase.

Le marquage a été effectué par Nick Translation avec incorporation de nucléotides biotinylés.

1.2. DÉCONDENSATION DU NOYAU DU SPERMATOZOÏDE BOVIN

Après lavage dans une solution de détergent (CHAPS 4mM), les spermatozoïdes provenant d'un éjaculat ont été décondensés dans 40µl de PBS contenant 1 mg/ml d'héparine et 10 mm ou 50 mm de DTT (dithiothréitol) (1). L'incubation a duré 30 minutes puis les spermatozoïdes ont été déposés sur lame.

1.3. HYBRIDATION ET DÉTECTION DU SIGNAL

Le protocole utilisé a été décrit par Bahri-Darwish et al. (2). Aucune étape ne s'éloigne d'un protocole de FISH ordinaire utilisé par de nombreux laboratoires.

2. RÉSULTATS

Deux manipulations ont été réalisées avec la sonde BRY4a et 5 avec DVEPC76. Pour chaque sonde, près de 45 % de spermatozoïdes ont été marqués (Tableau 1) et la répétabilité des résultats a été satisfaisante. Cependant, les résultats d'hybridation sont inférieurs aux sex-ratio attendu (50/50)

3. DISCUSSION

En moyenne, 5 % des spermatozoïdes ne montrent pas de signal alors qu'ils portent en théorie le chromosome cible. Cette absence de signal peut signifier effectivement une absence de chromosome cible ou résulter d'un échec de l'hybridation de la sonde. L'utilisation simultanée des deux sondes sur la même lame devrait permettre de répondre à cette question.

4. CONCLUSION

Cette méthode peut être utilisée pour vérifier de façon fiable et répétable les proportions de spermatozoïdes porteurs du chromosome X ou Y dans une population donnée. Dans le cas du sexage des spermatozoïdes, la pureté du tri peut donc être évaluée dans des aliquots de fractions initialement triées par cytométrie en flux (ou tout autre technique).

REMERCIEMENTS

À Monsieur Faillenot, Directeur du CIA de Pierry (Marne), et à Monsieur Camus, responsable de la production du centre, pour avoir fourni la semence nécessaire à cette étude.

(1) Zalensky A.O., Tomilin N.V., Zalenskaya I.A., Teplitz R.L., Bradbury E.M., 1997. Exp. Cell. Res., 10 : 232 (1) : 29-41.

(2) Bahri-Darwish I., Vaiman D., Olsaker I., Oustry A., Cribiu EP., 1994. Hereditas 120 : 261-265.

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats obtenus

Sonde	Chromosome cible	Nombre de manipulations effectuées	Spermatozoïdes marqués (%)	Nombre de spermatozoïdes comptés
BRY4a	Y	2	46	103
			43	150
DVEPC76	X	5	41	123
			45	99
			49	108
			42	115
			45	110