

ETUDE CYTOGENETIQUE ET MOLECULAIRE D'UN CAS D'INTERSEXUALITE CHEZ LE CHIEN ET LE CHEVAL

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Sandrine, Christine, Renée PAGET
Née, le 26 mars 1976 à LAVELANET (Ariège)

Directeur de thèse : **M. le Docteur Alain DUCOS**

JURY

PRESIDENT :
M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Alain DUCOS
M. Xavier BERTHELOT

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ETUDE CYTOGENETIQUE ET MOLECULAIRE
D'UN CAS D'INTERSEXUALITE CHEZ LE CHIEN
ET LE CHEVAL. 1
6608-2001



Partie 2/2

PARTIE EXPERIMENTALE

I. INTRODUCTION

Des cas d'intersexualité dans les espèces canine et équine sont régulièrement référés à l'UMR INRA-ENVT de cytogénétique des populations animales pour la réalisation d'analyses chromosomiques. Une partie de ces cas ont été étudiés par mes soins au cours de ces deux dernières années. Deux sont présentés de façon détaillée dans la suite de ce chapitre.

La structure retenue pour la présentation de chaque cas est celle d'un article scientifique. Le second correspondant à l'espèce équine a été accepté pour publication, dans sa version anglaise, dans la revue « *The Veterinary Record* ».

II. ETUDE D'UN CAS D'ANIMAL INTERSEXUE DANS L'ESPECE CANINE

II.1. Introduction

Dans l'espèce canine, bien que l'intersexualité soit parfois impliquée dans des troubles de la reproduction, elle n'est que rarement recherchée et le recours au diagnostic caryotypique est relativement peu utilisé. De plus, les propriétaires de chiens ne consultent qu'exceptionnellement leur vétérinaire pour des anomalies phénotypiques ou des troubles de la fertilité. Ainsi, la plupart des cas d'intersexualité diagnostiqués sont des découvertes lors de castrations de convenance, ou au cours de consultations pour des pathologies plus ou moins associées à ces anomalies du développement sexuel. On constate que l'intersexualité a des

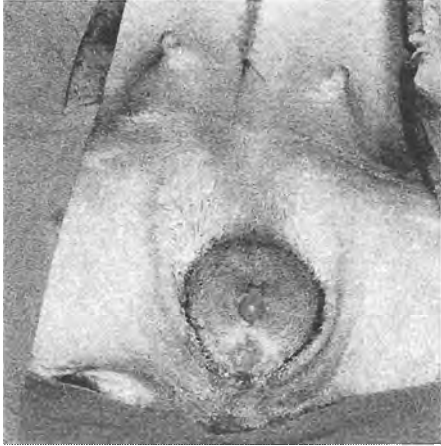


Figure 46: *Appareil génital externe*

La vulve est oedémaciée ;
Un clitoris péniforme enflammé fait saillie.



Figure 47: *Clitoris péniforme extériorisé.*

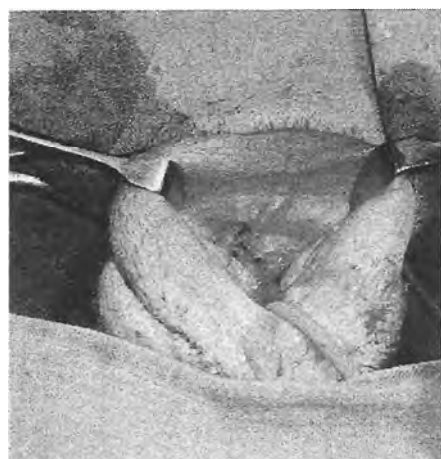


Figure 48: *Vulve après exérèse du clitoris.*

répercussions variées sur les animaux, allant de la simple altération du phénotype à des pathologies létales en l'absence de traitement (Howard, (118)).

Les anomalies du développement sexuel peuvent se manifester très précocement dans la vie de l'animal : il s'agit souvent de troubles du comportement, de cryptorchidie, d'anoestrus persistant ou de problèmes d'incontinence urinaire. En revanche, d'autres formes d'intersexualité passent inaperçues pendant plusieurs années et sont révélées lors du traitement d'un Sertolinome ou encore de troubles dermatologiques ou de pyomètres (voir la partie bibliographique et Howard, (118)).

Cette étude clinique présente le cas d'un hermaphrodite bilatéral de caryotype XY, Sry positif.

II.2. Matériel et méthodes

Un Epagneul Breton de 7 ans, de phénotype femelle, a été présenté aux consultations de Pathologie de la Reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse au printemps 2000. Le motif principal de la consultation était la présence d'écoulements purulents au niveau de la vulve, constatés depuis le début des chaleurs, un mois et demi auparavant.

D'après le propriétaire, la chienne avait eu ses premières chaleurs à l'âge de 3 ans. Elle avait depuis toujours eu des cycles réguliers, caractérisés par un inter-oestrus de 6 mois et des écoulements sanguins pendant une période d'un mois. La chienne avait toujours refusé les saillies, sauf lors des dernières chaleurs, probablement à cause de son clitoris hypertrophié. Aucune anomalie de comportement n'a été décrite dans le cas de cet animal.

Lors de l'examen clinique, la chienne présentait un bon état général, malgré une légère congestion des muqueuses et une hyperthermie. Le comportement dyspique était a priori normal.

L'examen de l'appareil génital externe révélait une congestion très marquée du clitoris. Ce dernier avait un aspect péniforme ; facilement extériorisable, il mesurait environ 3 cm de long sur 0.8 cm de large. D'autre part, la vulve était oedémateuse. Le vestibule vaginal, quant à lui, était normal (figures 46, 47).

Le frottis vaginal était compatible avec celui d'une chienne en dioestrus.

Lors de la palpation trans-abdominale, l'utérus paraissait de consistance hétérogène; l'échographie abdominale montrait une petite image liquidienne en avant du col de la vessie.

Le diagnostic de pyomètre a été établi et une ovario-hystérectomie a été réalisée le lendemain de la consultation. Lors de la chirurgie, l'exérèse du clitoris péniforme a également été pratiquée (figure 48).

L'hémogramme effectué lors du bilan pré-opératoire confirmait un processus infectieux : la chienne avait une neutrophilie importante.

Compte tenu de la présence du clitoris péniforme et des chaleurs un peu longues, un caryotype a également été demandé, afin de vérifier la possibilité d'un état intersexué.

Un échantillon de sang veineux a donc été prélevé sur Héparinate de Lithium et une culture cellulaire a été réalisée. Elle a été suivie d'une préparation chromosomique et de colorations conventionnelle et en bandes GTG selon les modalités décrites en annexe 9.

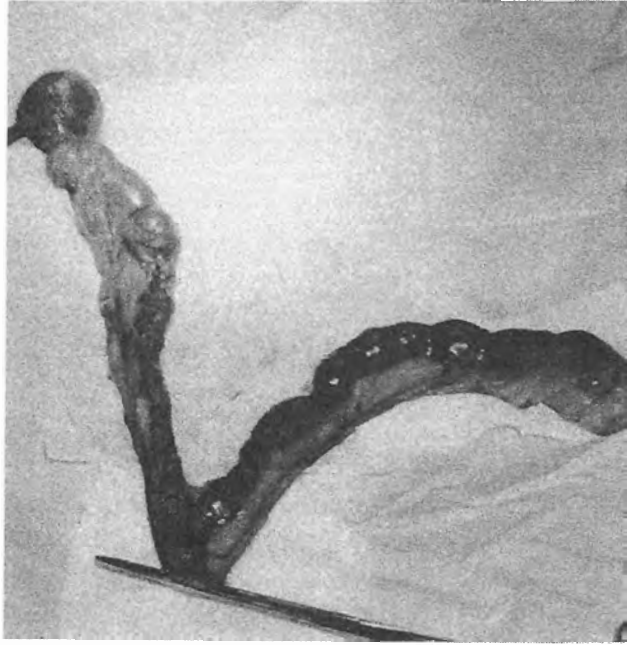


Figure 49: *Appareil génital interne.*

La gonade droite fait 4 cm de diamètre.
La corne droite est distendue par du pus.

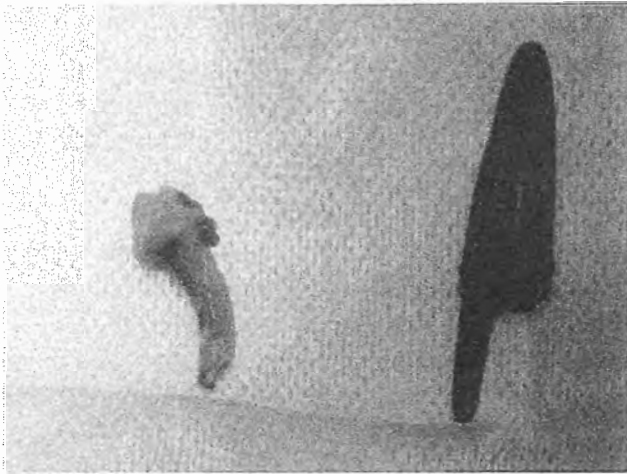


Figure 50 : *Os pénien extrait du clitoris*

D'autre part, une étude moléculaire a été entreprise afin de rechercher la présence du gène Sry. Les réactions de PCR ont été réalisées pour un chien témoin femelle normal, un mâle normal et l'Épagneul Breton.

L'ADN a été extrait à partir de 200µl de sang total frais, prélevé sur Héparinate de Lithium. L'extraction a été faite au moyen du kit Quiagen. L'ADN ainsi obtenu a été congelé (-20°C).

Une PCR de contrôle a été réalisée, avec 10µl d'ADN (pour un volume final de 100µl), 1mM de dNTP, 2mM de MgCl₂ Eurobio2, 10µl de tampon 10X Eurobio2, 1µM de chaque amorce spécifique de l'hypoxanthine phosphoribosyl transférase du chien (HPRT) décrite par Meyers-Wallen en 1995 (181), 0,5 UI (pour un volume final de 100µl) de Taq Polymérase Eurobio2.

Après une dénaturation de 5 minutes à 94°C, 30 cycles (comportant une phase de dénaturation à 94°C, 1 min., puis une phase d'hybridation à 60°C, 2 min., et une phase d'extension à 72°C, 2 min.) ont été effectués. L'extension finale s'est faite à 72°C, 8 min.

A la suite de la PCR de contrôle, une PCR spécifique de la « boîte HMG » du gène Sry canin a été mise en œuvre, utilisant 10µl d'ADN (pour un volume final de 100µl), 1mM de dNTP, 2,5mM de MgCl₂ Eurobio2, 10µl de tampon 10X Eurobio2, 0,5µM de chaque amorce spécifique du Sry du chien présentée en 1995 par Meyers-Wallen (181).

Après une dénaturation de 5 minutes à 95°C, 0,2 UI (pour un volume final de 100µl) de Taq Polymérase Eurobio2 ont été ajoutés dans chaque tube PCR. 35 cycles (comportant une phase de dénaturation à 94°C, 1 min., puis une phase d'hybridation à 62°C, 2 min., et une phase d'extension à 72°C, 2 min.) ont été effectués. L'extension finale s'est faite à 72°C, 8 min.

Pour chaque réaction PCR, un « blanc » a été prévu.

Une électrophorèse a été réalisée pour les produits des amplifications d'ADN obtenus (gel d'agarose à 2%).

Enfin, une analyse histologique a été effectuée pour les différents organes prélevés lors de la chirurgie.

II.3. Résultats

II.3.1. Organes mis en évidence lors de la chirurgie :

L'ovario-hystérectomie a permis l'exérèse d'un utérus modifié : la corne droite de 25 cm de long sur 2,5 cm de large était remplie de pus ; la corne gauche semblait normale.

Le col de l'utérus avait une morphologie normale.

Les deux gonades étaient situées dans l'abdomen à l'emplacement normalement occupé par les ovaires (figure 49).

L'exérèse du clitoris péniforme a été effectuée. Après dissection de l'organe, on a pu mettre en évidence une structure dure semblable à un os pénien de 3 cm de long sur 0,4 cm de large (figure 50).

II.3.2. Résultat de l'analyse histologique :

L'analyse histologique a révélé un utérus de structure normale, indépendamment des modifications liées au pyomètre.

Les gonades étaient des ovotestis. Bien que de morphologie différente (à gauche, la gonade ressemblait à un ovaire lisse, un peu atrophié ; la gonade droite, en revanche était sphérique, de 4 cm de diamètre, et d'aspect kystique), les deux organes avaient les mêmes structures histologiques. En périphérie, on pouvait observer l'équivalent d'un cortex ovarien, avec des follicules primaires, des follicules secondaires, tous dépourvus d'ovocytes. Au centre des gonades se trouvait un tissu testiculaire, formé de tubes séminifères vides, et d'un tissu de soutien abondant.

II.3.3. Etude cytogénétique :

L'étude cytogénétique de 205 métaphases en coloration conventionnelle a révélé un caryotype XY. Aucune mosaïque n'a pu être mise en évidence (figure 51).

Les caryotypes en bandes G obtenus n'ont montré aucune anomalie visible (figure 52).

II.3.4. Résultats de la PCR :

L'absence de produit d'amplification pour les « blancs » permet d'interpréter les résultats obtenus.

La PCR effectuée pour HPRT a permis de mettre en évidence un fragment d'environ 177 pb, conformément au résultat attendu (Meyers-Wallen, (181)) pour les différents échantillons utilisés (figure 53 a)

La PCR pour le gène Sry du chien a permis l'amplification d'un fragment d'environ 104 pb, comme ceci a été décrit par Meyers-Wallen (Meyers-Wallen, (181)), pour l'Épagneul Breton et le témoin mâle (figure 53 b).

II.4. Discussion

Comme ceci a été évoqué dans le chapitre bibliographique, l'hermaphroditisme vrai n'est pas la forme d'intersexualité la plus rencontrée chez le chien (34% des cas recensés dans la littérature). Cette anomalie du développement sexuel est le plus souvent associée à un caryotype XX. Le caryotype XY n'est que très rarement associé à l'hermaphroditisme vrai. Ce fait est nettement établi dans l'espèce humaine (moins de 10% des patients (Thompson, (270)) présentant cet état intersexué sont XY) et semble confirmé par les études réalisées dans différentes espèces animales. Un seul cas a fait l'objet d'une publication chez le chien (Chaffaux, (49)). L'animal, croisé Fox terrier, de phénotype femelle présentait des points communs avec le cas présenté dans cette étude. Il avait un clitoris péniforme, contenant un os pénien, une vulve normale, quoiqu'un peu petite ; la vagin était normal. Par contre, le motif de la consultation et l'anamnèse étaient très différents : la « chienne » qui n'avait jamais eu de chaleurs, présentait depuis trois mois des dépilations diffuses, une odeur nauséabonde et

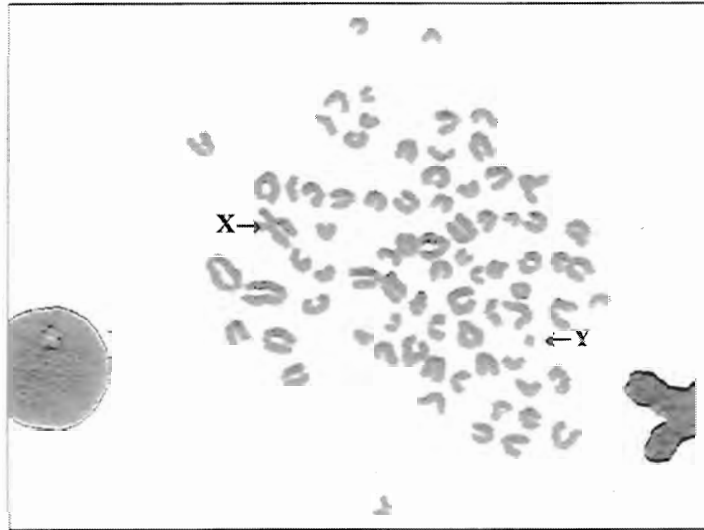


Figure 51 : *Métaphase en coloration conventionnelle (2n=78, XY).*

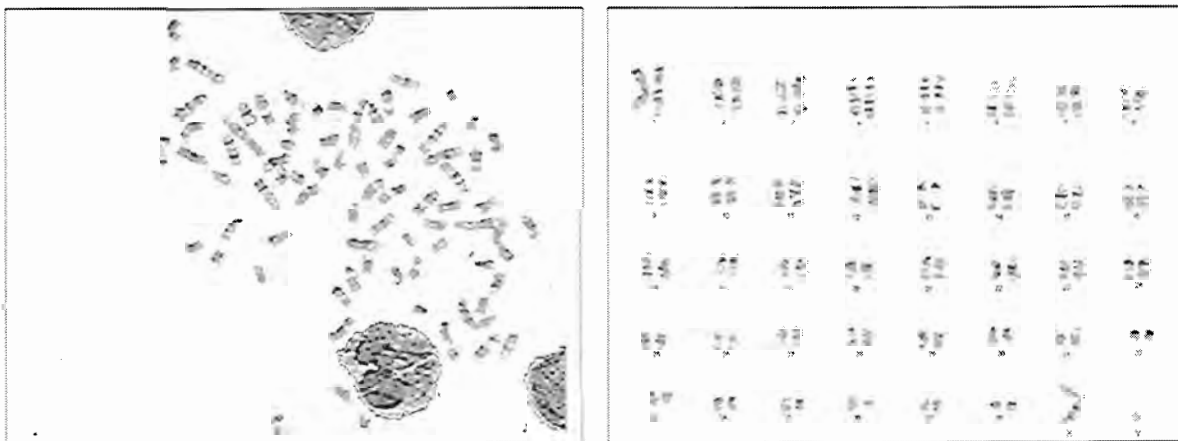


Figure 52 : *Métaphase et caryotype en bandes G (2n=78, XY).*

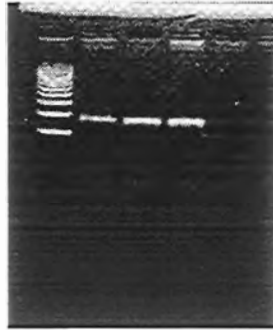


Figure 53 a



Figure 53 b

Figure 53 : *Gels d'électrophorèse des PCR réalisées.*

a : Réaction de contrôle permettant d'amplifier HPRT :

- 1 : échelle (100 paires de bases)
- 2 : témoin femelle
- 3 et 4 : chien hermaphrodite
- 5 et 6 : « blanc »

b : Réaction permettant d'amplifier la boîte HMG du Sry canin

- 1 : échelle (100 paires de bases)
- 2 et 3 : chien hermaphrodite
- 4 : témoin femelle
- 5 : « blanc »

attirait les mâles. Elle était de plus incontinent. Comme dans le cas présent, une laparotomie avait été réalisée, permettant de mettre en évidence un utérus d'apparence normale, ainsi que des oviductes. La gonade de gauche était un ovaire contenant des follicules atrétiques, mais pas d'ovocyte. A droite, se trouvait un testicule dépourvu de cellules germinales ; l'animal avait un Sertolinome (les troubles dermatologiques étaient secondaires aux sécrétions hormonales produites par le testicule tumoral ; ils régressèrent après la castration). Le testicule était surmonté d'un épидidyme.

Comme dans le cas rapporté par Chaffaux, on constate, chez l'Épagneul Breton faisant l'objet de cette étude, la présence d'un os pénien. Un tel organe semble fréquemment développé lors des cas d'hermaphrodisme vrai (36 cas sur les 48 recensés). Ceci suppose une production de testostérone. En effet, la formation de l'os pénien chez le chien se fait entre la 5^{ème} et la 10^{ème} semaine après la naissance sous l'influence de la testostérone et de l'hormone de croissance (Chaffaux, (49)). Ceci laisse penser que l'Épagneul Breton a produit de la testostérone en quantité importante après sa naissance. Malheureusement, aucun dosage n'a été réalisé sur cet animal pour vérifier son statut hormonal avant la castration.

Le phénotype de l'animal étudié correspond à celui que l'on rencontre dans la majorité des cas d'hermaphrodisme vrai chez le chien (39 cas sur les 48 analysés dans la bibliographie avaient une apparence de femelle avec un clitoris péniforme). En revanche, à notre connaissance, aucun chien hermaphrodite vrai ayant un pyomètre n'a été rapporté dans la littérature. De même, la présence de deux ovotestis associée à un caryotype XY n'a jamais été décrite (il faut cependant souligner que sur l'ensemble des 25 cas ayant 2 ovotestis, le caryotype n'a été déterminé que pour 14 chiens).

La présence du gène Sry, attestée par les résultats de la PCR, associée au caryotype XY, montre que cet Épagneul Breton était génétiquement mâle. Un résultat similaire n'a été obtenu qu'une seule fois pour un chien intersexué. Il s'agissait d'un caniche pseudo-hermaphrodite mâle, de phénotype femelle, avec une hypertrophie du clitoris (Meyers-Wallen, (183)). A l'époque, aucune analyse moléculaire n'avait été réalisée sur le chien présenté par Chaffaux (49).

Différents mécanismes permettant d'expliquer les cas d'hermaphrodisme XY, SRY positif chez l'homme ont été proposés. Il s'agirait d'anomalies des gènes du déterminisme du sexe intervenant avec le SRY. En 1996, Cameron a décrit le cas d'une patiente hermaphrodite XY et SRY positif pour laquelle le gène SOX 9 était muté (Cameron, (44)).

Des cas de réversion du sexe sont également décrits chez des sujets XY, SRY positifs ; ils sont liés soit à des délétions sur les autosomes (Chromosomes 9 et 10 humains) (Bennet, 1993 et Wilkies, 1993, cités par Barboux, (11)). D'autres cas font référence à une mutation du gène codant pour la protéine Z (McElreavey, (162)). Enfin, des cas de réversion du sexe d'individus XY sry positifs concernent des patients dont le gène DAX 1 est en quantité excessive (Bardoni, 1994, cité par Barboux, (11)). Ces anomalies pourraient aussi être liées à une intersexualité gonadique.

On peut supposer que dans l'espèce canine, cette forme d'intersexualité possède des étiologies identiques. Cependant, les techniques actuelles ne permettent pas d'explorer les anomalies affectant les gènes du déterminisme du sexe portés par les autosomes.

Trois semaines après le traitement chirurgical, la « chienne » présentait encore une vulve œdémateuse.

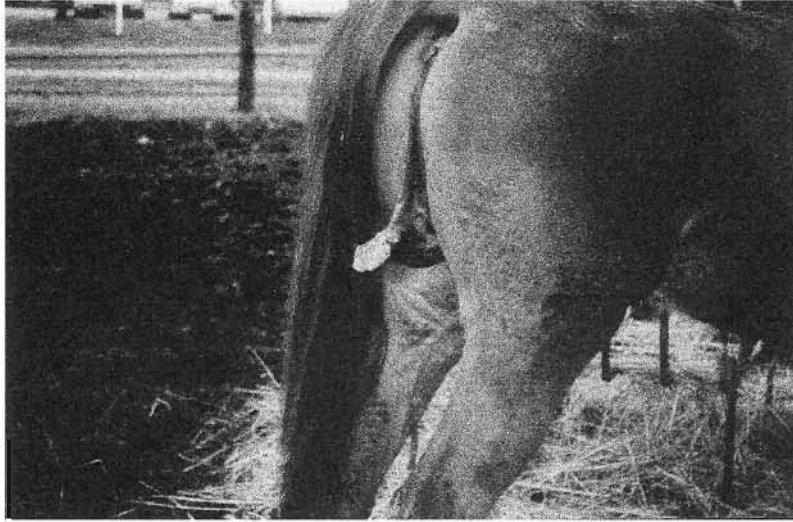


Figure 54 a

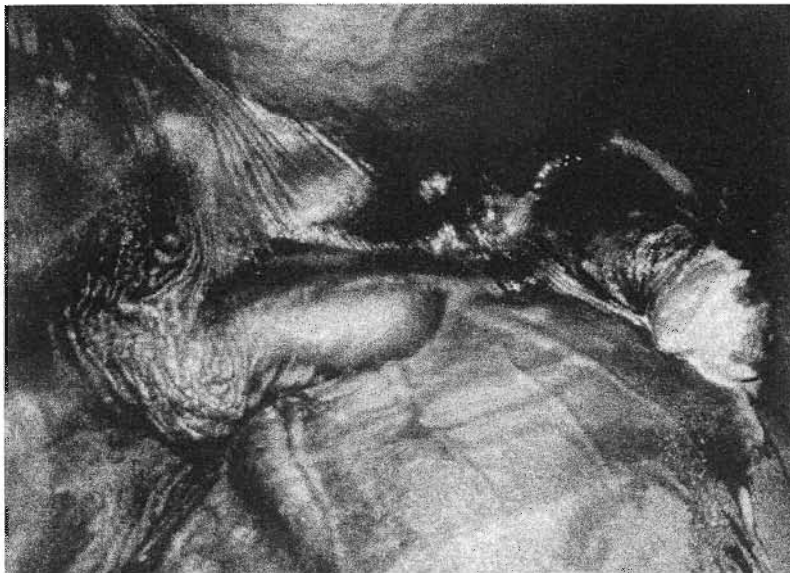


Figure 54 b

Figure 54 : *Appareil génital externe.*

a : attitude d'étalon du cheval étudié.

b : vue ventrale des organes génitaux externes du cheval, âgé de 20 mois.

III. ETUDE D'UN ETAT INTERSEXUE DANS L'ESPECE EQUINE

Communication courte. « The Veterinary Record », soumis le 14 février 2000 et publié le 6 janvier 2001.

Mosaïcisme 63 X0/65 XYY dans un cas de pseudo-hermaphrodisme mâle chez un cheval.

S. Paget⁽¹⁾, A. Ducos⁽¹⁾, F. Mignotte⁽¹⁾, A. Pinton⁽¹⁾, A. Séguéla⁽¹⁾, H.M. Berland⁽¹⁾, C. Brun-Baronnat⁽¹⁾, A. Darré⁽²⁾, R. Darré⁽¹⁾, Y. Tamzali⁽³⁾, D. Bergonier⁽⁴⁾ et X. Berthelot⁽¹⁾.

⁽¹⁾ENVT, UMR Cytogénétique, F31076 Toulouse

⁽²⁾ENFA, Service de Zootechnie, F31326 Castanet-Tolosan

⁽³⁾ENVT, Clinique Equine, F31076 Toulouse

⁽⁴⁾ENVT, Service de Pathologie de la Reproduction, F31076 Toulouse

III.1. Introduction

Les troubles de la reproduction et les ambiguïtés sexuelles sont les principaux motifs de demande d'analyse chromosomique chez le cheval. Les précédentes études réalisées dans cette espèce ont permis de mettre en évidence de nombreuses anomalies chromosomiques, la plupart d'entre elles impliquant les chromosomes sexuels (voir par exemple les revues de Long, 1988, Power, 1990, Cribru, 1992, Bowling, 1996). Les caryotypes observés dans les cas d'intersexualité gonadique sont généralement équilibrés (pseudo-hermaphrodite femelle XY, pseudo-hermaphrodite mâle XX et freemartins XX/XY). Quelques cas de caryotypes non équilibrés ont également été rapportés : par exemple, 65 XXX (Moreno-Millan, 1989), 65 XXY (Kubien, 1993), un chimérisme diploïde-triploïde 64 XX/96 XXY (Power, 1990), et un mosaïcisme 63 X0/ 65XYY (Höhn, 1980).

Cet article présente un nouveau cas de mosaïcisme 63 X0/65 XYY chez un cheval intersexué.

III.2. Matériel et méthodes

L'animal, de race Arabe, était déclaré femelle à sa naissance, et présentait un développement normal jusqu'à l'âge de un an. Un comportement sexuel d'étalon a été observé par le propriétaire et a motivé la demande d'un examen clinique qui a révélé des anomalies de conformation de l'appareil génital externe, notamment la présence d'un clitoris hypertrophié et érectile en présence d'une jument. L'animal a été référé à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse où d'autres examens ont révélé la présence, en position ventrale, d'un prépuce incomplètement développé, et, en position périnéale, d'une vulve allongée et borgne contenant un petit pénis dans sa partie inférieure (figure 54 a). A ce moment, la palpation de l'anneau inguinal n'a pas permis la mise en évidence des gonades.

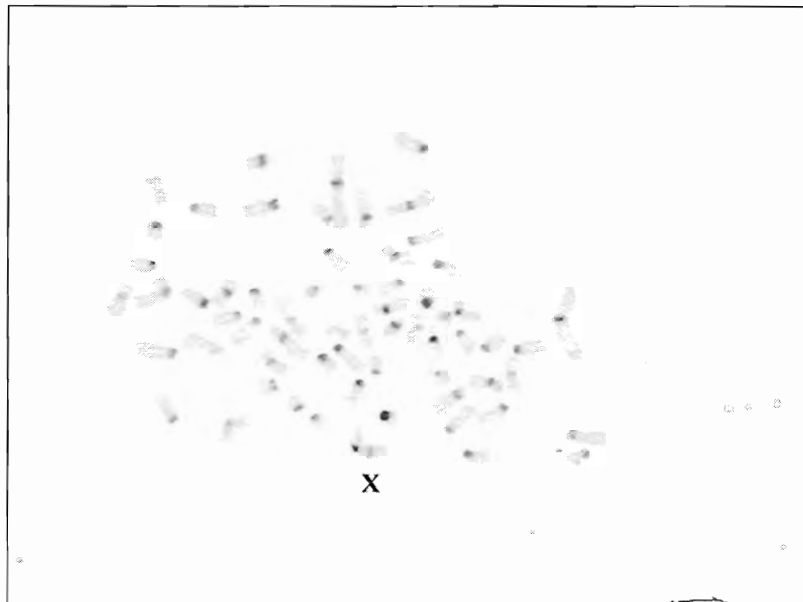


Figure 55 a

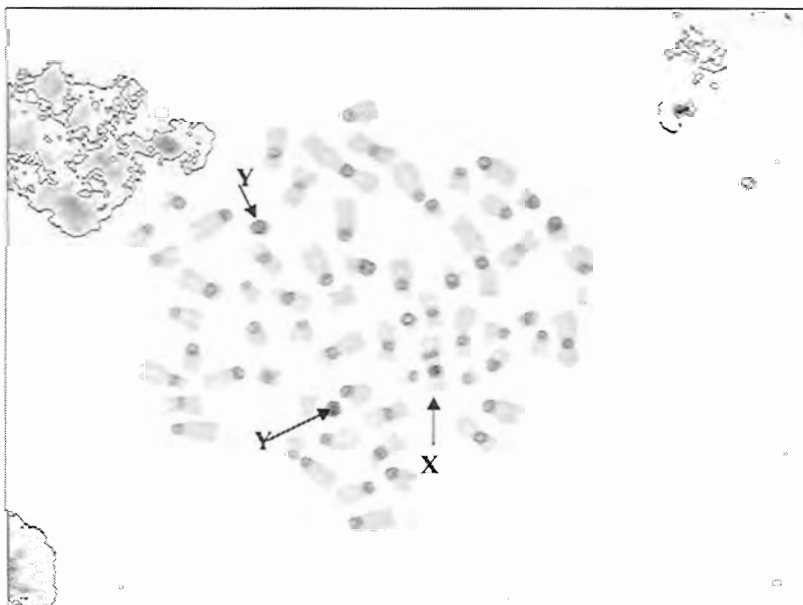


Figure 55 b

Figure 55 : *Métaphases en coloration en bandes C.*

Les chromosomes sexuels sont indiqués par X et Y.

a : cellule à $2n=63 X0$ chromosomes

b : cellule à $2n=65 XY$ chromosomes

Un échantillon de sang et une biopsie de peau ont été prélevés en vue d'une analyse cytogénétique. Des cultures cellulaires ont été réalisées à partir des deux types de tissus. Des techniques de laboratoires habituelles ont été utilisées pour la préparation et pour la coloration en bandes de des chromosomes (voir par exemple Ducos, 1998). 500 et 1200 métaphases ont été observées, respectivement, pour les cultures de lymphocytes et de fibroblastes.

Huit mois plus tard, l'animal a été anesthésié. Les gonades ont été palpées en position inguinale (figure 54 b) et enlevées. Des analyses histologiques des gonades ont été effectuées.

III.3. Résultats

Deux types de cellules (X0 et XYY) ont été observées dans chaque type de culture. L'animal avait donc un caryotype 63 X0/65 XYY. Dans les deux cas, les cellules X0 étaient largement majoritaires : 82,1% dans la culture de lymphocytes (540 cellules analysées) et 98,7% dans la culture (seules 16 cellules XYY ont été identifiées sur les 1200 cellules analysées) - figure 55 a et 55 b.

Les deux gonades, présentant les caractères macroscopiques de testicules et situées en position inguinale et sous-cutanée, ont été enlevées chirurgicalement. Elles mesuraient approximativement 8 cm de long sur 5 cm de large. La nature testiculaire des tissus analysés a été confirmée par l'étude histologique. Une hypoplasie séminale et une hypertrophie des cellules de Leydig ont été observées. Aucune cellule au stade terminal de la spermatogenèse n'a été identifiée dans les tubes séminifères (figures 56 a et 56 b). Ainsi, l'individu étudié a pu être considéré comme un pseudo-hermaphrodite mâle.

III.4. Discussion

Le pseudo-hermaphrodisme mâle est connu depuis longtemps (Amdor, 1965), mais n'a été que rarement rapporté dans l'espèce équine. Les quelques cas étudiés peuvent, d'un point de vue cytogénétique, être regroupés en deux catégories : ceux qui présentent une seule population cellulaire XX, encore appelé XX sex reversal syndrome, condition très documentée et étudiée chez l'homme et le chien (Meyers-Wallen, 1999), mais peu chez le cheval (Milliken, 1995), et ceux qui présentent plusieurs populations de cellules, généralement des mosaïques (deux lignées cellulaires ou plus issues d'un même zygote). Les caryotypes concernant cette catégorie et rapportés dans la littérature sont relativement hétérogènes (voir par exemple la revue de Höhn, 1980). L'anomalie présentée ici n'a été décrite qu'une fois auparavant. Elle avait été identifiée chez un poulain de pure race d'un an, né en 1977 et présentant des caractéristiques phénotypiques comparables à celles décrites ici, mais une proportion de cellules XYY bien plus importante (44% et 14%, respectivement pour les cultures de lymphocytes et les cultures de muscle- Höhn, 1980). Un cas relativement similaire (mosaïque X0/XYY associée à une fusion centrique des chromosomes Y) a été décrit chez un poulain de 7 mois pseudo-hermaphrodite mâle (Herzog, 1989).

Le caryotype 63 X0/65 XYY a été identifié à deux reprises chez le cheval ; il est également rare chez l'homme, espèce pour laquelle le nombre d'analyses chromosomiques est bien plus important. Jusqu'à présent, moins de 20 cas ont été rapportés dans la littérature

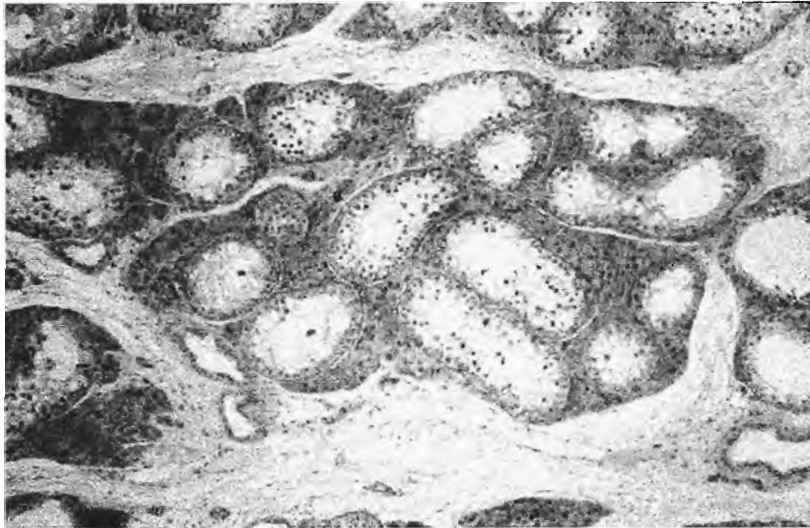


Figure 56 a

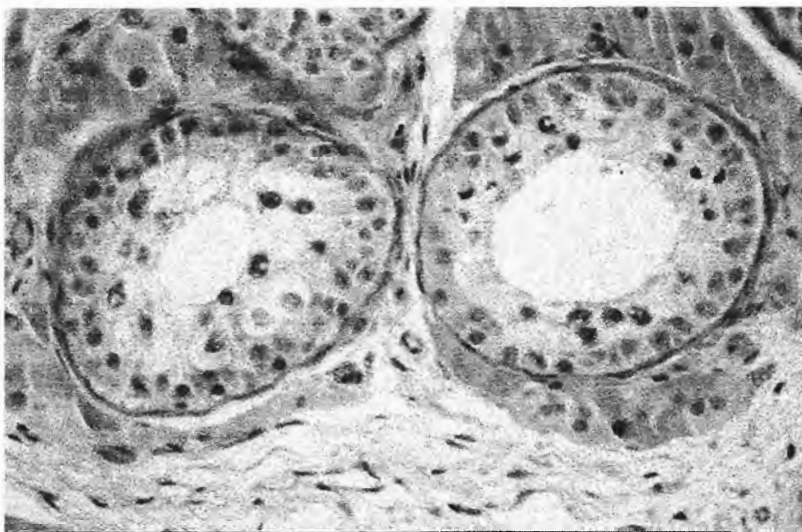


Figure 56 b

Figure 56 : Coupe histologique des testicules hypoplasiques.

a : (Coloration hémalum-éosine, X 100) tous les tubules sont hypoplasiques. Ils sont de petit diamètre, bordés par un épithélium séminifère fin et leur lumière est dépourvue de spermatozoïdes. On peut noter l'abondance des cellules interstitielles de Leydig qui entourent les tubules, et la fibrose interstitielle interlobulaire modérée.

b : (Coloration hémalum-éosine, X 400) le plus fort grossissement montre l'atrophie de l'épithélium germinal. Les tubes séminifères sont bordés par des cellules de Sertoli et peut-être par une couche basale de cellules bordantes ou spermatogonies. La dégénérescence consécutive des cellules résulte de l'évidente vacuolisation de l'épithélium germinal.

(Imai, 1997). L'origine de cette constitution chromosomique est généralement expliquée par deux phénomènes : premièrement, la non-disjonction du chromosome Y lors de la première division d'un zygote XY, probablement suivie d'une sélection préférentielle de la lignée cellulaire X0 (ce qui peut expliquer la relative pauvreté en cellules XYY) ; deuxièmement, la non-disjonction du chromosome Y à une étape ultérieure du développement d'un zygote XY (deuxième division cellulaire et suivantes). Dans cette deuxième situation, trois populations cellulaires, X0, XYY et XY, devraient être décelées chez l'individu. Dans le cas présent, seules 4 cellules XY ont été observées (uniquement dans la culture de lymphocytes), parmi les 1740 cellules analysées. Un nombre si faible laisse supposer que ces cellules XY étaient des cellules XYY incomplètes (suite à la perte d'un des chromosomes Y lors de l'étalement sur lame). L'hypothèse que nous envisageons est, par conséquent, en faveur d'une non-disjonction lors de la première division cellulaire. Le développement mâle incomplet de l'animal étudié résulte probablement de la faible proportion de cellules possédant un chromosome Y (dosage insuffisant de gène nécessaire au développement mâle normal).

III.5. Références

AMDOR J.. A case report. Equine pseudohermaphroditism. *Iowa State University Vet.* 1965 ; **27** : 120-121.

BOUTERS R., PLASSCHE M. VAN DE, MOOR A. de.. An intersex (male pseudohermaphrodite) horse with 64XX/65XXY mosaicism. *Equine Veterinary Journal.* 1972 ; **4** : 150-153.

BOUTERS R., PLASSCHE M. VAN DE, MOOR A. de.. An intersex (male pseudohermaphrodite) horse with 64XX/65XXY mosaicism. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1975 ; **23** : 375-376.

BOWLING A.T.. The horse karyotype and chromosomal abnormalities. IN *Horse Genetics.* Oxford : CAB International, 1996, 115-122.

CRIBIU E.P.. Cytogénétique et pathologie équine. *Recueil de Médecine Vétérinaire.* 1992; **168** : 1005-1010.

DUCOS A., BERLAND H.M., PINTON A., GUILLEMOT E., SEGUELA A., DARRE A., DARRE R.. Nine new cases of reciprocal translocation in the domestic pig. *Journal of Heredity.* 1998 ; **89** :136-142.

HERZOG A., HOHN H., KLUG E., HECHT W.. A sex chromosome mosaic in a male pseudohermaphroditism in a horse. *Tierärztliche Praxis.* 1989 ; **17** : 171-175.

HOHN H., KLUG E., RIECK G.W.. A 63, XO/65, XYY mosaic in a case of questionable equine male pseudohermaphroditism. *4 th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals.* 1980, 82-92.

IMAI A., HORIBE S., FUSEYA T., TAKAGI H., TAKAGI A., TAMAYA T.. Detection of SRY in 45,X/47,XYY mosaicism leading to phenotypic female. *Clinical Genetics.* 1997 ; **51** : 124-126.

KUBIEN E.M., POZOR M.A., TISCHNER M.. Clinical, Cytogenetic and Endocrine Evaluation of a Horse with a 65,XXY Karyotype. *Equine Veterinary Journal*. 1993 ; **25** : 333-335.

LONG S.E.. Chromosome anomalies and infertility in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 1988 ; **20** : 89-93.

MEYERS-WALLEN V.N, SCHLAFER D., BARR I., LOVELL-BADGE R., KEYZNER A.. Sry-negative XX sex reversal in Purebred Dogs. *Molecular Reproduction and Development*. 1999 ; **53** : 266-273.

MILLIKEN J.E., PACCAMONTI D.L., SHOEMEKER R.S., GREEN W.H.. XX male pseudohermaphroditism in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1995; **207** : 77-79.

MORENO-MILLAN M., DELGADO BERMEJO J.V., LOPEZ CASTILLO G.. An intersex horse with X chromosome trisomy. *Veterinary Record*. 1989 ; **124** : 169-170.

POWER M.M.. Chromosomes of the horse. IN : *Domestic Animals Cytogenetics*. New York : R.A. McFeely. Academic Press, 1990, 131-167.

POWER M.M., LEADON D.P.. Diploid-triploid chimaerism (64, XX/96,XXY) in an intersex foal. *Equine Veterinary Journal*. 1990 ; **22** : 211-214.

CONCLUSION

Lors du choix du sujet de cette thèse, trois buts initiaux avaient été identifiés. Il s'agissait, d'une part, de faciliter l'identification de certains cas d'intersexualité et la cause de problèmes d'infertilité constatés chez le chien et le cheval; d'autre part, ce travail devait permettre de confronter les cas traités au Laboratoire de Cytogénétique à ceux décrits dans la littérature. Enfin, la thèse avait pour but de donner une idée des fréquences des différentes pathologies dans les deux espèces étudiées. Ceci impliquait une étude bibliographique assez exhaustive de l'intersexualité chez le chien et le cheval. Afin de faciliter la compréhension des différents cas rencontrés dans ces espèces, il était nécessaire d'envisager le développement sexuel normal chez les Mammifères, ainsi que ses anomalies (ces dernières ayant surtout été étudiées chez l'homme, les caprins, les porcins et les bovins) et leurs étiologies.

Cette étude bibliographique a montré la complexité du développement sexuel des Mammifères et la grande variété des mécanismes conduisant à un état intersexué. Un élément essentiel se dégage de cette analyse : contrairement à ce qui est observé dans les cas d'hypogonadisme, on note une absence de corrélation évidente entre le phénotype des animaux intersexués et leur sexe gonadique et chromosomique. Ceci peut être constaté chez l'homme, mais aussi chez le chien et le cheval. D'autre part, en l'absence de modification phénotypique, les états intersexués sont difficiles à diagnostiquer. Ils nécessitent le recours à un diagnostic d'exclusion. L'étude cytogénétique qui n'est entreprise que tardivement dans la démarche diagnostique ne donne qu'une approche imparfaite des cas. Il est actuellement possible de la compléter par une étude moléculaire. Malheureusement, tous les mécanismes impliqués dans l'intersexualité ne sont pas élucidés et la biologie moléculaire ne permet pas toujours de préciser l'étiologie de l'anomalie du développement sexuel. De plus, cette étude bibliographique a montré qu'il est, à l'heure actuelle, impossible de préciser le type d'intersexualité rencontré sans l'aide de l'analyse histologique des gonades. Ainsi, si le praticien peut envisager l'infertilité liée à l'hypogonadisme (par exemple dans le cas des juments X0), il n'a aucun moyen de prévoir le type d'intersexualité auquel il est confronté sans avoir recours aux examens complémentaires.

L'étude plus spécifique de la littérature concernant l'intersexualité dans l'espèce canine a montré que les fréquences des différents types d'état intersexué sont comparables à celles annoncées en 1980 par Chaffaux (48).

Chez le cheval, il est plus difficile de conclure, compte tenu du faible nombre de cas décrits et des approximations concernant les gonades (palpation trans-rectale).

Enfin, l'étude bibliographique a évoqué les avantages, les inconvénients et les limites des différents moyens d'investigation des états intersexués, ainsi que les perspectives d'avenir.

Dans la partie expérimentale de ce travail, on a essayé de présenter le cas le plus complet analysé au laboratoire pour chaque espèce ; pour ce faire, on a utilisé l'ensemble des techniques actuellement disponibles afin d'affiner. Toutefois, il n'a pas été possible de préciser l'étiologie des cas présentés. Beaucoup de travail reste à accomplir dans ce domaine. On peut penser que les progrès de la biologie moléculaire permettront de mieux appréhender les cas d'intersexualité. Enfin, il est possible que le chien soit utilisé, à terme, comme modèle animal des pathologies humaines, y compris dans le domaine des anomalies du développement sexuel.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle PAGET Sandrine, Christine, Renée

a été admis(e) sur concours en : 1996

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 20 juillet 2000

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, A. DUCOS, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, déclare que j'ai lu la thèse de :

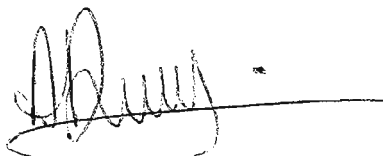
Mlle PAGET Sandrine, Christine, Renée

intitulée :

Etude cytogénétique et moléculaire d'un cas d'intersexualité chez le chien et le cheval

et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



Docteur Alain DUCOS

**Vu :
Le Directeur par intérim
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



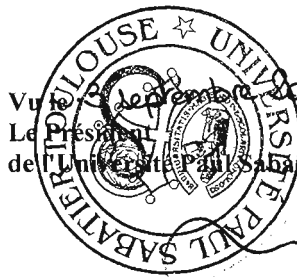
Professeur Gilbert BONNES

**Vu :
Le Président de la thèse :**



Professeur H. DABERNAT

**Vu le 22 septembre 2001
Le Président
de l'Université Paul Sabatier**



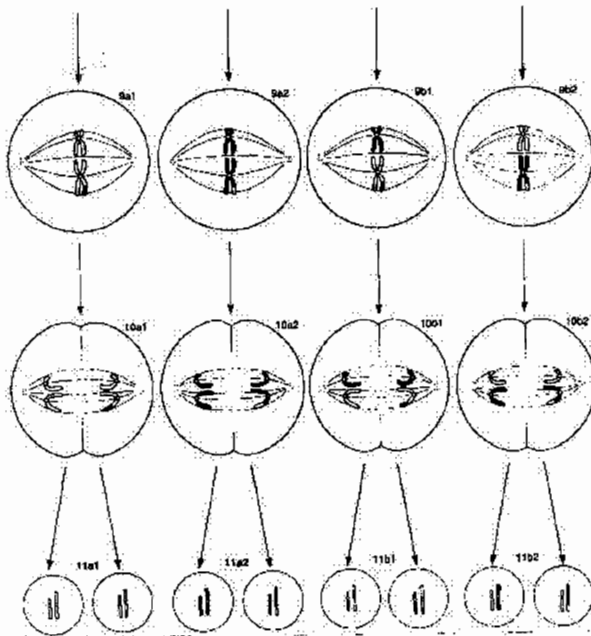
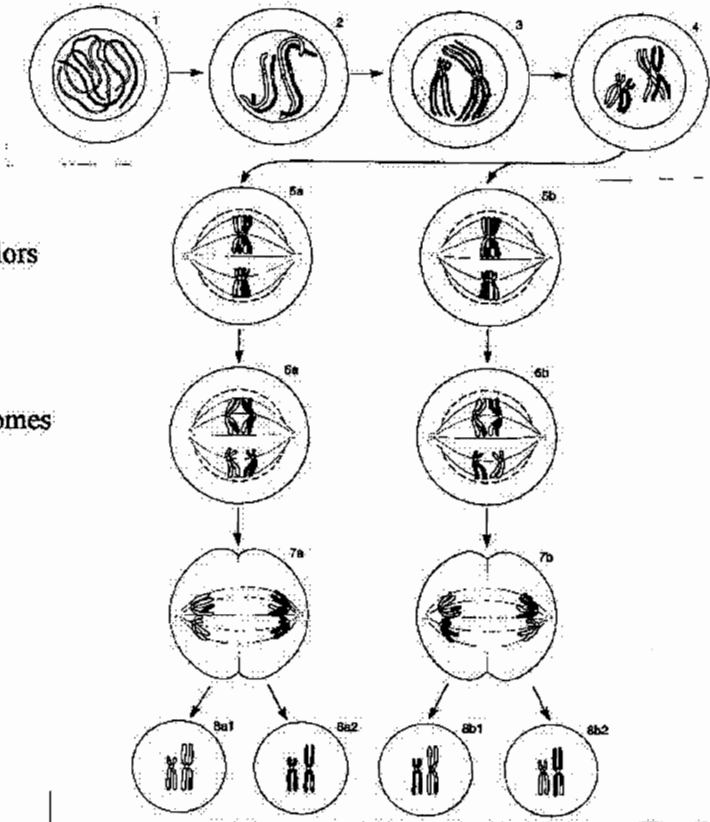
Professeur R. BASTIDE

ANNEXES

ANNEXE 1 : LA MEIOSE CHEZ LES MAMMIFERES

Deux paires chromosomiques et un seul crossing-over dans une paire chromosomique sont représentés.

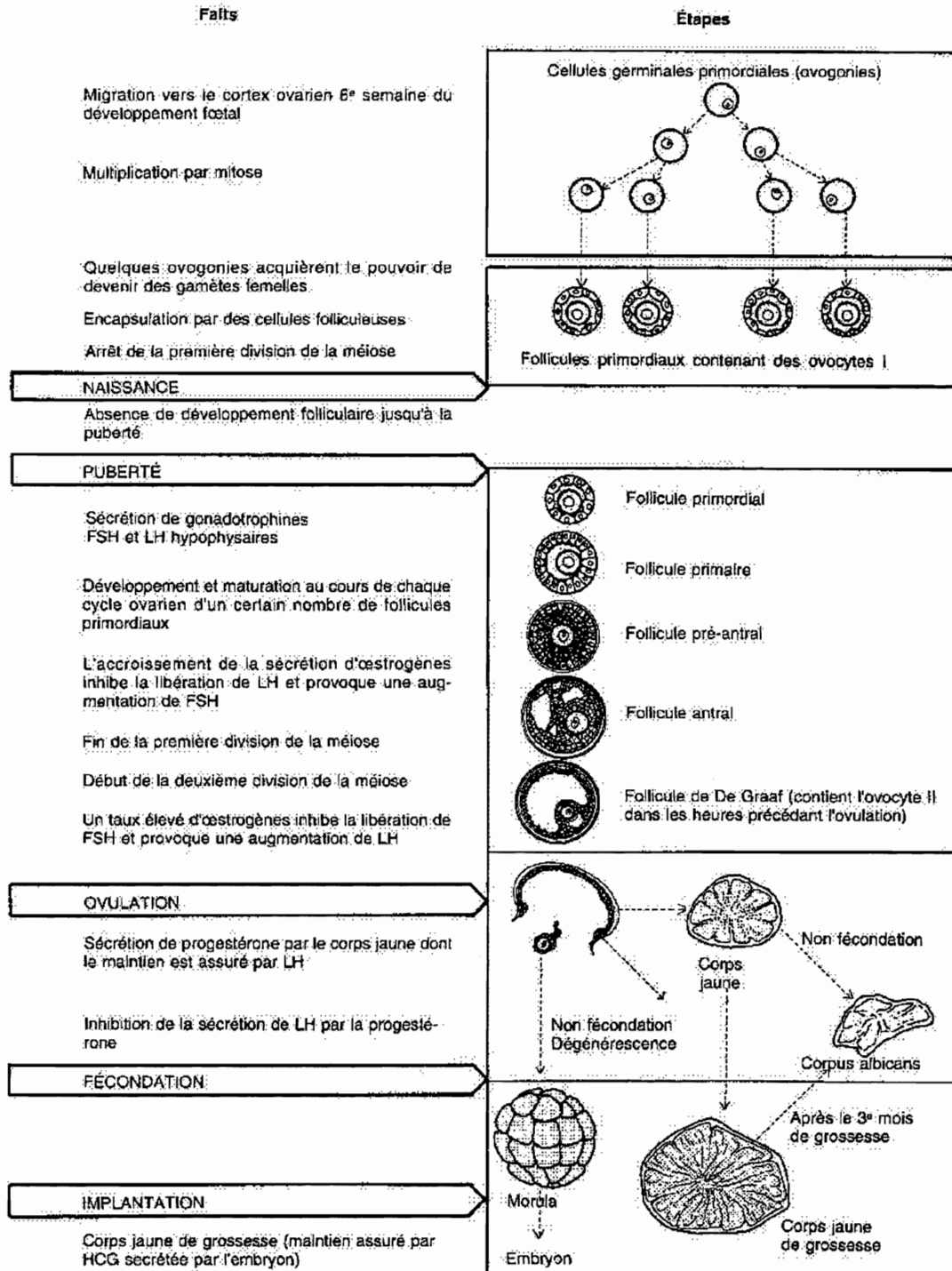
Méiose I :
 Stades 1-4 : prophase I
 5a, 5b: dispositions possibles lors de la métaphase I
 6a, 6b : anaphase I
 7a, 7b : télophase I
 8a1, 8a2, 8b1, 8b2: les 4 combinaisons possibles des chromosomes parentaux à la fin de la méiose I.



Méiose II :
 9a1, 9a2, 9b1, 9b2 : métaphase II
 10a1, 10a2, 10b1, 10b2: anaphase II
 11a1, 11a2, 11b1, 11b2: combinaison possible du matériel génétique dans les gamètes

(D'après Thompson, (270)).

ANNEXE 2 : DEVELOPPEMENT DE L'OVULE HUMAIN



Annexe 3 : Hermaphrodites vrais dans l'espèce canine (triés par phénotype, caryotype et date)

Race	Age	Org. génitaux externes	Dérivés des canaux de Wolff	Dérivés canaux de Müller	Remarques	Gonades	Caryotype	Auteur	Date	Réf.
Braque	6.5 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	2 ovotestis	Non déterminé	Meyers-Wallen	1999	183
American cocker spaniel	6 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	1 testicule 1 ovotestis	Non déterminé	Meyers-Wallen	1999	183
Soft coated Wheaten terrier	7 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	2 ovotestis	Non déterminé	Meyers-Wallen	1999	183
Kerry blue terrier	3 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	2 ovotestis	Non déterminé	Meyers-Wallen	1999	183
Carlin	6 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	2 ovotestis	Non déterminé	Meyers-Wallen	1999	183
Soft coated Wheaten terrier	5 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	2 ovotestis	Non déterminé	Meyers-Wallen	1999	183
Lévrier Afghan	2 ans	Clitoris péniforme			Os pénien	2 ovotestis	Non déterminé	Meyers-Wallen	1999	183
Cocker		Clitoris péniforme vulve	Absents	Vagin-utérus	Os pénien	G : testicule abdominal D : ovaire abdominal	Non déterminé	Lawrence	1952	151
Cocker		Clitoris péniforme vulve	Absents	Vagin-utérus-oviductes	Os pénien	2 ovotestis abdominaux	Non déterminé	Walker	1961	284
Croisé Terrier		Clitoris péniforme vulve	Epididyme et canal déférent à droite	Vagin-utérus		G : ovotestis D : testicule abdominaux	Non déterminé	Vandevelde	1965	275
Cocker-spaniel	7 mois	Clitoris péniforme vulve	1 épидидyme 1 canal déférent	Utérus	Œstrus à 6 mois Agressivité 2 semaines après les chaleurs Os pénien Un ascendant crytorchide	2 ovotestis abdominaux	Non déterminé	Sundberg	1979	258

	forme vulve																		
Cocker	Clitoris péniforme vulve	Absents	Vagin-utérus-oviductes	Os pénien	dominal D : ovaire abdominal	Non déterminé	Walker	1961	284										
Croisé Terrier	Clitoris péniforme vulve	Epididyme et canal déférent à droite	Vagin-utérus		G : ovotestis D : testicule abdominaux	Non déterminé	Vandevelde	1965	275										
Cocker-spaniel	Clitoris péniforme vulve	1 épидidyme 1 canal déférent	Utérus	Œstrus à 6 mois Aggressivité 2 semaines après les chaleurs Os pénien Un ascendant crytorchide	2 ovotestis abdominaux	Non déterminé	Sundberg	1979	258										
7 Pointers	Clitoris péniforme vulve			Os pénien PCR SRY négative Chiens de la même famille	1 ou 2 ovotestis abdominaux	Non déterminé	Meyers-Wallen	1995	181										
3 Pointers	Clitoris péniforme vulve			Chiens de la même famille Diagnostic : clitoris péniforme + os pénien		Non déterminé	Meyers-Wallen	1995	181										
Beagle	Clitoris péniforme vulve	Epididyme	Vagin-utérus-oviductes		2 ovotestis abdominaux	XX	King	1964	141										
Caniche	Clitoris péniforme vulve	Absents	Vagin-utérus-oviductes	Os pénien	2 ovotestis abdominaux	XX	Mc Feely	1967	164										
Caniche	Clitoris péniforme vulve	Absents	Vagin-utérus-oviductes	Os pénien	2 ovotestis abdominaux	XX	Hare	1976	112										
Cocker spaniel	Clitoris péniforme vulve	Epididymes	Vagin-utérus	Os pénien Glande bulbair palpables Comportement de mâle 24 cellules vues	2 ovotestis abdominaux	XX	Allen	1981	8										

Braque de Weimar	3 ans	Clitoris péniforme vulve	Absents	Vagin-utérus	Os pénien Cycles irréguliers Vaginite chronique Testotéronémie élevée	G : ovaire D : testicule abdominaux	XX	Tangner	1982	264
Pointer	1 an	Clitoris péniforme vulve	Absents	Vagin-utérus	Clitoris de constitution normale Pas de spermatogénèse	2 ovotestis abdominaux	XX (phénotype H-Y)	Randolph	1988	225
Croisé	Adulte	Clitoris péniforme vulve		Vagin-utérus	Os pénien	2 ovotestis abdominaux	XX	Fitzgerald	1990	84
Pointer	5 mois	Clitoris péniforme vulve		Vagin-utérus	Os pénien 50 métaphases vues XX 3 caryotypes en bandes G (X normal)	2 ovotestis abdominaux	XX	Sommer	1991	253
2 Pointers		Clitoris péniforme vulve			Os pénien PCR SRY négative Chiens de la même famille	1 ou 2 ovotestis abdominaux	XX	Meyers-Wallen	1995	181
Shipperke		Clitoris péniforme vulve	Epididyme à gauche	Vagin-utérus	Pas d'os pénien	G : testicule abdominal D : ovotestis abdominal	XX/XY	Gerneke	1968	93
Beagle		Clitoris péniforme vulve	Epididymes et canaux déférents	Vagin-utérus-oviductes	Os pénien 49 XX 1 XY	2 ovotestis abdominaux	XX/XY	Pullen	1970	224
Carlin		Clitoris péniforme vulve	Epididymes	Vagin-utérus	Os pénien Manifestations d'œstrus	G : ovotestis D : testicule abdominaux	XX/XY	Bosu	1978	23
Croisé Fox	8 ans	Clitoris péniforme/vulve de petite taille	Epididyme à droite	Vagin-utérus-oviductes	Incontinence urinaire Attire les mâles en permanence Pas de chaleur Dépilations	G : ovaire (des follicules atrophiques, pas d'ovocyte) D : testicule (pas de cellules germi-	XY	Chaffaux	1986	49

Boxer	Pénis	Canaux déférents	2 cornes utérines incomplètes	diffuses Os pénien	nales) Sertolli- nome	Non déterminé	Alexon	1966	7
Croisé Setter	Pénis et cavités préputiales rudimentaires	Epididymes	Utérus	Prostate Pas de fourreau	G : ovotestis D : testicule abdominaux	Non déterminé	Philips	1939	213
Setter irlandais	Pénis prépuce et scrotum	Absents	Corps utérin	Cellules de différents organes : 10 à 40 % de XXY	2 ovotestis abdominaux	XX/XXY	Dain	1979	69
Danois	Prépuce scrotum	Epididymes	Vagin-utérus	Anoestrus	2 ovotestis abdominaux	XXY	Bosu	1978	23
2 Beagles	Vulve	Absents	Vagin-utérus- oviductes		2 ovotestis abdominaux	Non déterminé	Murti	1966	194
Caniche nain	Vulve	Absents	Vagin-utérus Corne droite d'apparence normale Corne gauche absente	Alopécie bilatérale symétrique depuis 3 ans. Pas de prurit Cycles irréguliers depuis 2 ans Ovariohystérectomie et repousse des poils	2 ovotestis abdominaux à la place des ovaires	Non déterminé	Medleau	1989	176
Cocker	Vulve	Absents	Vagin-utérus- oviductes	A eu une portée avec un pseudo-hermaphrodite mâle XX, une femelle XX et un chiot mort	2 ovotestis abdominaux	XX	Selden	1978	242
Colley	Vulve et clitoris normal	Absents	Vagin étroit Utérus avec 2 cornes ; structure normale	1 ^{ères} chaleurs à 10 mois Anoestrus de 19 mois Frottis : anoestrus Profils hormonaux de femelle en anoestrus	1 ovaire fonctionnel 1 testicule avec un séminome	XX	Thomas	1986	268

Annexe4 : Pseudohermaphrodites mâles et XX sex reversal dans l'espèce canine (triés par phénotype, caryotype et date)

Race	Age	Org. génitaux externes	Dérivés des canaux de Wolff	Dérivés canaux de Müller	Remarque	Gonades	Caryotype	Auteur	Date	Réf.
American cocker spaniel	5 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	Testicules	Non déterminé SRY négatif	Meyers-Wallen	1999	183
Cocker anglais	1 an	Clitoris péniforme				Testicules	Non déterminé SRY négatif	Meyers-Wallen	1999	183
SC	2 ans	Clitoris péniforme			Os pénien	Testicules	Non déterminé SRY négatif	Meyers-Wallen	1999	183
American pi bull	2.5 ans	Clitoris péniforme			Os pénien	Testicules	Non déterminé SRY négatif	Meyers-Wallen	1999	183
Braque de Weimar	6.5 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	Testicules	Non déterminé SRY négatif	Meyers-Wallen	1999	183
American cocker spaniel	6 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	Testicules	Non déterminé SRY négatif	Meyers-Wallen	1999	183
Border Collie	11 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	Testicules	Non déterminé SRY négatif	Meyers-Wallen	1999	183
Beagle	1.5 an	Clitoris péniforme			Os pénien	Testicules	XX (XXSR) SRY négatif	Meyers-Wallen	1999	183
Chien courant	6 mois	Clitoris péniforme			Os pénien	Testicules	XX (XXSR) SRY négatif	Meyers-Wallen	1999	183
Caniche	5 mois	Clitoris péniforme			Pas d'os pénien	Testicules	XY PCR et Southern Blot positifs pour SRY	Meyers-Wallen	1999	183
Norwegian Elkhound	8 mois	Clitoris péniforme et vulve normal	Epididymes et canaux déférents	Vagin-cervix-utérus d'apparence normale	Os pénien	Testicules abdominaux (pas de cellules germinales, que des tubes séminifères)	XX (XXSR) SRY négatif	Melniczek	1999	177
Yorkshire	6 ans	Clitoris péniforme et vulve		Vagin normal Utérus et pyomè-	Os pénien Pas de chaleurs	1 testicule normal 1 testicule avec un	XY 100 cellules obser-	Volpe	2000	281

	normal		tre	Abdomen distendu, abatement et écoulements vulvaires Profils hormonaux femelles	séminome	vées		
2 Cocker	Clitoris péniforme vulve	Epididymes	Vagin-utérus	Os pénien Pas de spermatogénèse	1 testicule abdominal, 1 testicule inguinal	Non déterminé	Philips	1939 213
Cocker	Clitoris péniforme vulve	Epididyme canal déférent à droite	Vagin-utérus		1 testicule abdominal, 1 testicule inguinal	Non déterminé	Morris	1952 192
Terrier	Clitoris péniforme vulve	Epididyme	Vagin-utérus	Os pénien Spermatogénèse bloquée au stade spermatogonie	1 testicule abdominal 1 testicule inguinal	Non déterminé	Brodey	1954 32
Beagle	Clitoris péniforme vulve	Epididymes	Vagin-utérus	Os pénien	Testicules abdominaux	Non déterminé	Murti	1966 194
Beagle	Clitoris péniforme vulve		Vagin-utérus		Testicules abdominaux	Non déterminé	Leighton	1976 156
Afghan	Clitoris péniforme vulve		Utérus	Incontinence urinaire Fistule uréthro-vaginale	Testicules abdominaux	Non déterminé	Carillo	1977 46
American cocker spaniel	Clitoris péniforme vulve	Epididymes	Vagin-utérus	Dysurie Difficultés pour se coucher en position sternale	Testicules abdominaux reliés au pôle caudal du rein	Non déterminé	Gottself	1996 99
3 Carlins	Clitoris péniforme vulve	Epididymes et canaux déférents		Chiens de la même lignée, même mâle pour ascendant Prostate Epispadia	Testicules abdominaux	Un seul déterminé XX	Stewart	1972 254
Cocker	Clitoris péniforme vulve	Epididymes et canaux déférents	Vagin-utérus		Testicules abdominaux	XX (XXSR)	Edols	1968 80
2 Cocker-spaniels	Clitoris péniforme vulve	Epididymes et canaux déférents	Utérus	Chiens de la même portée	Testicules abdominaux	XX Tous les 2 XXSR	Hare et Mc Feely	1974 111

Cocker-spaniel	9 mois	Clitoris péniforme vulve	Epididymes et canaux déférents	Utérus	Chien de la même lignée que les précédents, même mâle pour ascendant	Testicules abdominaux	1 : 102 cellules 2 : 144 cellules	Hare et Mc Feely	1974	110
Basset artésien Normand	2.5 ans	Clitoris péniforme vulve	Epididymes	Utérus oviductes	Os pénien	Testicules abdominaux	XX (XXSR) 294 cellules	Chaffaux	1990	51
Labrador croisé setter	18 mois	Clitoris péniforme vulve		Utérus et col	Augmentation de la distance anogénitale	Testicules abdominaux	XX/XXY 75 cellules	Allen	1981	8
Colley		Clitoris péniforme vulve		Vagin-utérus-oviductes	Os pénien	Testicules abdominaux	XY	Schultz	1962	240
2 Mâtins		Clitoris péniforme vulve		Vagin-utérus-oviductes		Testicules abdominaux	XY	Brown	1963	34
Berger allemand		Clitoris péniforme vulve		Vagin-utérus-oviductes	Os pénien	Testicules abdominaux	XY	Mc Feely	1967	164
Terrier		Clitoris péniforme vulve	Epididymes et canaux déférents	Vagin-utérus	Os pénien	Testicules abdominaux	XY	Gerneke	1968	93
West highland white terrier		Clitoris péniforme vulve	G : canal déférent épидидyme	Utérus		1 testicule abdominal 1 testicule inguinal (G)	XY	Johnson	1983	133
Berger allemand		Clitoris péniforme vulve	Petite prostate	Vagin-utérus	Os pénien Incontinence urinaire	Testicules abdominaux	XY	Holt	1983	116
Berger allemand	1 an	Pénis Vulve rudimentaire	Pas de laparotomie exploratrice		Pas de fourreau Scrotum anormal Hypospadias Spermatogénèse active	Testicules inguinaux	XY/X+X atypique (17 cellules XY 3 cellules XX')	Chaffaux	1980	48
Croisé		Pénis		Utérus	Absence partielle du fourreau	Testicules abdominaux	Non déterminé	Axelson	1978	10

Cocker		Pénis	Epididymes et canaux déférents	Utérus-oviductes	Pas de fourreau Persistence du frein préputial Vésicules séminales ?	D : testicule abdominal G : testicule scrotal	XX/XXY	Dain	1979	69
Schnauzer	9 ans	Pénis		Utérus	Sertolinome Pyomètre	1 testicule abdominal 1 testicule scrotal	XY	Chaffaux	1980	48
Berger Belge	3 ans	Pénis anormalement développé et non fonctionnel		Utérus et oviductes	Attitude de chien mâle, tentatives de saillies Agressivité Urètre débouche sous l'anus	Testicules normaux	XX/XY 50 métaphases : 85 % XX 15 % XY	Genero	1998	91
Beagle	18 mois	Pénis de petite taille	Epididymes	Utérus : une corne normale et une ressemblant à un canal déférent	Pas de scrotum Os pénien mal positionné Pas de prostate Pyomètre	Testicules abdominaux	XX (XXSR)	Williams	1997	289
Schnauzer nain		Pénis et prépuce	Epididymes et canaux déférents	Utérus	Sertolinome bilatéral. Pyomètre, métaplasie de l'épithélium utérin	Testicules abdominaux	Non déterminé	Frey	1965	89
Cocker	6 mois	Pénis et prépuce		Utérus	Os pénien réduit	Testicules abdominaux	Non déterminé	Potter	1967	218
Schnauzer nain	5 ans	Pénis et prépuce gynécomastie	Epididymes et canaux déférents	Vagin-utérus	Douleur abdominale Sertolinome du testicule abdominal Canal déférent inclus dans la paroi utérine	G : testicule abdominal D : testicule scrotal	Non déterminé	Norridin	1970	202
Schnauzer nain	5.5 ans	Pénis et prépuce		Utérus	Sertolinome unilatéral	Testicules abdominaux	Non déterminé	Lederer	1975	154
Schnauzer nain	8 ans	Pénis et prépuce		Utérus	Sertolinome bilatéral Séminome Prostate	1 abdominal et 1 inguinal	Non déterminé	Brown	1976	35

Schnauzer nain	5 ans	Pénis et prépuce	Epididymes et canaux déférents	Utérus	Sertolinome bilatéral	Testicules abdominaux	Non déterminé	Brown	1976	35
Schnauzer nain	6 ans	Pénis et prépuce	Epididymes et canaux déférents	Utérus	Sertolinome bilatéral	Testicules abdominaux	Non déterminé	Brown	1976	35
Schnauzer nain		Pénis et prépuce		Vagin-utérus	Sertolinome Prostate Pyomètre	Testicules abdominaux	Non déterminé	Salkin	1978	235
Schnauzer nain	9 ans	Pénis et prépuce		Utérus	Sertolinome unilatéral PUPD et fièvre associés à un utérus hypertrophié (utérus relié à la vessie, contenant de l'urine et du pus)	1 testicule normal 1 testicule tumoral intra abdominal	Non déterminé	Newman	1979	196
Schnauzer nain	10 ans	Pénis et prépuce Gynécomastie et alopecie bilatérale symétrique		Utérus et pyomètre	Distension abdominale, dépression et vomissements Supposé castré (adopté à la SPA à 8 mois)	2 testicules intra-abdominaux Sertolinome	Non déterminé	Bruinsma	1983	39
Basset hound	5 ans	Pénis et prépuce	Epididymes et canaux déférents	Utérus relié au tractus mâle en avant de la prostate	Tumeur testiculaire Puis : pyomètre Cornes utérines dans le sac scrotal par le canal inguinal	Testicules en position scrotale	Non déterminé	Maskill	1992	175
Teckel	8 ans	Pénis et prépuce		Utérus avec un contenu liquidien Utérus atrophié	Cryptorchidie Hypertrophie du testicule droit inguinal depuis 3 semaines Intérêt pour les femelles	Testicule inguinal droit avec un sertolinome Testicule gauche palpable atrophié avec un petit séminome	Non déterminé	Schulenburg	1992	241

Cocker	3 mois	Pénis et prépuce	Epididymes et canaux déférents	Utérus-oviductes	131 cellules vues Prostate Hypospadias	Testicules abdominaux	XX (XXSR)	Dain	1974	68
Cocker		Pénis et prépuce		Utérus	Hypospadias Mère hermaphrodite (ovotestis bilatéral)	1 testicule abdominal 1 testicule inguinal	XX (XXSR)	Selden	1984	243
Schnauzer		Pénis et prépuce	Epididymes	Utérus	Sertolinome Féminisation	Testicules abdominaux	XXY	Marshall	1982	174
Berger allemand	8 ans	Pénis et prépuce	Epididymes	Utérus	Incontinence urinaire Pyomètre Persistence du frein préputial	Testicules en position scrotale	XY	Chaffaux	1980	48
3 Schnauzers		Pénis et prépuce	Epididymes	Utérus	Sertolinome Pyomètre 2 cas de féminisation	2 cas : Testicules abdominaux 1 cas : 1 testicule abdominal 1 testicule scrotal	XY	Marshall	1982	174
Caniche		Pénis et prépuce	Prostate hypertrophiée Canal déférent et épидидyme gauches	Utérus	Sertolinome Féminisation	Testicules abdominaux	XY	Svendson	1985	259
3 Cockers		Pénis et prépuce anormal en position abdominale postérieure	Epididymes et canaux déférents Prostate	Utérus	Malformation du prépuce Animaux consanguins	Testicules abdominaux	XX (XXSR)	Meyers-Wallen	1988	179
Pékinois		Pénis prépuce et scrotum	Epididyme	Utérus et col	Sertolinome Féminisation	Testicules abdominaux	XY	Svendson	1985	259
Schnauzer nain	8 ans	Pénis prépuce et scrotum d'apparence normale Gynécomastie		Utérus et pyomètre Corne droite liée au testicule dans la scrotum Corne gauche liée	Hernie inguinale opérée vers 7,5 ans récidive Pas de libido Ecoulements prépucciaux	Testicule droit palpable dans le scrotum Testicule gauche : sertolinome	Non déterminé	Brennecke	1979	31

Croisé	6 mois	Pénis-petit prépuce ressemblant à un vagin et paraphimosis	Pas de laparotomie exploratrice	à testicule intra-abdominal	Abdomen distendu	Pas de testicules palpables lors de la consultation Descente des testicules lors de l'anesthésie générale	Non déterminé	Lee	1976	155			
Cocker spaniel	18 mois	Scrotum rudimentaire Vulve et clitoris péniforme	Epididymes	Tissu utérin mais d'utérus nettement formé	Vagin aveugle Os pénien Taux d'œstrogènes faible pour une femelle mais normal pour un mâle	Testicules abdominaux azoospermie	Non déterminé	Harbour	1987	110			
Schmauzer nain	3 ans	Vulve plus ventrale que la normale Clitoris normal	Absent	Utérus atrophié	Vulve très développée ressemblant à un prépuce Prurit et alopecie depuis 2 ans	2 testicules abdominaux atrophiés	Non déterminé	Medleau	1989	176			

Annexe 5 : Pseudohermaphrodites femelles et femelles XY dans l'espèce canine (triés par phénotype, caryotype et date)

Race	Age	Org. génitaux externes	Dérivés des canaux de Wolff	Dérivés canaux de Müller	Remarque	Gonades	Caryotype	Auteur	Date	Ref.
Shetland	5 ans	Clitoris hypertrophié		Vagin utérus avec des anomalies	Incontinence urinaire. Un seul oestrus avant l'âge de 1 an	Ovaires	Non déterminé	Stewart	1962	254
Cocker	2.5 ans	Pénis et prépuce		Vagin utérus oviductes	Incontinence urinaire. Prostate rudimentaire. Pas d'os pénien. Ovaires type chienne pseudogestante. Manifestations œstrales	Ovaires	XX	Mc Feely	1965	163
Berger allemand	6 mois	Pénis et prépuce		Vagin utérus oviductes	Incontinence urinaire et fistule urétrovaginale	Ovaires	XX	Hoffmann	1972	115
Caniche croisé Pékinois	1 an	Pénis et prépuce		Utérus	Incontinence urinaire et fistule urétrovaginale	Ovaires	XX	Jackson	1978	129
Cocker	18 mois	Pénis et prépuce		Utérus normal, dilaté, adhèrent à la vessie en amont du col 2 pertuis permettent le passage de l'urine de la vessie à l'utérus	Cryptorchidie et hypoplasie de l'appareil génito-urinaire externe Distension abdominale brutale Attrait des mâles	Ovaires avec une activité oestrogénique et porteurs de corps jaunes	XX	Lennoz	1988 (article reçu en 1986)	158
Croisé caniche	13 ans	Pénis et prépuce	Prostate	Utérus	Cryptorchidie Incontinence urinaire et écoulements au niveau du prépuce Pyomètre	Ovaires	XX	Nemzek	1992	195
Croisé Epagneul	1 an	Pénis et prépuce		Utérus	Dysurie	Ovaires	XX/XY	Chaffaux	1980	48

pillon Cairn terrier	6.5 mois	Pénis et prépuce peu développé		Utérus adhérent au rectum (pas de communication) et communicant avec la vessie Utérus rempli d'urines	Incontinence urinaire Absence de scro- tum. Testicules non palpables Douleur abdomi- nale	Ovaires avec des follicules déve- loppés	Non déterminé	Van Schouwen- burg	1982	276
German Shepherd	6 mois	Petit pénis pré- puce		Utérus rempli de 5-6 litres d'un liquide citrin non odorant (cf. glan- des utérines)	Cryptorchidie notée dès l'âge de 2 mois A 6 mois, éma- ciation et abdo- men distendu Euthanasie	Ovaires avec follicules atréti- ques	Non déterminé	Perl	1979	212
Greyhounds	18 mois	Petit prépuce pas de pénis pas de scrotum		Vagin et utérus communiquent avec système urinaire Utérus infantile	Pas d'activité lutéale (cf. Pro- gestéronémie) Mère a reçu du testo-propionate peu avant les chaleurs	Ovaires	Non déterminé	Olson	1989	206
Greyhounds	18 mois	Petit prépuce pas de pénis pas de scrotum		Vagin et utérus communiquent avec système urinaire Utérus normal	Activité lutéale (cf. Progestéro- némie) Dioestrus et pré- sence d'un corps jaune Mère a reçu du testo-propionate peu avant les chaleurs	Ovaires	Non déterminé	Olson	1989	206
Greyhounds	18 mois	Petit prépuce pas de pénis pas de scrotum		Vagin et utérus communiquent avec système urinaire Pyomètre	Activité lutéale (cf. Progestéro- némie) Mère a reçu du testo-propionate peu avant les chaleurs	Ovaires	Non déterminé	Olson	1989	206

4 Briards		Prépuce		Utérus	Chiots d'une portée de 6 (2 mâles normaux)	Ovaires	2 chiens XX	Rothuizen	1978	232
Croisé Colley	1 an	Prépuce		Utérus et col vagin	Apparence de mâle mais absence de pénis et de scrotum Attire les mâles	Ovaires	XX (28 cellules)	Allen	1981	8
Teckel	2.5 ans	Prépuce réduit Pénis non extériorisable Scrotum		Utérus à paroi hypertrophiée Vagin	Attire parfois les mâles. Pas d'os pénien. Testicules non palpables Pas de prostate	Ovaires avec de nombreux follicules de petite taille	45 cellules XX 5 cellules XY	Weaver	1979	286
Basset hound	2.5 ans	Vulve atrophiée Micropénis Orifice périnéal		Vagin utérus oviductes	Incontinence urinaire Infections urinaires	Ovaires	XX	Gregory	1997	102
Braque hongrois	4 mois	Vulve atrophiée Pénis rudimentaire Fistule vestibulo-périnéale		Vagin utérus oviductes	Incontinence urinaire	Ovaires	XX	Gregory	1997	102
3 Bearded collie	10 mois	Vulve petite étroite placée en position ventrale, prolongée par un repli cutané ressemblant à un fourreau Clitoris hypertrophié		Vagin utérus oviductes	Chiots d'une portée de 5 (2 mâles normaux) Incontinence urinaire Chaleurs normales	Ovaires	XX Origine iatrogène	Chaffaux	1990	51

Annexe 6 : Hermaphrodites vrais dans l'espèce équine (triés par phénotype, caryotype et date)

Race	Age	Org. génitaux externes	Dérivés des canaux de Wolf	Dérivés canaux de Müller	Remarque	Gonades	Histo	Caryotype	Auteur	Date	Réf.
Croisé Arabe	3 ans	Pénis prépuce et périnée normaux Cryptorchidie	Epididymes		Comportement d'étalon	1 ^{ère} chirurgie : 1 masse dans le canal inguinal droit = tissu ovarien 2 ^{ème} chirurgie : 2 testicules intra-abdominaux		XX/XY (103 : 37) étude sur les gonades et la peau	McIlwraith	1976	167
Poney Welsh	1 an	Petit pénis lié au prépuce. Pas de scrotum. Testicules non palpables. Vésicules séminales	Epididymes Canaux déférents	Utérus présentant une hypoplasie	Prostate hypoplasique Absence de libido Urine dans le prépuce (urètre ventral)	2 ovotestis abdominaux G : partie ovarienne domine D : partie testiculaire domine		XX/XY (10cellules XX et :31 cellules XY)	Dunn	1981	78
Trotteur	1 an	Petit pénis. Prépuce normal. Testicules non palpables. Vésicules séminales. Pseudo-vulve	Epididymes	Petit utérus en T	Urine comme une femelle. Urètre s'ouvre dans une pseudo-vulve	2 ovotestis abdominaux		X0/XY/XX Y Sang: 20 cellules XY/2 cellules X0 Rein: 11 cellules XY/6 cellules X0 Total: 76 cellules	Dunn	1981	78
Quarter Horse	4 ans	Vulve Clitoris hypertrophié	Pseudo-epididyme à gauche	Cervix Utérus plus petit que la normale Pseudo-oviducte à droite	Comportement normal anoestrus	Droite : ovaire (tissu fibreux, pas de follicule ni de corps jaune) Gauche : testi-		XX	Shook	1990	247

Pasa fino	16 mois	Vulve Clitoris hypertrophié		Palpation : pas d'utérus ni de cervix Chirurgie : vestige d'utérus	Comportement d'étalon Pas d'administration d'androgènes connue	cule (tissu fibreux et cellules de Sertoli) 2 gonades ressemblant à des ovaires Tubes séminifères (pas de spermatogonies), cellules de Leydig, follicules I et stroma ovarien	XX SRY négatif	Meyers-Wallen	1997	182
Arabe	7 ans	Vulve Clitoris très hypertrophié			Comportement d'étalon	Droite : testicule (tissu fibreux et tubes séminifères), gonadectomie Gauche : aspect d'ovaire avec des follicules vus par échographie	XX (30cellules) SRY négatif	Buoen	2000	42

Annexe 7 : Pseudo-hermaphrodites mâles dans l'espèce équine (triés par phénotype, caryotype et date)

Race	Age	Org. génitaux externes	Dérivés des canaux de Wolff	Dérivés canaux de Müller	Remarque	Gonades	Histo	Caryotype	Auteur	Date	Réf.
Pur-sang	12 ans	Dystopie et hypoplasie du pénis et du prépuce Cryptorchidie			Comportement d'étalon dès l'âge de 6-9 mois Castration à 1 an	2 testicules en position inguinale		X0/XY (82 : 38 cellules) mosaïque dans le sang et la peau	Höhn	1980	117
Croisé	3 ans	Pénis Apparence d'hongre	Glandes bulbo-urétrales	Utérus	Urine comme un jument Pas de prostate Pas de vésicule séminale	2 testicules sous-cutanés cellules de Leydig (pas de cellules de Sertoli, ni de spermatogonies)		Non déterminé	White	1969	287
Belge	2 ans	Pénis Apparence d'hongre (Cryptorchide) Pénis ventral par rapport à l'anus		Pas d'utérus palpable	Comportement et conformation d'étalon	Testicules abdominaux (tubes séminifères, cellules de Leydig, pas de spermatogonies)		XX/XY/XXY (50 : 5 : 4 cellules)	Dunn	1974	77
Palamino	2 ans	Pénis et prépuce de petite taille Pénis partiellement érectile	Vésicules séminales, glandes bulbo-urétrales Prostate		Etalon Développement du tissu mammaire Testostérone > valeur des femelles, mais oestrogènes < aux valeurs du mâle normal	2 petits testicules mous en position inguinale (peu de tubes séminifères, beaucoup de cellules de Leydig)		XX (30 métaphases à partir du sang et des fibroblastes) SRY négatif	Constant et Buoen	1994 et 2000	59 et 42
Appaloosa	2 ans	Vulve et raphé médian au niveau périnéal Clitoris pénis-	Epididymes		Comportement d'étalon Conformation de mâle, mais déve-	2 testicules partiellement descendus (beau-coup de cellules		XX (20 métaphases à partir du	Milliken et Buoen	1995 et 2000	185 et 42

Nord Svensk	18 mois	forme normale Micropénis érectile			Pas d'utérus palpable	Comportement d'étalon en présence de femelles en chaleur Mamelle rudimentaire	2 testicules au niveau en position inguinale	Non déterminé	Kodagali	1969	143
Arabe	6 mois	Vulve normale Clitoris péniforme érectile			Vestibule borgne Pas d'utérus	Est attiré par les femelles en chaleur et Flehmen	2 testicules dans le canal inguinal peu de tubes séminifères, pas de spermatogonie	X0/XX/XXY (7 : 158 : 13 cellules)	Fretz	1976	88
Poullain	1 an	Vulve normale Clitoris péniforme de 7 cm de long et hypospadias			Utérus	Conformation de femelle normale	2 testicules intra-abdominaux hypoplasiques	XX	Bornstein	1967	22
North Swedish.	1.5 an	Vulve normale Clitoris péniforme			Utérus	Conformation normale pour une femelle Comportement d'étalon Erection	2 testicules intra-abdominaux hypoplasiques	XX	Bornstein	1967	22
Poullain	2 mois	Vulve normale Clitoris péniforme Bourses Monorchide					1 testicule abdominal 1 testicule scrotal	XX	Leadon	1987	152
Croisé		Vulve normale Apparence femelle normale				Non renseigné	2 testicules abdominaux	XX (30 métaphases à partir du	Buoen	2000	42

Trotteur	6 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Vestibule borgne Pas de vagin Pas d'utérus ni de cervix	Bonne carrière en courses, avant main développée Contrôle antidopage positif (pas de traitement) Comportement d'étalon 2 soeurs de même phénotype et de même comportement	2 testicules palpables			Cammaert	1993	45
Poney Welsh	2 ans	Vulve normale Clitoris péniforme érectile	Petits épiddymes	Vagin rudimentaire borgne Pas d'utérus	Comportement d'étalon en présence de femelles	2 testicules abdominaux (tubes séminifères cellulés de Leydig, pas de spermatogonies)s			Bouters	1972	24
Poney Welsh		Vulve normale Micropénis		Petit vagin Pas d'utérus	Urètre pénien Comportement d'étalon Erection	2 testicules abdominaux (95% :5%)			Bouters	1975	25
Andalous	7 ans	Vulve normale Micropénis érectile		Petit vagin Pas d'utérus ni de cervix palpables	Considéré comme une femelle à la naissance Agressivité envers les étalons Tentatives de saillies Anoestrus permanent	2 testicules palpés en région inguinale			Moreno-Millan	1989	190
Quarter Horse	7 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Vagin de taille normale mais	Comportement d'étalon en présence de femelles	2 testicules à la place des ovaires			Kieffer	1976	140

Coisé Percheron	4 ans	Vulve normale en position intermédiaire Micropénis monorchide	Epididymes Canaux déférents	borgne Pas de cervix Utérus	sence de femelles en chaleur Tentatives de saillies Agressivité	(tubes séminifères et cellules de Leydig)	les sangui- nes et 30 cellules de peau) Tfm X0/XX/XY/ XXY (8 : 32 : 19 : 3 cellules) Possible freemarti- nisme	Basrur	1969	12
Nonius	3 ans	Vulve normale en position intermédiaire Micropénis		Utérus infantile	Agressivité vis à vis des chevaux Mamelle rudimentaire	2 petits testicules sous-cutanés	XXXY (63 cellules)	Gluhovschi	1970	98
Arabe	1 an	Vulve rudimentaire Clitoris péniforme	Epididymes et canaux déférents immatures	Pas de laparotomie	Petite pour son âge Comportement normal	2 testicules en position inguinale Pas de spermatogonies	XX (caryotype sur des cellules de moelle)	Gerneke	1970	94

Annexe 8 : Pseudo-hermaphroditisme femelles dans l'espèce équine (triés par phénotype, caryotype et date)

Race	Age	Org. génitaux externes	Dérivés des canaux de Wolff	Dérivés canaux de Müller	Remarque	Gonades	Histo	Caryotype	Auteur	Date	Réf.
Pur-sang	> 5 ans			Appareil génital flasque	Stature importante Pas d'oestrus Absence de croissance folliculaire malgré le traitement aux gonadotropines	Petits ovaires (3cm x 1cm)		XY SR	Nie	1993	198
Andalous	1 an	Clitoris hypertrophié		Utérus		Absence d'ovaire droit		XX (30 métaphases dans le sang et la peau)	Buoen	2000	42
Arabe	8 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Dérivés des canaux de Müller normaux	Nombreuses saillies infructueuses Cycles irréguliers Hypothèse de gestation gémellaire non confirmée	Petits ovaires Pas de follicule palpable		X0/XX/ XXX/XXX/ XXX/XY/ XXYY (205 lymphocytes au total) XX/XXX (44 fibroblastes au total)	Klunder	1990	142
Trotteur		Vulve normale Apparence femelle normale		Non renseigné	Pas d'oestrus	Petits ovaires		X0/XX/ XXX/XXX/ XXX/XY/ XXYY	Klunder	1990	142
Quarter Horse		Vulve normale Apparence femelle normale		Utérus et cervix flasques	Pas de cycle	Petits ovaires (<20 mm)		X0/XY (8 cellules X0 et 24 cellules XY)	Hughes	1977	123
Trotter	14 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Vagin pâle Cervix flasque		Petits ovaires		X0/XY (10 : 40)	Stewart-Scott	1990	256

Pur sang	15 ans	femelle normale Vulve normale Apparence femelle normale		Petit utérus Vagin et cervix normaux Utérus normal	Cycles réguliers depuis des années. Jamais de follicule produit	Ovaires très petits (<2x 1 cm) Tissu fibreux. Pas d'ovocytes	XX/XX+fragment 45 cellules XX et 2 cellules à 65 chromosomes	Chandley	1975	53
Pur sang		Vulve normale Apparence femelle normale		Utérus infantile	Pas d'oestrus	Petits ovaires	XX/XY	Klunder	1990	142
Trotteur		Vulve normale Apparence femelle normale		Non renseigné		Petits ovaires	XX/XY	Klunder	1990	142
Jument	5 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Petit utérus (biopsie: RAS)	Pas d'oestrus en 1976, mais une gestation en 1975 (→ pouliche XX, normale)	Ovaires de petite taille (2x2 cm)	XY 100 cellules observées dans le sang. Peau: que des cellules XY Présence d'antigène H-Y	Sharp	1980	245
3 juments		Vulve normale Apparence femelle normale		Vagin et utérus normaux Cervix flasque	4 femelles issues des mêmes parents et 7 nièces présentent les mêmes anomalies	Petits ovaires infantiles	XY	Kent	1986	139
Trotteur	5 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Utérus (biopsie de l'endomètre : glandes atrophiques)	Bonne carrière en course Oestrus, 2 IA mais pas de gestation	Petits ovaires Pas de follicules Gonades fibreuses	XY SRY négatif	Mäkinen	1999	171
Pur-sang		Vulve normale Apparence femelle normale		Appareil génital a priori normal	Pas d'oestrus	2 ovaires	XY SRY négatif	Abe	1999	1

Pur sang	8 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Vagin et cervix normaux Utérus petit	Pas de cycles	Ovaires très petits (<2 x 1 cm)	XY SR (37 cellules)	Chandley	1975	53
Poney		Vulve normale Apparence femelle normale		Utérus et cervix mous à la palpation	Pas de cycles	Ovaires très petits (<1 cm) lisses et fermes Pas de follicule palpable	XY SR (46 cellules dont 31 à 64XY)	Hughes	1977	123
Poney Shetland		Vulve normale Apparence femelle normale		Petit utérus Cervix flasque	Pas de comportement mâle	Petits ovaires (10 x 5 x 3 mm) palpables	XY SR	Trommershausen-Smith	1979	272
Selle Français	6 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Dérivés des canaux de Müller normaux	Comportement normal Très bonne carrière en course Cycles probablement réguliers	Ovaires très petits	XY SR	Cribiu	1984	64
Selle Français	13 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Dérivés des canaux de Müller normaux	Agressivité envers les chevaux et l'homme Très bonne carrière en course Cycles probablement réguliers	Ovaires non palpables	XY SR	Cribiu	1984	64
Pur sang Américain	6 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Dérivés des canaux de Müller normaux	Pas d'oestrus Taux de progestérone et de testotérone bas Bonne carrière en course	Petits ovaires (1.5 cm x 1.2 cm) inactifs Pas de follicule détecté	XY SR 200 cellules (lymphocytes + fibroblastes)	Power	1986	220
Arabe	5 ans	Vulve normale Apparence femelle normale		Petit utérus Cervix flasque	Issue d'une gestation gémeulaire hétérosexuée Pas de chimérisme leucocytaire observé	Petits ovaires	XY SR ?	Trommershausen-Smith	1979	272

ANNEXE 9 :MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel et méthodes utilisés pour l'étude cytogénétique des cas

La Cytogénétique repose sur l'étude des chromosomes. Ceux-ci sont obtenus à partir de cultures cellulaires.

On développera ici les techniques utilisées au Laboratoire de Cytogénétique des Populations Animales UMR INRA-ENVT.

I.1.1. Cultures de lymphocytes

Les cultures de lymphocytes sont réalisées en première intention, pour le diagnostic de routine, car elles sont faciles à mettre en œuvre, et donnent des résultats rapidement. Ces cultures utilisent du sang total (Dutrillaux (79)).

On réalise des prélèvements de sang veineux dans des conditions d'asepsie rigoureuse afin de ne pas avoir de contamination par les germes de la flore saprophyte de la peau ou de la flore fécale.

Le sang est récolté dans des vacutainers stériles contenant un mélange anticoagulant d'Héparine-Sodium ou Héparine-Lithium.

Le sang doit être acheminé au Laboratoire dans les plus brefs délais (on ne met pas en culture du sang prélevé plus de 48h auparavant, sinon, les cellules ne réagissent pas en présence de l'agent mitogène). Les tubes de sang ne doivent pas être mis en contact avec de la glace ni laissés au réfrigérateur (le froid inhibe la culture cellulaire). Ils doivent rester à température ambiante, vers 20°C.

Lors de la mise en culture, le sang ne doit pas être hémolysé.

I.1.1.a. Mise en culture des lymphocytes

Les cultures sont réalisées sous le cône stérile du bec bunsen ou sous la hotte à flux vertical pour éviter les contaminations (figure 45).

Dans un tube de culture à fond conique de 50 ml fermant avec un bouchon (tubes Falcon) on dépose:

10 ml de milieu de culture (milieu additionné de sérum, de L-glutamine et de 0,1 ml mélange antibiotique-antifongique) (mélange antibiotique utilisé : 5 unités/ml de pénicilline + 5 µg/ml de streptomycine+ 125µl/ml d'amphotéricine B)

50 µl (250 unités) d'héparine

l'agent mitogène choisi pour la culture

1000 µl de sang total prélevé sur Héparinate de Sodium (10 UI/ml)

Les protocoles utilisés pour les cultures de lymphocytes en fonction des espèces sont résumés dans le tableau ci-dessous.

	Milieu de culture	Sérum	Héparine	Agent mitogène	Sang
Cheval	RPMI 1640 modifié avec le sérum de veau : 10 ml	Sérum foetal de veau (100ml dans 500ml de RPMI 1640)	50 µl	Concanavaline A 0,3 ml	1 ml
	<i>TC 199 GIBCO 8 ml</i>	<i>Plasma de cheval 2 ml</i>	<i>50 µl</i>	<i>Pokeweed 0,2 ml</i>	<i>1 ml</i>
	<i>RPMI 1640 modifié avec le sérum de veau : 10 ml</i>	<i>Sérum foetal de veau (100ml dans 500ml de RPMI)</i>	<i>50 µl</i>	<i>Pokeweed 0,2 ml</i>	<i>1 ml</i>
Chien	TC 199 GIBCO 8 ml	Sérum de porc 2 ml	50 µl	Pokeweed 0,2 ml	1 ml
	<i>RPMI 1640 modifié avec le sérum de veau : 10 ml</i>	<i>Sérum foetal de veau (100ml dans 500ml de RPMI)</i>	<i>50 µl</i>	<i>Concanavaline A 0,3 ml</i>	<i>1 ml</i>
	<i>RPMI 1640 modifié avec le sérum de veau : 10 ml</i>	<i>Sérum foetal de veau (100ml dans 500ml de RPMI)</i>	<i>50 µl</i>	<i>Pokeweed 0,2 ml</i>	<i>1 ml</i>

NB: En italique et en gras: protocoles les mieux adaptés à la culture des lymphocytes d'une espèce animale donnée.

Les agents mitogènes utilisés sont des lectines (glycoprotéines végétales : la Concanavaline A est extraite de la Fève de Jack, le Pokeweed Mitogène provient du Raisin d'Amérique).

Ces substances se fixent de façon spécifique aux oligosaccharides du complexe CD3 des lymphocytes T. Le CD3 permet la transduction du signal mitogène après interaction du récepteur TCR du lymphocyte T avec l'Ag. Il y a augmentation des transports membranaires (notamment de glucose). La glycolyse est accrue, de même que les biosynthèses d'acides gras. On observe une hausse des synthèses d'ADN, d'ARN et des protéines.

Cependant, Pokeweed Mitogène et Concanavaline A ne stimulent pas les mêmes populations de lymphocytes. La Concanavaline A favorise la prolifération des lymphocytes T, le Pokeweed Mitogène permet surtout la croissance des Lymphocytes B et de certaines populations de T (Dutrillaux, (79)).

I.1.1.b. Traitement des cultures de sang

I.1.1.b.1. Arrêt des divisions cellulaires

Les cultures sont traitées avec de la colchicine à 3,75 µg/ml stérile qui bloque les mitoses : la colchicine inhibe la formation du fuseau achromatique où se fixent les chromosomes lors de l'anaphase; les chromosomes ne pouvant se séparer, les cellules sont bloquées en métaphase.

Dans chaque tube de culture, on met 250 µl de colchicine qu'on laisse agir 2 h à 37°C.

I.1.1.b.2. Choc hypotonique

Le choc hypotonique est un choc osmotique consistant à faire éclater les cellules par une entrée d'eau. Ceci permet de libérer les chromosomes par rupture de la membrane cellulaire.

Le tube de culture est centrifugé à 1500 t/mn pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé à l'aide d'un système d'aspiration à vide; et on en laisse 2 à 3 mm au-dessus du culot de cellules.

Le choc hypotonique est réalisé avec du sérum de veau nouveau-né dilué au 1/6^e et à 37°C : après avoir décollé le culot de cellules à l'aide du vortex, on ajoute dans le tube 15 ml de sérum.

Les cultures restent au contact du choc 20 minutes dans l'étuve à 37°C. les tubes sont alors centrifugés à 2000 t/mn pendant 10 minutes, en présence de 4-5 gouttes (environ 100 µl) de fixateur. Cette étape constitue la préfixation. Elle permet une fixation plus lente et moins dénaturante des cellules.

I.1.1.b.3. Fixation

Cette étape du traitement recouvre différents objectifs :

- la fixation permet d'immobiliser les cellules dans un état proche du vivant
- elle bloque les réactions enzymatiques cellulaires et de ce fait inhibe les phénomènes d'autolyse
- la fixation est responsable d'une coagulation des protéines et de l'insolubilisation des constituants cellulaires par réticulation des macromolécules ; il y a stabilisation in situ des molécules.

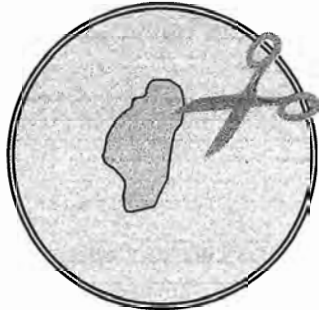
Pour fixer les cultures cellulaires on utilise un mélange acide acétique absolu-éthanol absolu (1:3), préparé de façon extemporanée

La fixation des cellules est obtenue en ajoutant 15 ml de fixateur dans le tube de culture. Les cellules doivent avoir un contact avec le fixateur pendant au moins demi-heure, à (+4°C).

Les cultures ainsi fixées peuvent être conservées plusieurs mois en vue d'un étalement sur lame.

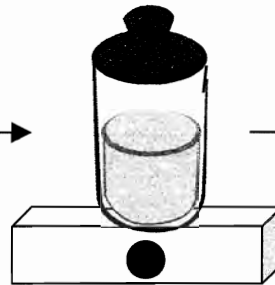
Dilacération du morceau de peau en présence d'enzymes

5 ml du mélange trypsine stérile à 0.25% collagénase à 0.2%



Digestion enzymatique

50 ml du mélange trypsine collagénase (agitation magnétique)



étuve à 37°C pendant 20 mn

Récupération du surnageant, arrêt de la digestion

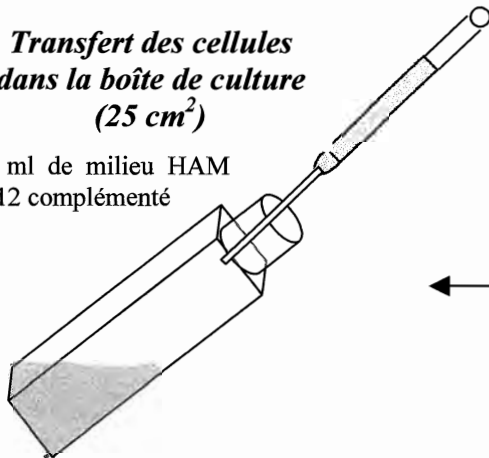
(tube à centrifugation avec 1ml de sérum de veau fœtal)



Faire en tout 4 à 5 digestions et récoltes

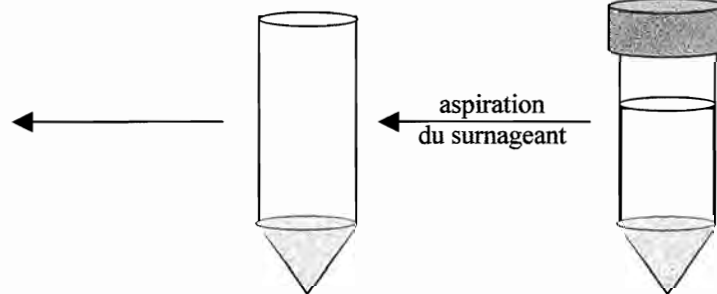
Transfert des cellules dans la boîte de culture (25 cm²)

5 ml de milieu HAM F12 complété



Mise en suspension du culot dans 1 ml de milieu de culture

1000 tr/mn, 5 mn



étuve à 37°C bouchon fermé

Observation quotidienne de la culture, changement du milieu et si besoin récolte ou division de la boîte

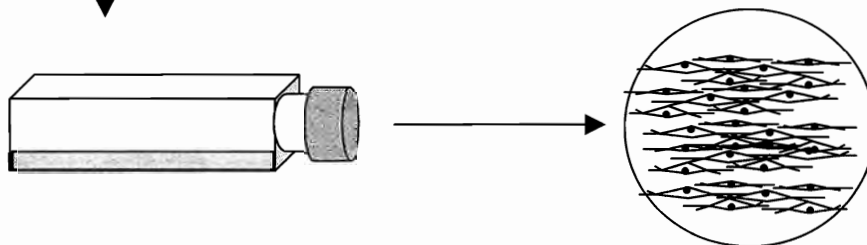


Figure 57 : Culture de fibroblastes (méthode de digestion enzymatique)

I.1.2. Cultures cellulaires de fibroblastes

I.1.2.a. Mise en culture des fibroblastes : cultures primaires

La réalisation de ces cultures est longue et plus complexe que celle des cultures de lymphocytes; elle nécessite, en outre, plus de matériel.

Pour ces différentes raisons, les fibroblastes ne sont étudiés que pour confirmer ou infirmer la présence d'une mosaïque; en effet, si on repère différentes populations cellulaires à partir des cultures de lymphocytes, et si elles se retrouvent dans les cultures de fibroblastes, on peut conclure à une mosaïque. En revanche, si les cultures de fibroblastes ne permettent la mise en évidence que d'une seule population de cellules, on parle de chimérisme leucocytaire.

Les cultures de fibroblastes se font avec du tissu conjonctif sous cutané, obtenu par biopsie selon 2 méthodes (dilacération des tissus puis digestion enzymatique ou bien méthode des explants) (Adolphe, (3)).

I.1.2.a.1. Méthode de la digestion enzymatique

et Prélèvement de l'échantillon

Un fragment de peau est prélevé dans des conditions d'asepsie chirurgicale. L'animal reçoit une anesthésie locale traçante à la Xylocaïne. Une côte de melon (1-2 cm de long) est découpée dans la peau à l'aide d'un scalpel stérile. Le morceau est ensuite plongé dans du milieu de culture HAM (F12). Il est possible de faire un rinçage dans du milieu propre si l'échantillon est trop souillé par du sang, ou par du gras sous-cutané.

et Mise en culture proprement dite

Pour faire les cultures, il convient de travailler sous la hotte à flux vertical dans une ambiance stérile. L'ensemble du matériel utilisé est stérilisé, en atmosphère sèche, au Poupinel (1h30 à 180 °C).

Les milieux servant à la réalisation des cultures cellulaires devront être conservés au réfrigérateur (+4°C) et utilisés rapidement.

Le morceau de peau est déposé dans une grande boîte de Pétri, contenant 5 ml d'un mélange trypsine-collagénase (0,025% : 0,25%) à 37°C ; il est dilacéré avec une lame de scalpel stérile puis le broyage est poursuivi avec des ciseaux stériles.

Le broyat est transféré dans un flacon stérile de 100 ml contenant un barreau aimanté. On ajoute alors 50 ml d'enzymes protéolytiques : le flacon est mis sur un agitateur magnétique dans l'étuve à 37°C pendant 20 minutes pour détruire le milieu extracellulaire. Le surnageant est récupéré et versé dans un tube de culture stérile, contenant 1 ml de sérum de veau fœtal pour stopper l'action des enzymes. Ces opérations sont renouvelées 4 à 5 fois afin de digérer toute la peau.

Le produit de la digestion est centrifugé à 5 minutes à 1000 tours/min. Après élimination du surnageant. Le culot est mis en culture dans 5 ml de milieu HAM modifié avec du sérum fœtal de veau. La culture se fait dans un flacon de 25 cm³

Milieu de culture HAM F12 complétement:

400ml de HAM F12
80 ml de sérum de veau fœtal
5 ml d'antibiotique antifongique (pénicilline à 5UI/ml + streptomycine à 5µg/ml + amphotéricine B à 125µg/ml + gentamicine à 50µg/ml)
5 ml de L-glutamine de façon à avoir une concentration finale de 1%

Le flacon est placé dans l'étuve à 37°C, le bouchon fermé.

Le lendemain, les cellules mortes et les bouts de peau non digérés sont éliminés par aspiration du milieu. Du milieu neuf (5 ml) est remis dans le flacon qu'on replace dans l'étuve, en maintenant les bouchons fermés.

et Maintien des cultures cellulaires et adaptation du milieu en fonction de l'âge de la culture

Le milieu de culture est changé tous les jours permettant ainsi d'éliminer les cellules mortes ainsi que les cellules épithéliales qui n'ont pas adhéré à la boîte.

Les cellules se divisent plus ou moins rapidement en fonction de leur vigueur et du milieu de culture.

Les boîtes sont divisées et chaque repiquage, correspondant à un passage, permet de passer à des flacons de culture plus grands.

Ces étapes sont nécessaires dans la mesure où les cellules ne supportent pas bien la surpopulation du fait de l'inhibition de contact et de l'épuisement du milieu. Les nouvelles boîtes sont préparées sous la hotte à flux vertical afin de recevoir les cellules (par exemple : boîtes de 75 cm² + 10 ml de milieu additionné de sérum fœtal de veau).

Dans la boîte d'origine, le milieu de culture est aspiré. Le tapis cellulaire est rincé 2 fois pour enlever les restes de milieu avec de la trypsine à 0,05% mélangée à de l'EDTA à 0,02% dans du PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ (mélange plus agressif que la trypsine pure à 0,25%) : on dépose 1 à 2 ml d'enzyme que l'on fait glisser sur toute la surface du tapis de cellules. L'enzyme est aspirée rapidement et éliminée; après le deuxième rinçage, 2 ml de trypsine-EDTA sont mis dans la boîte que l'on maintient horizontalement pour laisser agir l'enzyme et décoller les cellules du tapis (on peut aider la trypsine en tapant sur la boîte). La trypsine permet l'hydrolyse des éléments d'adhésion des cellules au support et des cellules entre elles. Les cellules en suspension se resserrent. Si les cellules se décollent mal, la boîte est mise dans l'étuve pendant 2 minutes (la température optimale pour la trypsine est 37 °C). L'action de la trypsine est arrêtée par une pipette pasteur de milieu de culture, puis l'ensemble du surnageant est transféré dans 10ml de milieu neuf et centrifugé 5 min. à 1000 t/min. Ce lavage permet d'enlever la trypsine. Le surnageant est éliminé ; et le culot de cellules est remis en suspension dans un peu de milieu de culture puis réparti dans 2 nouvelles boîtes.

Chaque nouvelle culture est identifiée (animal, date, numéro du passage et type de milieu) et mise à l'étuve.

Après le deuxième passage, on peut maintenir les cultures dans un milieu moins riche, le DMEM. Le changement de milieu est progressif : les fibroblastes sont placés dans un mélange de HAM F12 et de DMEM (1:1). A ce moment, les boîtes sont maintenues à l'étuve à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ pour faciliter les échanges avec le milieu (pour avoir

ce système semi-clos, il faut dévisser un peu le bouchon des flacons de culture quand on les met dans l'étuve).

Milieu de culture DMEM:

500ml de « Dulbecco's modified Minimum Essential Medium » (DMEM).
100 ml de sérum de veau fœtal
5 ml d'antibiotique (cf. Milieu HAM F12)
5 ml de L-glutamine

Lorsque les cellules se sont adaptées, seul le DMEM est utilisé. On maintient toujours une atmosphère à 5% de CO₂ ce qui permet de réguler le pH.

Il faut changer le milieu régulièrement en associant une surveillance quotidienne des cultures ; en effet le milieu s'épuise vite en éléments nutritifs. Ce changement permet en outre d'éliminer les cellules qui ont dégénéré ou qui sont mortes. L'apport de milieu frais assure la prolifération des cellules en renouvelant l'apport de facteurs de croissance.

I.1.2.a.2. Méthode des explants

Cette méthode est réalisée parallèlement à la digestion enzymatique au cas où cette dernière ne donnerait pas de résultat.

Le morceau de peau biopsiée est déposé dans 5 ml de milieu HAM dans une boîte de Pétri. La peau est découpée en petits fragments à l'aide d'un scalpel stérile.

Dans une boîte de 25 cm², on dépose une fine couche de sérum fœtal de veau (1 ml pour une boîte de 25 cm²) ; la boîte est remise à la verticale pour faire "sécher" le sérum. A l'aide d'une pipette Pasteur cotonnée, chaque petit bout de peau est posé sur le sérum de veau (l'adhérence des bouts de peau est obtenue en laissant la boîte verticale dans l'étuve à 37°C pendant 15 minutes). On rajoute ensuite 1.5 ml de HAM F12. La boîte de culture est placée dans l'étuve à 37°C, le bouchon étant maintenu fermé. Le milieu est changé une à deux fois par semaine.

Les fibroblastes se divisent et forment un tapis cellulaire autour de l'explant.

La première méthode permet de récupérer des chromosomes dès 10 jours. Par la deuxième, les cellules mettent plus de temps à pousser. Les cultures de fibroblastes donnent des chromosomes plus fragiles surtout lors de la coloration, mais ils sont plus étirés.

Il faut surveiller les cultures tous les jours, pour changer le milieu, vérifier l'état des cellules, voir si aucune contamination ne se développe (cf. bactéries, champignons, levures).

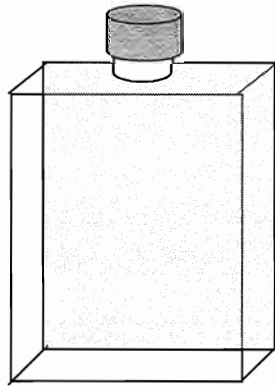
I.1.2.b. Morphologie des fibroblastes en culture

Les fibroblastes sont mêlés aux autres cellules de la peau (cellules épithéliales de forme polygonale, entre autre).

Les cellules se déposent sur le fond de la boîte de culture. Au fil des mitoses, les cellules autres que les fibroblastes dégèrent. Les fibroblastes forment un tapis de cellules en étoile.

Préparation de la boîte

dépôt d'un film de 1 ml de milieu de culture HAM F12 avec du sérum de veau fœtal, antifongique L-glutamine et antibiotiques



Laisser sécher verticalement
10 à 15 min sous la hotte ou à 37°C

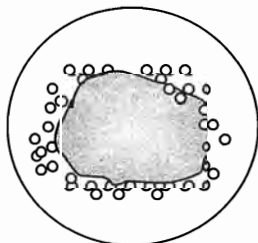
Culture proprement dite des explants

1 à 2 ml de milieu HAM F12 déposé doucement

étuve à 37°C bouchon fermé



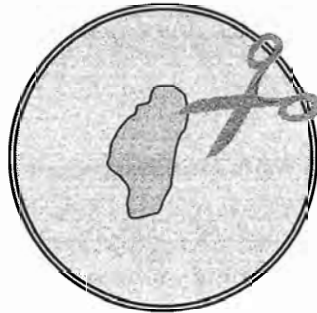
Observation de la boîte une à deux fois par semaine, changement du milieu



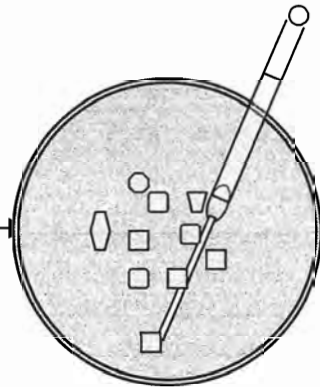
En une semaine

Fragmentation de la peau en carrés de 2-4 mm²

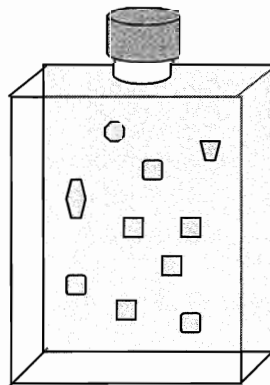
dans 5 ml de HAM F12 stérile



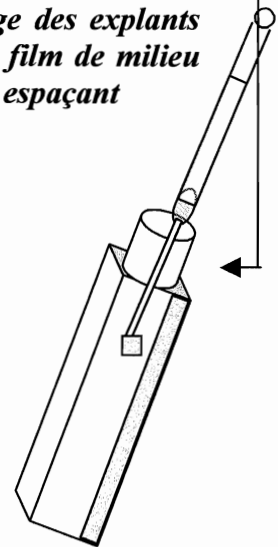
Récolte des fragments de peau avec une pipette



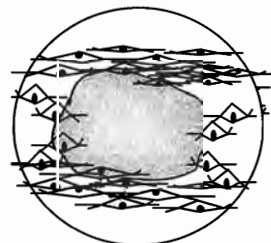
Fixation des explants sur la boîte verticale pendant 10-15 min



Collage des explants sur le film de milieu en les espaçant



Enlever l'explant et traiter comme une culture après digestion enzymatique



En 15 jours à 1 mois

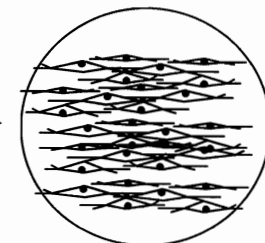


Figure 58 : Culture de fibroblastes (méthode des explants)

I.1.2.c. Conservation des cultures de fibroblastes

I.1.2.c.1. Cryopréservation des cultures de fibroblastes (Adolphe, 1986)

et Etapes préalables: détachement des fibroblastes

Sous la hotte, il convient de préparer des tubes à centrifugation, stériles et contenant 10 ml de milieu de culture. Les cellules sont décollées avec de la trypsine à 0,05% mélangée à de l'EDTA à 0,02% dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} . L'action des enzymes est bloquée par 2 ml de milieu de culture. Afin de récolter le maximum de cellules, une petite raclette est utilisée si nécessaire. Le contenu de la boîte de culture est versé dans les tubes de collecte. Ces derniers sont centrifugés à 1200g pendant 5 minutes pour éliminer les traces de trypsine.

et Protocole de congélation des fibroblastes

Du sérum de veau foetal est mélangé à du glycérol stérile de façon à avoir une solution à 10% (9 ml de sérum et 1 ml de glycérol stérile).

Le glycérol est un agent cryoprotecteur qui permet de limiter les lésions cellulaires engendrées par la congélation. Le glycérol évite la formation de gros cristaux, traumatisants pour les cellules; de plus, il diminue le phénomène de déshydratation intracellulaire lors de la congélation. On peut aussi utiliser le DMSO (diméthyl sulfoxyde), plus protecteur que le glycérol, mais plus cytotoxique.

Après la centrifugation, tout le surnageant est aspiré. Le culot de cellules est remis en suspension dans une pipette Pasteur du mélange sérum-glycérol. Il faut aller vite car les cellules tolèrent mal le séjour dans le glycérol à température ambiante. Le culot de cellules est mis dans un cryotube. Ce dernier doit être bien fermé et identifié (numéro de l'animal, espèce, date, milieu de culture et numéro du passage). Les cryotubes sont rangés dans une boîte à congélation contenant du propane-1-2 diol qui permet d'abaisser graduellement la température (1 degré par minute).

La boîte est congelée à -80°C une nuit à 48h au maximum.

Les cryotubes sont ensuite sortis de la boîte à congélation et placés dans l'azote liquide à -180°C .

Cette méthode permet de stocker des cellules pendant plusieurs années. La viabilité des cellules lors de la congélation conditionne l'efficacité de ce procédé de conservation.

I.1.2.c.2. Congélation des explants

Les explants sont décollés du support ; dans un cryotube correctement identifié, on met 2 ml de mélange glycérol-sérum de veau nouveau-né (voir ante). Les explants sont prélevés avec une pipette Pasteur cotonnée, en prenant le moins de milieu possible et déposés dans le tube. La congélation suit ensuite le même protocole que celle des fibroblastes.

I.1.2.d. Décongélation de lignées cellulaires

Afin d'avoir une meilleure survie des cellules, la décongélation doit être rapide.

Les cryotubes sont sortis de l'azote liquide ; ils sont plongés dans un bain-marie à 37°C jusqu'à la décongélation complète. Pendant ce temps, sous la hotte, un tube à centrifu-

gation contenant 10 ml de milieu de culture est préparé. Le contenu du cryotube est prélevé et mélangé au milieu de culture prévu à cet effet. Le tube est centrifugé à 1500g pendant 10 minutes afin d'enlever le glycérol.

Une boîte de culture (de 25 cm²) contenant 5 ml de milieu de culture est préparée sous la hotte.

Tout le surnageant est aspiré et éliminé, le culot de centrifugation est remis en suspension dans un peu de milieu de culture, puis déposé dans la boîte de culture. La boîte est mise à l'étuve à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Le milieu de culture doit être changé au plus tard 24 h après la décongélation. Il convient alors de s'assurer que les cellules adhèrent au support.

I.1.2.e. Utilisation des cultures de fibroblastes pour l'obtention de chromosomes

I.1.2.e.1. Synchronisation des cultures de fibroblastes: synchronisation simple par la thymidine

Après avoir changé le milieu ou trypsiné les boîtes on peut faire une synchronisation avec de la thymidine : elle bloque les mitoses en phase S (Popescu, (217)). La thymidine inhibe la synthèse de 2'-déoxycytidine triphosphate (dCTP); en effet, elle rentre dans la cellule et forme la désoxythymidine triphosphate (dTTP). Cette molécule inhibe l'enzyme qui transforme le désoxycytidine diphosphate (dCDP) en dCTP. La synthèse d'ADN est arrêtée par manque de dCTP.

On lève le blocage et dans les heures qui suivent, le cycle cellulaire reprend; on peut récolter un grand nombre de cellules en métaphase.

et Préparation de la thymidine

10 mg de thymidine sont dissous dans 1 ml de milieu de culture. La solution est filtrée à 0,22 µm pour avoir une solution stérile. (*NB pour les lymphocytes on met 6 mg de thymidine par ml de milieu*)

et Synchronisation des cultures

On rajoute 5 ml de milieu de culture dans les boîtes. La synchronisation est réalisée quelques heures après la trypsination des cellules par ajout de 1.2 ml de thymidine pour 15 ml de milieu. Les boîtes sont laissées à l'étuve une nuit (15 h).

Pour lever le blocage, la thymidine est éliminée. Pour cela, le milieu est aspiré et remplacé par 10 ml de HBSS (solution saline isotonique). La boîte est remise à l'étuve 10 minutes. Cette manipulation est encore répétée 2 fois (3 rinçages au total). Après le dernier rinçage, la boîte est complétée avec 10 ml de milieu de culture et replacée dans l'étuve.

Les cultures sont suivies régulièrement (toutes les demi-heures, ou toutes les heures) pour voir si elles se divisent. Lors d'une vague de division, on effectue la récolte.

On peut ajouter aux boîtes synchronisées du BrdU (5 Bromodéoxyuridine analogue de la thymidine) à raison de 50µl pour 15 ml de milieu de culture. Le BrdU permet de faire des colorations en bandes RBG (Reverse Budr Giemsa).

La technique de la synchronisation n'a été utilisée que pour l'étude du caryotype du cheval E9303 (X0/XY).

I.1.2.e.2. Récolte des fibroblastes en nature

Les cellules en mitose apparaissent rondes et réfringentes lors de l'observation au microscope inversé.

Un tube à centrifugation stérile est placé sous la hotte; il servira à recueillir le milieu et les cellules. Ces dernières sont détachées du tapis cellulaire en tapant sur les boîtes de culture (les cellules en culture ont la propriété de n'être que modérément adhérentes à la boîte) ; le milieu est versé dans le tube à centrifugation. Afin d'augmenter le rendement de la récolte, on réalise 2 rinçages des boîtes avec de la trypsine à 0,05% mélangée à de l'EDTA à 0,02%; pour cela on fait glisser 1.2 ml de trypsine-EDTA sur le fond de la boîte et on les réaspire de suite pour les verser dans le tube de récolte. La trypsine est utilisée une dernière fois pour finir de détacher les cellules entrées en mitose: on met 2 ml d'enzyme dans la boîte et la laisse agir 2-3 minutes. Du milieu neuf est remis dans la boîte de culture.

La récolte peut se faire sans trypsiner les cellules si on craint de trop détériorer le tapis cellulaire. A ce moment, on tape plusieurs fois sur les boîtes de culture pour détacher les cellules en division.

Le tube de récolte est placé au réfrigérateur pour ralentir la pousse des cellules (le tube ne doit pas être conservé sans traitement plus d'une heure) ou bien centrifugé de suite 5 minutes à 1000g pour faire le traitement (choc hypotonique puis fixation comme pour des cultures de lymphocytes)

I.1.3. Etalement sur lame

I.1.3.a. Etapes préalables

Les tubes de culture sont centrifugés à 1500 t/mn pendant 10 minutes; le milieu (fixateur) est aspiré; on ne laisse que 2-3 mm de fixateur au-dessus du culot de cellules.

Pour les cultures de lymphocytes, on fait 2 lavages au fixateur. La première centrifugation correspond au 1^{er} lavage. On remet le culot en suspension dans 15 ml de fixateur neuf. Puis, les tubes sont centrifugés suivant les mêmes modalités que précédemment.

Les cultures de fibroblastes ne nécessitent souvent qu'un seul lavage.

Les étalements peuvent être réalisés de suite ou bien différés (dans ce cas, remettre les tubes au réfrigérateur).

I.1.3.b. Préparation des lames

Pour étaler les cultures, on utilise des lames rodées avec une plage dépolie et dégraisées.

Pour cette raison, les lames sont passées une à une sous l'eau déminéralisée ; il faut s'assurer qu'elles « tiennent le film d'eau ». Chaque lame est frottée entre le pouce et l'index, en insistant sur les bords pour que l'eau glisse bien sur toute la surface de la lame.

Les lames sont rangées dans un béccher ; à la fin du nettoyage, toutes les lames sont rincées 2 fois à l'eau déminéralisée. Puis le béccher est rempli d'eau déminéralisée et placé au freezer.

I.1.3.c. Réalisation des étalements

Les tubes de cultures sont centrifugés ; le fixateur est aspiré de sorte qu'il n'en reste que quelques mm au-dessus du culot. Les cellules sont alors remises en suspension dans le fixateur restant (si les cultures sont trop riches il faut parfois rajouter quelques gouttes de fixateur neuf).

L'étalement sur lame se fait suivant 2 méthodes.

I.1.3.c.1. Méthode du frottis

Les cellules en suspension sont prélevées avec la pipette Pasteur. Sur une lame bien mouillée, tenue à l'horizontale, on dispose une ligne de la suspension de cellules (sur toute la largeur de la lame, à 1 cm de la partie rodée). La lame est redressée doucement pour faire glisser les cellules (au besoin, on peut souffler sur la lame pour faire glisser la goutte) ; l'excès de liquide est absorbé en posant la tranche de la lame sur du papier absorbant. Le dessous de la lame est essuyé. La lame est passée 5 secondes au-dessus d'un bain-marie à 80°C. La lame est séchée au-dessus du cône du bec bunsen ou bien observée directement.

Un séchage rapide des lames évite que les chromosomes ne se resserrent.

La lame est identifiée et observée au microscope optique (Objectif x 10, contraste de phase).

Si les mitoses sont trop serrées, il faut rajouter une goutte (25 µl) de fixateur ou d'acide acétique avant le nouvel étalement ou bien adapter le temps de séjour au-dessus du bain-marie.

Le fixateur permet de diluer la culture (cf. métaphases trop nombreuses)

L'acide acétique permet d'étaler les chromosomes d'une même métaphase, il ne faut pas trop en mettre sinon on perd des chromosomes.

L'éthanol seul sèche les lames et provoque un resserrement des chromosomes.

Exemple : culture de fibroblastes de chien : ajouter une goutte (25 µl) de fixateur, ne pas passer forcément au-dessus du bain-marie.

cultures de lymphocytes de cheval : essayer d'étaler sans mettre d'acide

I.1.3.c.2. Méthode de la goutte

La lame est tenue bien horizontale à 20-25 cm de la pipette Pasteur, on laisse tomber 2 gouttes dessus en évitant de faire remonter l'eau sur la lame. L'excès de liquide est absorbé en posant la tranche de la lame sur du papier absorbant. Le dessous de la lame est essuyé. La lame est passée 5 secondes au-dessus du bain-marie à 80°C puis séchée au-dessus du cône du bec bunsen.

Les lames peuvent alors être colorées en coloration conventionnelle. Par contre, avant d'être colorées en bandes, les lames sont vieillies une nuit à l'étuve à 60°C ce qui équivaut à un vieillissement d'une semaine à température ambiante.

I.1.4. Coloration des lames

L'observation des lames sans coloration est possible au microscope optique (Objectif x10, oculaire x1, contraste de phase). Elle est insuffisante pour faire une étude cytogénétique.

On peut colorer la totalité du chromosome (coloration conventionnelle) ou bien chercher à différencier les différents chromosomes et faire une analyse plus fine des chromatides en utilisant la coloration en bandes.

I.1.4.a. Coloration conventionnelle des lames

C'était la méthode de coloration de base avant la découverte des colorations en bandes. Elle permet une étude du chromosome dans son ensemble. Les caryotypes réalisés par la suite ne tiennent compte que de la morphologie du chromosome. Il apparaît uniformément coloré ; l'hétérochromatine du centromère prend moins le colorant.

La coloration conventionnelle est une coloration au Giemsa. Ce colorant est aussi utilisé pour la coloration des lames qui ont subi un traitement (cf. coloration en bande C).

Colorant Giemsa pour la coloration conventionnelle :

10 ml de Giemsa RAL
100 ml d'eau distillée

Le colorant ainsi préparé est instable et ne peut être conservé que quelques heures.

Les lames sont trempées dans la solution colorante pendant une dizaine de minutes. Elles sont rapidement rincées 3 fois à l'eau courante puis une fois à l'eau distillée. On les laisse sécher à l'air.

La coloration conventionnelle a été effectuée sur les lames concernant les chiens afin de réaliser un comptage des chromosomes sexuels des différentes métaphases, et de détecter d'éventuelles anomalies.

I.1.4.b. Coloration en bandes

La coloration en bandes permet une étude plus fine des chromosomes. Les bras p et q sont divisés en régions elles-mêmes divisées en bandes. Les bandes sont colorées en fonction de leur composition en bases. Ces marquages sont reproductibles et caractéristiques d'une espèce animale donnée; ils permettent de réaliser les caryotypes.

Le banding est utilisé pour mettre en évidence des modifications chromosomiques, pour comparer des chromosomes dans des espèces différentes.

Les différentes techniques de coloration permettent essentiellement de mettre en valeur 2 structures chromosomiques. La première d'entre elles, l'euchromatine, correspondant aux zones transcrites de l'ADN, est colorée en bandes G (pour Giemsa) ou bien en bandes R (de Reverse, les bandes obtenues par cette méthode étant le contretype des bandes G) ou Q (de Quinacrine, les chromosomes étant colorés à la moutarde de Quinacrine).

L'hétérochromatine constitutive, quant à elle, est colorée en bandes C.

Au Laboratoire de cytogénétique des Populations Animales, seules sont utilisées les colorations en bandes C et G.

I.1.4.b.1. Coloration des lames en bandes GTG

Dérivée de la méthode de Seabright (1971) cité par Dutrillaux, (79).

La coloration en bandes GTG (G Trypsin Giemsa) permet de mettre en valeur les zones riches en bases A et T (zones de chromatine condensée, l'hétérochromatine intercalaire qui se réplique tardivement, fragment du chromosome portant peu de gènes) ; ces régions apparaissent colorées en noir ou dans des nuances de gris. Le centromère et les constriction secondaires ne sont pas colorés : ils apparaissent blancs.

Cette technique permet d'apparier les chromosomes suivant leur profil en bandes, on peut ainsi établir le caryotype. Une telle coloration permet de repérer des modifications des profils standards qui peuvent être liées à des anomalies de structure (délétion, translocation, inversion, duplication).

La coloration en bandes G nécessite une digestion enzymatique, par la trypsine, des protéines chromosomiques qui gênent la coloration de l'ADN par le Giemsa. Le Giemsa ne colore que les zones non attaquées par l'enzyme (zones où la chromatine est condensée). Cette méthode repose sur l'obtention de culture de bonne qualité : il faut des chromosomes suffisamment longs. Les lames doivent être vieillies à l'étuve pour modérer l'action de la trypsine; le temps d'incubation dans la solution enzymatique doit être adapté au cas par cas, en fonction de l'espèce et de l'animal.

et Préparation de la trypsine (solution à 0,25%)

La solution de trypsine est préparée extemporanément dans l'heure qui précède son utilisation; c'est une solution instable.

Solution de trypsine :

0,1 g de trypsine
100 ml de tampon PBS
6 gouttes (150 µl) d'acide citrique à 0,1 Mol.

La solution est maintenue à température ambiante afin d'être à 20°C lors de son utilisation

Après avoir été trempées dans la trypsine, les lames seront rincées dans un flacon contenant du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline).

et Préparation du colorant pour réaliser les bandes G

Le colorant doit également être préparé extemporanément. Il se conserve quelques heures à température ambiante.

Colorant Giemsa :

90 ml d'eau distillée
3 ml de colorant Giemsa MERCK
3 ml de méthanol absolu
3 ml d'acide citrique à 0.1 Mol

L'ordre est important.

Le mélange est préparé dans un bécher placé sur un agitateur magnétique.

Après avoir étalonné le pH mètre (avec les solutions tampon de 7,02 et 4,00 par exemple) il convient de vérifier le pH de la solution de Giemsa : il doit être entre 2 et 3.

Le pH est alors corrigé avec du Phosphate disodique (Na_2HPO_4 à 17,9g/250 ml) pour obtenir une solution de pH = 6,8.

et Coloration des lames

Les lames sont trempées dans la trypsine, puis rincées dans le PBS. L'excès de tampon est éliminé en secouant vivement les lames.

Les lames sont trempées dans le colorant pendant 5 à 12 minutes.

Les temps de trempage et de coloration sont à adapter en fonction de l'espèce étudiée, au colorant et à la qualité des bandes que l'on veut obtenir (voir tableau ci-dessous).

	Trypsine	PBS	Colorant pour bandes G
Chien	1 min. à 1 min. 15	tremper	9 à 13 minutes
Cheval	1 min. 15	tremper	9 à 10 min.
Cheval (fibroblastes)	1 min. 10	tremper	9 minutes
Chien (fibroblastes)	1 min.	tremper	9 à 12 minutes

Ces valeurs sont données à titre d'exemple pour des lames récentes (moins d'une semaine, vieilles une nuit à l'étuve à 60°C)

Le temps d'incubation dans la trypsine est généralement compris entre 1 min. et 1min.

30.

Les bandes GTG ont été réalisées pour le chien et le cheval afin d'établir le caryotype. Elles n'ont pas servi au comptage de chromosomes sexuels.

Cette coloration en bandes GTG a été effectuée directement sur des lames après étalement, mais aussi sur des lames qui avaient été traitées en coloration conventionnelle au préalable. Dans ce cas, les lames sont décolorées dans le fixateur et le temps e trypsine est réduit.

I.1.4.b.2. Coloration des lames en bandes CBG

Dérivée de la technique de Comings (1973) et Summer (1972), cités par Dutrillaux, (79).

On colore ici l'hétérochromatine constitutive notamment localisée au niveau des centromères des chromosomes. Cette fraction de la chromatine reste condensée lors de l'interphase; elle contient des séquences hautement répétées d'ADN, riche en paire de bases AT et CG.

La coloration en bandes C correspond au stade ultime de la dégradation du chromosome à l'aide d'acides, de solutions alcalines et salines.

Le centromère apparaît intensément coloré en noir alors que les chromatides restent très pâles.

e Etapes préalables

La veille de la manipulation, une solution saturée de baryte (hydroxyde de baryum) est préparée dans un erlenmeyer contenant un barreau aimanté: 5 g de poudre d'hydroxyde de baryum sont mis en solution dans 100 ml d'eau pour préparation injectable. Le mélange est fait à l'aide de l'agitateur magnétique et doit tourner 1 h au minimum. La solution décante une nuit. Le matin de la coloration, la solution est filtrée et mise au bain-marie à 50°C.

Une solution 2x SSC (Standard Sodium Citrate) est préparée de façon extemporanée, dans l'heure qui précède son utilisation. On dilue 10 ml de 20xSSC (17.53 g de NaCl/100ml et 8.82 mg de citrate/100ml) dans 90 ml d'eau distillée. La solution de 2x SSC (NaCl 0,15 M et citrate trisodique 0,015 M) est mise au bain-marie à 60°C.

e Protocole de coloration des chromosomes en bandes C

Les chromosomes sont dénaturés dans une solution d'acide chlorhydrique 0,2 N (20 ml d'acide pur 1 N avec 80 ml d'eau pour préparation injectable) pendant 1 h à température ambiante.

Les lames sont rincées abondamment à l'eau courante puis trempées dans de l'eau pour préparation injectable.

Les lames incubent alors dans la baryte à 50°C pendant 2 minutes. Elles sont ensuite plongées dans de l'eau pour préparation injectable puis rincées abondamment à l'eau courante et trempées dans l'eau pour préparation injectable.

On met alors les lames dans le SSC pendant 20 minutes à 60°C.

Après un rinçage à l'eau pour préparation injectable, les lames sont colorées avec du Giemsa.

Colorant Giemsa pour les bandes C:

4 ml de Giemsa RAL
2 ml de tampon Phosphate Disodique
94 ml d'eau distillée

Le colorant ainsi préparé est instable et ne peut être conservé qu'une ou deux heures.

Le HCl dégrade les liaisons glycosidiques entre les bases puriques (Popescu, (217)).

L'hydroxyde de baryum fragmente l'ADN. Cette dénaturation n'affecte que l'euchromatine. L'hétérochromatine serait protégée par les protéines non-histones spécifiques.

Le temps d'incubation dans l'hydroxyde de baryum conditionne la qualité des bandes C: si les chromatides sont très colorées, on a un mauvais contraste en bandes C qui indique une durée insuffisante du traitement dans l'hydroxyde de baryum. A l'inverse, des chromosomes trop pâles, à peine marqués et visibles seulement au microscope à contraste de phase indiquent une dénaturation excessive par l'hydroxyde de baryum.

Les bandes C peuvent être obtenues sur des lames précédemment colorées en coloration conventionnelle; on suit directement le même protocole que pour des lames non colorées, sans décolorer les lames.

Les bandes C sont parfois réalisées sur des lames colorées en bandes G; ceci permet de confirmer, par exemple, la présence d'une translocation Robertsonienne suspectée lors du caryotypage (on peut voir les chromosomes dicentriques). Il faut alors adapter le temps d'incubation dans les différentes solutions, les chromosomes ayant déjà été en partie dénaturés par la trypsine.

Coloration en bandes C après des bandes G chez les Mammifères:

45 min. dans l'acide chlorhydrique à 0.2 N
rinçage
15 secondes dans la solution de Baryte saturée
rinçage
15 min. dans le SSC
rinçage
15 min. de coloration

La coloration en bandes C est très utilisée pour mettre en évidence les hétérosomes y compris le Y (le chromosome Y essentiellement formé d'hétérochromatine). Ceci est intéressant pour l'étude de l'intersexualité chez le cheval et le chien.

I.1.5. Particularités liées aux espèces étudiées : Remarques sur les études de lames

I.1.5.a. Cheval

Colorations utilisées pour l'étude d'un animal intersexué

Dans l'espèce équine, on se limite à l'utilisation de 2 techniques de coloration :

* Coloration en bandes G : le Y ressort bien grâce à sa coloration ; le chromosome X possède un marquage facile à repérer. Cette méthode permet d'une part le comptage des gonosomes, et d'autre part la réalisation des caryotypes

* Coloration en bandes C : elle ne permet que l'étude sur les gonosomes, le repérage du Y est assez facile.

Le chromosome X, quant à lui possède un double marquage net lorsqu'il s'agit du X activé, mais le X inactivé n'est que faiblement coloré.

I.1.5.b. Chien

Techniques de coloration mises en œuvre

Les chromosomes de chien sont étudiés après coloration conventionnelle, en bandes C et G

* Coloration en bandes G : les chromosomes de chien sont assez fragiles; ils ne doivent pas être trop dénaturés par la trypsine. L'incubation dans l'enzyme ne doit pas excéder si 1 minute 15 secondes.

En revanche, la coloration doit être soutenue.

Le Y apparaît comme un petit carré gris assez difficile à voir; il se confond avec les autosomes des dernières paires.

Le X se repère très facilement grâce à son marquage.

* Coloration en bandes C : il est préférable de faire cette coloration sur des lames passées une nuit à l'étuve à 60°C puis vieillies une semaine à température ambiante. En effet, si les lames sont trop récentes, les chromosomes sont trop altérés par l'acide chlorhydrique.

Le repérage du chromosome X est facile. Le Y apparaît comme un point noir pouvant se confondre avec une trace de baryte.

* Coloration conventionnelle : le X se voit bien. Le Y est le plus petit de tous les chromosomes; il est métacentrique.

I.1.6. Observation des métaphases et réalisation des caryotypes

I.1.6.a. Matériel optique et logiciel utilisés

Les lames sont observées au microscope optique relié à un système de caméra et à un ordinateur. On utilise un oculaire x10 et des objectifs secs (grossissement x10, x100) et un objectif à immersion (grossissement x100) ; le grossissement est modifié par l'optovar (grossissement x1, x1.25, et x1.6).

L'analyse des métaphases est réalisée grâce au logiciel Cytovision d'Applied Imaging, programme informatique conçu pour l'étude cytogénétique en médecine humaine. Ce programme est utilisé pour le diagnostic : après sélection d'une métaphase au microscope, l'image est saisie sur l'ordinateur, puis les chromosomes sont comptés, découpés.

Enfin, avec le système on peut réaliser les caryotypes.

I.1.6.b. Technique d'observation des lames

Pour l'étude des animaux intersexués, on observe au moins 200 métaphases, pour voir s'il existe différentes populations cellulaires.

Ce travail est parfois fastidieux : il est parfois difficile de trouver 200 métaphases observables; ceci concerne les cultures pauvres, qui ont mal réagi en présence de l'agent mitogène. Différentes raisons expliquent ce phénomène parmi lesquelles: l'utilisation de sang prélevé longtemps avant la culture, ou la mise en culture de sang prélevé sur des animaux ayant reçu des corticoïdes, ou immunodéprimés, ou sur des animaux malades présentant une forte neutrophilie. Les cultures contaminées sont également plus pauvres en mitoses.

De plus, les métaphases peuvent être incomplètes (cf. importance de l'étalement).

Les chromosomes doivent être assez longs pour être identifiables, mais si on observe de nombreux croisements et on perd une partie de la valeur informative du marquage. L'idéal est d'avoir des chromosomes bien séparés, avec un marquage net pour les bandes G (cf. importance du temps de dénaturation à la trypsine).

L'observation proprement dite se fait suivant une progression en créneaux pour voir le plus de métaphases possible.

Les lames en coloration conventionnelle sont lues en lumière normale, aux objectifs secs.

Les bandes G sont observées en lumière normale, aux objectifs secs, et avec l'objectif à immersion au contraste de phase pour mieux apprécier la qualité du marquage.

Les bandes C sont analysées en lumière normale, ou en contraste de phase, suivant l'intensité de la coloration des chromatides. En général, l'utilisation des objectifs secs suffit.

I.1.6.c. Capture des métaphases et caryotypage

Après une étape de comptage et de recherche des anomalies éventuelles (anomalies de nombre, translocations de fragments de grande taille), on réalise une approche plus fine des chromosomes par le caryotypage (on les apparie de façon à comparer leur marquage).

Un classement des chromosomes est effectué suivant les standards d'une espèce donnée. Pour le cheval on se sert du standard décrit par Richer (Richer, (230)). les caryotypes de

chiens sont réalisés à partir du standard donné en 1996 par Reimann (Reimann, (228), et Switonski, (260)).

Avant d'être imprimés, les caryotypes sont corrigés par différentes personnes du Laboratoire.

I.2. Techniques de Biologie Moléculaire mises en œuvre

Pour l'étude des animaux intersexués, on utilise la PCR (Polymerase Chain Reaction). Elle permet de rechercher la présence du chromosome Y, plus précisément du gène Sry. Elle est réalisée en complément de l'analyse cytogénétique.

I.2.1. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN est nécessaire pour rendre accessible l'ADN qui sera amplifié, pour éliminer les inhibiteurs des réactions de la PCR. L'extraction permet aussi de concentrer l'ADN de l'échantillon (Bogard, 1998).

L'ADN utilisé pour les réactions est extrait soit à partir de sang total, prélevé sur Héparinate de Lithium ou sur EDTA, soit à partir de peau. Il pourrait être extrait à partir de tout autre tissu de l'organisme.

L'extraction à partir de sang total est réalisée à l'aide d'un kit d'extraction (Quiagen). Elle consiste en une hémolyse du sang total à 70 °C en présence d'un tampon de lyse (agent dénaturant), associé à de la protéinase K (protéase non spécifique qui est active même en présence de forte concentration d'agent dénaturant fort). Cette dernière permet de casser les structures protéiques. On ajoute ensuite de l'éthanol à 96° qui permet de séparer les protéines de l'ADN. Le mélange est homogénéisé au vortex puis centrifugé sur une colonne qui piège l'ADN. Après 2 lavages de la colonne avec des tampons de lavages, l'ADN est élué dans de l'eau à température ambiante ou dans du tampon d'éluion.

L'ADN extrait peut être utilisé de suite ou réfrigéré ou congelé (-20°C).

I.2.2. PCR proprement dite

La PCR permet de faire une d'extension d'amorces (courtes séquences d'oligonucléotides, complémentaires du brin d'ADN et utilisées par une ADN polymérase pour répliquer l'ADN) sur les 2 brins d'ADN à la fois, les amorces encadrant la région d'intérêt (Larzul, 1993).

Il s'agit en fait d'une répétition de 3 étapes thermiques qui permettent d'amplifier de façon exponentielle le nombre de copies de l'ADN (le nombre de copies de la séquence est doublé à chaque cycle). On réalise en moyenne 30 à 35 cycles.

Chaque cycle correspond à une étape de dénaturation de l'ADN (les liaisons hydrogènes établies entre les différentes bases de la double hélice d'ADN sont rompues pour libérer les ADN monocaténares), puis à une étape d'hybridation des amorces sur les brins d'ADN

(une amorce se fixe en 5'→3' sur le brin 5'→3', l'autre en 3'→5' sur le brin anti-sens), enfin à une étape d'élongation (l'ADNpolymérase réplique la région d'intérêt).

Une dénaturation supplémentaire de l'ADN peut être effectuée entre 94-95°C au début de la réaction, avant le premier cycle, afin de bien ouvrir la double hélice.

La température d'hybridation varie entre 40 et 70°C et dépend du couple d'amorces choisies.

La phase d'élongation se fait en général à 72°C, température à laquelle l'ADNpolymérase est la plus active.

La PCR nécessite différents réactifs :

- l'ADN à amplifier
- le couple des 2 amorces
- un excès du mélange des 4 dNTP (à la concentration de 200µM chacun)
- le tampon 10 X qui joue sur la stringence du milieu réactionnel
- le MgCl₂ (il influence la spécificité de la réaction) dont la concentration varie entre 1 et 3,5 mM
- la TaqPolymérase thermostable en excès (entre 0,4 UI/100µl et 1 UI/100µl).

Les concentrations sont adaptées en fonction de chaque protocole expérimental.

Le volume réactionnel est compris entre 25 et 100 µl.

Après la PCR, le produit d'amplification peut être utilisé de suite pour l'électrophorèse ou bien conservé au réfrigérateur ou congelé.

I.2.3. Electrophorèse en gel d'agarose

Le gel d'agarose forme un réseau où l'ADN chargé négativement peut migrer sous l'action d'une différence de potentiel (ddp).

On place un gel d'agarose sur un support. On le recouvre d'une solution tampon de TBE (Tris Borate EDTA) à 0,5 Mol.. Sous l'effet de la ddp, les fragments d'ADN migrent vers la cathode.

La distance de migration augmente quand la taille des fragments diminue. Ceci est valable pour des fragments de moins de 30 kbases. Au-delà, même si la concentration du gel en agarose diminue (on augmente la taille des mailles du réseau), l'ADN ne migre pas.

On visualise la migration des fragments d'ADN à l'aide du BET (bromure d'Ethidium), agent intercalant qui se place entre les 2 brins d'ADN et donne une fluorescence rose aux UV.

Préparation du gel d'électrophorèse à 2% d'agarose :

On porte à ébullition 20 ml de TBE à 0,5 M. dans lequel on a dissous 0,4g d'agarose pur (qualité Biologie Moléculaire). On rajoute du BET dans le gel d'agarose (2µl de BET pour 20 ml de TBE). Le gel est coulé sur le support. On met en place le peigne permettant de former les 6 à 8 puits. Après avoir laissé refroidir le gel une demi-heure environ, on peut mettre le produit de la PCR à migrer.

Dépôt du produit de la PCR et migration:

On mélange 1 μ l de tampon de charge à 10-20 μ l du produit de la réaction PCR. On dépose doucement le mélange dans un puits. On applique une tension de 50V ou 100V à la cuve d'électrophorèse. La durée de migration dépend de la taille des fragments amplifiés.

Le gel est observé sous la lampe à UV.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ABE S., MIYAKE Y.I., KAGEYAMA S.I., WATANABE G., TAYA K., KAWAKURA K.. Deletion of the Sry region on the Y chromosome detected in a case of equine gonadal hypoplasia (XY female) with abnormal hormonal profiles. *Equine Veterinary Journal*. 1999; **31**: 336-338.
- 2- ABRAMSKY L., CHAPPLE J.. 47,XXY (Klinefelter syndrome) and 47,XYY: estimated rates of and indication for postnatal diagnosis with implications for prenatal counselling. *Prenatal Diagnosis*. 1997 ; **17** :363-368.
- 3- ADOLPHE M., BARLOVATZ-MEIMON G.. *Cultures de cellules animales. Méthodologies applications*. Paris : Les Editions INSERM, 1988, 436 pages.
- 4- AGBOOLA-ABU C.F., ALIGWEKWE P.K., OLOWU A.O., KUKU S.F.. Congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase enzyme deficiency in three siblings. A brief report. *West African Journal of Medicine*. 1999 ; **18** : 80-86.
- 5- ALECK K.A., ARGUESO L., STONE J., HACKEL J.G., ERICKSON R.P.. True hermaphroditism with partial duplication of chromosome 22 and without SRY. *American Journal of Medical Genetics*. 1999 ; **85** : 2-4.
- 6- ALEXANDER G., WILLIAMNS D.. Ovine freemartins. *Nature (London)*. 1964 ; **201** : 1296-1298.
- 7- ALEXON R.D, SECORD A.C, WEBER C.G.. Unusual anatomical findings in a canine hermaphrodite. *Canadian Veterinary Journal*. 1966 ; **7** : 180-181.
- 8- ALLEN W.E. et all. Three intersexual dogs. *Veterinary Record*. 1981 ; **109** : 468-471.
- 9- AMDOR J.. A case report. Equine pseudohermaphroditism. *Iowa State University Vet*. 1965 ; **27** : 120-121.
- 10- AXELSON R.D.. Pseudohermaphroditism in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1978 ; **172** : 584-585.

- 11- BARBAUX S., VILAIN E., MCELREAVEY K., FELLOUS M.. Le point sur le déterminisme du sexe des mammifères. *Médecine / Sciences*. 1995 ; **11** : 529-536.
- 12- BASRUR P.K, KANAGAWA H., GILMAN J.P.W.. An equine intersex with unilateral gonadal agenesis. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 1969 ; **33** : 297-306.
- 13- BASRUR P.K, KANAGAWA H., PODLIACHOUK L.. Further studies on the cell populations of an intersex horse. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 1970 ; **34** : 295-298.
- 14- BELVILLE C., JOSSO N., PICARD J.Y.. Persistence of Mullerian derivatives in males. *American Journal of Medical Genetics* .1999 ; **89** : 218-223.
- 15- BERNINGER M.S., HARTLEY J.L.. Le contrôle des contaminations par ampli transfert. IN : LARZUL D.. *La PCR, un procédé de répllication in vitro*. Paris : Tec et Doc Lavoisier/Editions Médicales Internationales, 1993, 61-64.
- 16- BERTHELOT X., BERLAND H.M., DARRE R.. Gémellité hétérosexuée et freemartinisme en élevage bovin: démarche pratique. *Point vétérinaire*. 1987 ; **18** : 737-741.
- 17- BERTRAND M. Le freemartinisme. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 1965 ; **116** : 575-599.
- 18- BERTRAND M. Les anomalies chromosomiques chez les Mammifères domestiques. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 1979 ; **130** : 313-335.
- 19- BLUE M.G., BRUERE A.N., DEWES H.F.. The significance of the XO syndrome in infertility of the mare. *New Zealand Veterinary Journal*. 1978 ; **26** : 137-141.
- 20- BOGARD M., LAMORIL, J.. *Biologie Moléculaire en Biologie Clinique*. Amsterdam, Oxford, Paris, New York, Tokyo : Elsevier, 1998. Vol. 1, 348 pages.
- 21- BOOTH J W.D., POLGE C.. The occurrence of C19 steroids in testicular tissue and submaxillary glands of intersex pigs in relation to morphological characteristics. *Reproduction and Fertility*. 1976 ; **46** : 115-121.
- 22- BORNSTEIN S.. The genetic sex of two intersexual horses and some notes on the karyotype of normal horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1967 ; **8** : 291-300.
- 23- BOSU W.T.K., CHICK B.F., BASRUR P.K.. Clinical, pathologic and cytogenetics observations on two intersex dogs. *Cornell Veterinarian*. 1978 ; **68** : 375-390.
- 24- BOUTERS R., PLASSCHE M. VAN DE, MOOR A. de.. An intersex (male pseudohermaphrodite) horse with 64XX/65XXY mosaicism. *Equine Veterinary Journal*. 1972 ; **4** : 150-153.
- 25- BOUTERS R., PLASSCHE M. VAN DE, MOOR A. de.. An intersex (male pseudohermaphrodite) horse with 64XX/65XXY mosaicism. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1975 ; **23** : 375-376.

- 26- BOWLING A.T., MILLON L., HUGHES J.P.. An update of chromosomal abnormalities in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1987 ; suppl. **35** : 149-155.
- 27- BOWLING A.T.. The horse karyotype and chromosomal abnormalities. IN *Horse Genetics*. Oxford : CAB International, 1996, 115-122.
- 28- BRAUN A., KAMMERER S., CLEVE H., LOHRS U., SCHWARZ H.P., KUHNLE U.. True hermaphroditism in a 46,XY individual, caused by a postzygotic somatic point mutation in the male gonadal sex-determining locus (SRY) : molecular genetics and histological findings in a sporadic case. *American Journal of Human Genetics*. 1993 ; **52** : 578-585.
- 29- 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.
- 30- BREEN M., LANGFORD C.F., CARTER N.P., HOLMES N.G., DICKENS H.F., THOMAS R., SUTER N., RYDER E.J., POPE M., BINNS M.M. . FISH mapping and identification of canine chromosomes. *Journal of Heredity*. 1999 ; **90** : 27-30.
- 31- BRENNECKE L.H., BOJRAB M.J., THORNBURG L.P.. Pyometra in a male pseudohermaphrodite dog. *Modern Veterinary Practice*. 1979 ; **159** : 448-449.
- 32- BRODEY R.S., MARTIN J.D., LEE D.G.. Male pseudohermaphroditism in a Toy Terrier. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1954 ; **125** : 368-370.
- 33- BROUILLETTE J.A., ANDREW J.R., VENTA P.J.. Apparently similar sequence diversity in dogs and humans : evidence using a pool-and-sequence approach to identify single nucleotide variation. IN: *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi/online>). 1999 ; **GI="6630984"** (locus AF201736S2) and **GI="6630985"** (locus AF201736S1).
- 34- BROWN R.C., SWANTON M.C., BRINKHOUS K.M.. Canine hemophilia and male pseudo-hermaphroditism. Cytogenetic studies. *Laboratory Investigation*. 1963 ;**12**: 961-967.
- 35- BROWN T.T., BUREK J.D., MCENTEE K.. Male pseudohermaphroditism, cryptorchidism and sertoli cell neoplasia in three miniature Schnauzers. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1976 ; **169**: 821-825.
- 36- BRUERE A.N., FIELDEN E.D., HUTCHINGS H.. XX/XY mosaicism in lymphocyte cultures from a pig with freemartin characteristics. *New Zealand Veterinary Journal*. 1968 ; **16** : 31-38.
- 37- 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.
- 38- BRUGGENWIRTH H.T., BOEHMER A.L., VERLEUN-MOOIJMAN M.C., HOOGENBOEZEM T., KLEIJER W.J., OTTEN B.J., TRAPMAN J., BRINKMANN A.O.. Molecular basis of androgen insensitivity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1996; **58** : 569-575.

- 39- BRUINSMA D.L., AKERMAN L.A.. Male pseudohermaphroditism in a Miniature Schnauzer. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*. 1983 ; **78** : 1568-1571.
- 40- 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.
- 41- 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.
- 42- BUOEN LC, ZHANG TQ, WEBER AF, RUTH GR. SRY-negative, XX intersex horses: the need for pedigree studies to examine the mode of inheritance of the condition. *Equine Veterinary Journal*. 2000 ; **32** :78-81.
- 43- BURKITT H.G., YOUNG B., HATH J.W.. *Histologie fonctionnelle Wheater*. 3e édition. Paris, Arnette, 1993, 408 pages.
- 44- CAMERON FJ, SINCLAIR AH. Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Human Mutation*. 1997 ; **9** :388-395.
- 45- CAMMAERT S., CORYN M., de KRUIF A., SPINCEMAILLE J, DELBEKE F.T., DEBACKERE M.. Three full sister mares with a stallion-like behaviour and a high blood testosterone concentration. *Equine Veterinary Science*. 1993 ; **13** : 220-222.
- 46- CARILLO J.M., BURK R.L.. Male pseudohermaphrodisme associated with urinary incontinence in an Afghan. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1977 ; **13** : 80-82.
- 47- CASSIER P., HOURDRY J., PIEAU C., PORCHET M.. La morphogenèse sexuelle. IN : HOURDRY J. *Biologie du développement*. Paris : Editions Marketing, 1998. Chapitre 11, 215-252- Collection Ellipses.
- 48- CHAFFAUX S., MAILHAC J-M., CRIBIU E.P., POPESCU C.P., COTARD J-P.. L'intersexualité chez le chien (*Canis familiaris*). A propos de quatre cas. *Recueil de Médecine Vétérinaire* . 1980 ; **156** :179-792.
- 49- CHAFFAUX S., CRIBIU E.P., CRESPEAU F.. A rare case of true lateral hermaphroditism in a 78,XX bitch. *Recueil de Médecine Vétérinaire*.1986 ; **162** : 463-470.
- 51- CHAFFAUX S., CRIBIU E.P.. Female Pseudo-Hermaphroditism in 3 Bitches from One Litter. *Recueil de Médecine Vétérinaire*. 1990 ; **166** : 407-410.
- 51- CHAFFAUX S., NUDELMANN N., DURAND V., CRIBIU E.P.. Male Pseudohermaphroditism - A Case of a 78,XX Intersex. *Recueil de Médecine Vétérinaire*. 1990; **166** : 125-132.
- 52- CHAFFAUX S., CRIBIU E.P.. Clinical, Histological and Cytogenetic Observations on 9 Intersex Dogs. *Génétique, Sélection, Evolution*. 1991 ; **23** : S81-S84.

- 53- 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** : 377-383.
- 54- CHANDLEY A.C.. Viable aneuploidy in the horse. *Equine Veterinary Journal*. 1997; **29** : 3-4.
- 55- CHEN C.P., CHEN S.R., WANG T.Y., WANG W., HWU Y.M.. A frame shift mutation in the DNA-binding domain of the androgen receptor gene associated with complete androgen insensitivity, persistent müllerian structures, and germ cell tumors in dysgenetic gonads. *Fertility and Sterility*. 1999 ; **72** : 170-173.
- 56- CLARKSON B.G., FISHER K.R., PARTLOW G.D.. A gonadal presumptive XX/XY leukochimeric pig. *Anatomical Record*. 1995 ; **242** : 195-199.
- 57- CLOUGH E., PYLE R.L., HARE W.C.D., KELLY D.F., PATTERSON D.F.. An XXY sex chromosome constitution in a dog with testicular hypoplasia and congenital heart disease. *Cytogenetics*. 1970 ; **9** : 71-77.
- 58- COHEN D.R., SINCLAIR A.H., MC GOVERN J.D.. Sry protein enhances transcription of Fos-related antigen-1 promoter constructs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*. 1994 ; **91** : 4372-4376.
- 59- 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.
- 60- CONTE F.A., GRUMBACH M.M., ITO Y., FISHER C.R., SIMPSON E.R.. A syndrome of female pseudohermaphroditism, hypergonadotropic hypogonadism, and multicystic ovaries associated with missense mutations in the gene encoding aromatase (P450arom). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1994 ; **78** : 1287-1292.
- 61- COPELLI S.B., BERGADA C., BILLERBECK A.E., GOLDBERG A.C., KALIL J., DAMIANI D., TARGOVNIK H.M.. Molecular analysis of sex determination in sex-reversed and true hermaphroditism. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1996 ; **29** : 743-748.
- 62- COTINOT C., GIANQUINTO L., FELLOUS M.. Le déterminisme du sexe et son contrôle génétique. IN : THIBAUT C., LEVASSEUR M.C.. *La reproduction chez les Mammifères et l'Homme*. Paris : Editions Marketing, 1991. Chapitre 12, 205-219- Collection INRA Ellipses.
- 63- 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.
- 64- CRIBIU E.P.. Caryotype normal et anomalies chromosomiques du cheval domestique (*Equus caballus*). *Recueil de Médecine Vétérinaire*. 1984; **160** : 131-139.

- 65- CRIBIU E.P.. Cytogénétique et pathologie équine. *Recueil de Médecine Vétérinaire*. 1992; **168** : 1005-1010.
- 66- CRIBIU E.P., CHAFFAUX S.. L'intersexualité chez les mammifères domestiques. *Reproduction, Nutrition et Développement*. 1990 ; (suppl. 1) : 51s-61s.
- 67- CURTIS E.M., GRANT Q.P.. Masculinization of female pups by progestagens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1964 ; **144** : 395-398.
- 68- DAIN A.R.. Intersexuality in a Cocker Spaniel dog. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1974 ; **39** : 365-371.
- 69- DAIN A.R, WALKER R.G.. Two intersex dogs with mosaicism. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1979 ; **56** :239-42.
- 70- DAMIANI D., FELLOUS M., MCELREAVEY K., BARBAUX S., BARRETO E.S., DICHTCHEKENIAN V., SETIAN N.. True hermaphroditism: clinical aspects and molecular studies in 16 cases. *European Journal of Endocrinology*. 1997 ; **136** : 201-204.
- 71- DARRE R., QUEINNEC G, BERLAND H.M.. Diagnostic précoce du freemartinisme et chimérisme leucocytaire des veaux jumeaux hétérosexués. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 1972; **123** : 17-34.
- 72- DAVIES T.G.. Turner's syndrome (karyotype 63 XO) in a Thoroughbred mare. *Equine Veterinary Education*. 1995 ; **7** : 15-17.
- 73- DAVIS C.J.. Caprine freemartins. *Veterinary Journal*. 1913 ; **20** : 62-70.
- 74- DUCOS A., BERLAND H.M., PINTON A., GUILLEMOT E., SEGUELA A., DARRE A., DARRE R.. Nine new cases of reciprocal translocation in the domestic pig. *Journal of Heredity*. 1998 ; **89** : 136-142.
- 75- DUMON C.. Démarche diagnostique devant l'infécondité de la chienne. IN : DUMON C., FONTBONNE A.. *La reproduction du chien et du chat*. Paris : Edition PMCCA, 1992, 145-152.
- 76- DUNCAN S.L., PAGE K.B., RODGERS D.A.. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency with minimal virilization and spontaneous reduction of serum androgens to normal female levels. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 1997 ; **46** : 369-372.
- 77- DUNN H.O., VAUGHAN J.T., MCENTEE K.. Bilaterally cryptorchid stallion with a female karyotype. *Cornell Veterinarian*.1974 ; **64** : 265-275.
- 78- DUNN H.O., SMILEY D., DUNCAN J.R., MCENTEE K.. Two equine true hermaphrodites with 64, XX/64, XY and 63, X0/64, XY chimerism. *Cornell Veterinarian*. 1981 ; **71** : 123-135.
- 79- DUTRILLAUX B., COUTURIER J.. *La pratique de l'analyse chromosomique*. Paris, New York, Barcelone, Milan, Mexico, Rio de Janeiro : Masson, 1981, 87 pages.

- 80- EDOLS J.H., ALLAN G.S.. A case of male pseudohermaphroditism in a Cocker Spaniel. *Australian Veterinary Journal*. 1968 ; **44** : 287-290.
- 81- EICHER E.M., WASHBURN L.L., SCHORK N.J., LEE B.K., SHOWN E.P., XU X., DREDGE R.D., PRINGLE M.J., PAGE D.C.. Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-YPOS sex reversal. *Nature Genetics*. 1996 ; **14** : 206-209.
- 82- ERICKSON R.P.. Does sex determination start at conception?. *Bioessays*. 1997 ; **19** : 1027-1032.
- 83- ERK A., OZEREN S., OZBAY O., VURAL B., ELCIOGLU N.. Persistent mullerian duct syndrome. A case report. *Journal of Reproductive Medicine*. 1999 ; **44** : 135-138.
- 84- FITZGERALD A.L., MURPHY D.A.. Bilateral Ovotestes in an Intersex, Mixed Breed Dog. *Laboratory Animal Science*. 1990 ; **40** : 647-650.
- 85- FLEJTER W.L., FERGESTAD J., GORSKI J., VARVILL T., CHANDRASEKHARAPPA S.. A gene involved in XY sex reversal is located on chromosome 9, distal to marker D9S1779. *American Journal of Human Medicine*. 1998 ; **63** : 794-802.
- 86- FONTBONNE A., BADINAND F.. Démarche diagnostique devant l'infécondité du chien mâle. IN : DUMON C., FONTBONNE A.. *La reproduction du chien et du chat*. Paris : Edition PMCCA, 1992, 153-159.
- 87- FOSTER J.W., DOMINGUEZ-STEGLICH M.A., GUIOLI S., KOWK G., WELLER P.A., STEVANOVIC M., WEISSENBACH J., MANSOUR S., YOUNG I.D., GOODFELLOW P.N., et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 1994 ; **372** : 525-530.
- 88- FRETZ P.B., HARE W.C.D.. Male pseudo-hermaphrodite horse with 63X0/64XX/65XXY mixoploidy. *Equine Veterinary Journal*. 1976 ; **8** : 130-132.
- 89- FREY J.C., TYLER D.E., RAMSEY F.K.. Pyometra associated with bilateral cryptorchidism and Sertoli's cells tumor in a male pseudohermaphroditic dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1965 ; **146** : 723-727.
- 90- GABRIEL-ROBEZ O., JAAFAR H., RATOMPONIRINA C., BOSCHER J., BONNEAU J., POPESCU C.P., RUMPLER Y. Heterosynapsis in a heterozygous fertile boar carrier of a 3;7 translocation. *Chromosoma*. 1988 ; **97** : 26-32.
- 91- GENERO E.R., MORENO-MILLÀN M., OCAÑA-QUERO J.. XX/XY chromosome chimerism in an intersex dog. *Veterinary Record*. 1998 ; **142** : 340.
- 92- GEORGE F.W., WILSON J.D.. Sex Determination and Differentiation. IN : KNOBIL E., NEILL J.D.. *The Physiology of Reproduction*. New York : Raven Press, 1988. Vol. 1. Chapitre 1, 3-26.

- 93- GERNEKE W.H., DE BOOM H.P.A., HEINICKEN I.G.. Two canine intersexes. *Journal of the South African Veterinary Association*. 1968 ; **39** : 55-59.
- 94- GERNEKE W.H, COUBROUGH R.I. Intersexuality in the horse. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1970 ; **37** : 211-216.
- 95- GILL J.JB., KEMPSKI H.M., HALLOWS B.J., WARREN A.M.. A 64XX/65XXX mosaic mare (*Equus caballus*) and associated infertility. *Equine Veterinary Journal*. 1988 ; **20** : 128-130.
- 96- GILBERT S.F.. *Biologie du développement*. Traduction française de la 4e édition. Paris, Bruxelles : De Boeck Université, 1996. Chapitre 21, La détermination du sexe, 754-787.
- 97- GILTAY J.C., BRUNT T., BEEMER F.A., WIT J.M., VAN AMSTEL H.K., PEARSON P.L., WIJMENGA C.. Polymorphic detection of a parthenogenetic maternal and double paternal contribution to a 46,XX/46,XY hermaphrodite. *American Journal of Human Genetics*. 1998 ; **62** : 937-940.
- 98- GLUHOVSCHI N., BISTRICEANU M., SUCIOL A., BRATU M.. A case of intersexuality in the horse with type 2A-XXXXY chromosome formula. *British Veterinary Journal*. 1970 ; **126** : 522-525.
- 99- GOTTHELF L.N., BARNETT T.. Male pseudohermaphroditism in a dog. *Veterinary Medicine*. 1996 ; **91**: 308.
- 100- GOTTLIEB B., VASILIOU D.M., LUMBROSO R., BEITEL L.K., PINSKY L., TRIFIRO M.A.. Analysis of exon 1 mutations in the androgen receptor gene. *Human Mutation*. 1999 ; **14** : 527-539.
- 101- GREEN A.J., BARTON D.E., JENKS P., PEARSON J., YATES J.R.W.. Chimaerism shown by cytogenetics and DNA polymorphism analysis. *Journal of medical genetics*. 1994 ; **31** : 816-817.
- 102- GREGORY S.P., TROWER N.D.. Surgical treatment of urinary incontinence resulting from a complex congenital abnormality in two dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 1997 ; **38** : 25-28.
- 103- GRIGER U. MEYERS-WALLEN V.N., PATTERSON D.F.. A 6-month-old Doberman pinscher with ambiguous genitalia as a first case of X-chromosomal monosomy in a dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1989 ; **3** : 245.
- 104- GUERRA G. Jr, PALNDI DE MELLO M., GODOY ASSUMPCAO J., MORENO MORCILLO A., VALENTE DE LEMOS MARINI S.H., MATIAS BAPTISTA M.T., et al.. True Hermaphrodites in the Southeastern Region of Brazil : A Different Cytogenetic and Gonadal Profile. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 1998 ; **11** : 519-524.
- 105- HADJIATHANASIOU C.G., BRAUNER R., LORTAT-JACOB S., NIVOT S., JAUBERT F., FELLOUS M., NIHOUL-FEKETE C., RAPPAPORT R.. True hermaphroditism: genetic variants and clinical management. *Journal of Pediatrics* .1994 ; **125** : 738-744.

- 106- HALMAN 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.
- 107- HALMAN C.R.E., WATSON J.I., PRYDE L.C.. Prediction of reproductive performance in horse by karyotype. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1982 ; suppl. **32** : 627-628.
- 108- HALMAN C.R.E.. Sex chromosomes mosaicism and infertility in mares. *Veterinary Record*. 1985 ; **116** : 542-543.
- 109- HALMAN C.R.E.. Equine cytogenetics : role in equine veterinary practice. *Equine Veterinary Journal*. 1985 ; **17** : 173-177.
- 110- HARBOUR D.. Male pseudohermaphroditism in a Cocker Spaniel. *Modern Veterinary Practice*. 1987 ; **68** : 29.
- 111- HARE W.C.D., MC FEELY R.A., KELLY D.F.. Familial 78 XX male pseudohermaphroditism in three dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1974 ; **36**: 207-210.
- 112- HARE W.C.D.. Intersexuality in dogs. *Canadian Veterinary Journal*. 1976 ; **17** : 7-15.
- 113- HERZOG A., HOHN H., KLUG E., HECHT W.. A sex chromosome mosaic in a male pseudohermaphroditism in a horse. *Tierärztliche Praxis*. 1989 ; **17** : 171-175.
- 114- HIORT O., GRAMSS B., KLAUBER G.T.. True hermaphroditism with 46,XY karyotype and a point mutation in the SRY gene. *Journal of Pediatrics*. 1995 ; **126** : 1022.
- 115- HOFFMANN R.. Pseudohermaphroditismus femininus bei einem Schäferhund. *Deutsche Tierärztliche ; Wochenschrift*. 1972 ; **79** : 393-397.
- 116- HOLT P.E, LONG S.E., GIBBS C.. Disorders of urination associated with canine intersexuality. *Journal of Small Animal Practice*. 1983 ; **24** : 475-487.
- 117- HOHN H., KLUG E., RIECK G.W.. A 63, XO/65, XYY mosaic in a case of questionable equine male pseudohermaphroditism. *4 th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals*. 1980, 82-92.
- 118- HOWARD P.E., BJORLING D.E.. The intersexual animal. Associated problems. *Problems in Veterinary Medicine*. 1989 ; **1** : 74-84.
- 119- HUBLER M, HAUSER B, MEYERS-WALLEN VN, ARNOLD S. Sry-negative XX true hermaphrodite in a Basset hound. *Theriogenology*. 1999 ; **51** : 1391-1403.
- 120- HUGHES W.. The freemartin conditions in swine. *Anatomical Record*. 1929 ; **41** : 213.
- 121- 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.
- 122- 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.

- 123- HUGHES J.P., TROMMERSHAUSEN-SMITH A.. Infertility in the horse associated with chromosomal abnormalities. *Australian Veterinary Journal*. 1977; **53** : 253-257.
- 124- IMAI A., HORIBE S., FUSEYA T., TAKAGI H., TAKAGI A., TAMAYA T.. Detection of SRY in 45,X/47,XYY mosaicism leading to phenotypic female. *Clinical Genetics*. 1997 ; **51** : 124-126.
- 125- IMBEAUD S., REY R., BERTA P., CHAUSSAIN J.L., WIT J.M., LUSTIG R.H., DE VROEDE M.A., PICARD J.Y., JOSSO N.. Testicular degeneration in three patients with the persistent mullerian duct syndrome. *European Journal of Pediatrics*. 1995 ; **154** : 187-190.
- 126- IMBEAUD S., BELVILLE C., MESSIKA-ZEITOUN L., REY R., DI. CLEMENTE N., JOSSO N., PICARD JY.. A 27 base-pair deletion of the anti-mullerian type II receptor gene is the most common cause of the persistent mullerian duct syndrome. *Human Molecular Genetics*. 1996 ; **5** : 1269-1277.
- 127- INOUE H., NOMURA M., YANASE T., ICHINO I., GOTO K., IKUYAMA S., TAKAYANAGI R., NAWATA H.. A rare case of 46,XX true hermaphroditism with hidden mosaicism with sex-determining region Y chromosome-bearing cells in the gonads. *Internal Medicine*. 1998 ; **37** : 467-471.
- 128- ISHIKAWA H., SAKURADA K., FUJITA T. YAMAUCHI T.. 39,X/40,XY true hermaphrodite mouse with normal ovarian function. *Reproduction, Fertility, Development*. 1997; **9** : 775-779.
- 129- JACKSON D.A., OSBORNE C.A., BROSMER T.H., JESSEN C.R.. Non neurogenic urinary incontinence in a canine female pseudohermaphrodite. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1978 ; **172** : 926-930.
- 130- JACOBS P.A. STRONG J.A.. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*. 1959 ; **183** : 302-303.
- 131- JAYARAM N, RAMAPRASAD AV, CHETHAN M, SUJAY AR, REVATHY DJ.. Persistent mullerian duct syndrome. A report of two cases. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 1997 ; **40** : 161-163.
- 132- JAY P., GOZE C., SOULIER S., DESCLOZEAU M., POULAT F., LAUDET V., BERTA P.. Le sexe et les SOX. *Médecine / Sciences*. 1996 ; **12** : 1097-1104.
- 133- JOHSON C.A.. The role of the foetal testicle in sexual differentiation. *Compodium on continuing education*. 1983 ; **5** : 129-132.
- 134- JOSSO N., REY R.. La cellule de Sertoli, une cellule endocrine. *Médecine / Sciences*. 1995 ; **11** : 537-546.
- 135- JOST A.. Les péripéties d'une recherche : l'étude de la différenciation sexuelle. *Médecine / Sciences*. 1991 ; **7** : 263-275.

- 136- JOST A.. La différenciation du sexe. IN : THIBAUT C., LEVASSEUR M.C.. *La reproduction chez les Mammifères et l'Homme*. Paris : Editions Marketing, 1991. Chapitre 11, 189-204.- Collection INRA Ellipses.
- 137- 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.
- 138- KELLY D.F., LONG S.E., STROHMENGER G.D.. Testicular neoplasia in an intersex dog. *Journal of Small Animal Practice*. 1976 ; **17** : 247-253.
- 139- KENT M.G., SHOFFNER R.N., BOUEN L., WEBER A.F.. XY sex-reversal syndrome in the domestic horse. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1986 ; **42** : 8-18.
- 140- KIEFFER N.M., BURNS S.J., JUDGE N.G.. Male pseudohermaphroditism of the testicular feminizing type in a horse. *Equine Veterinary Journal*. 1976 ; **8** : 38-41.
- 141- KING N.W., GARVIN C.H.. Bilateral hermaphroditism in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1964 ; **145** : 997- 1001.
- 142- KLUNDER L.R., MC FEELY R.A., WILLARD J.P.. Six separate anomalies in an Arabian mare. *Equine Veterinary Journal*. 1990 ; **22** : 218-220.
- 143- KODAGALI S.B. Sexual behavior in an intersex horse. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*. 1969 ; **64**: 422.
- 144- KOMORI S., KASUMI H., SAKATA K., TANAKA H., HAMADA K., KOYAMA K.. Molecular analysis of the androgen receptor gene in 4 patients with complete androgen insensitivity. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 1998 ; **261** : 95-100.
- 145- KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, GOODFELLOW P, LOVELL-BADGE R.. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 1991 ; **351** : 117-121.
- 146- KROB G., BRAUN A., KUHNLE U. True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *European Journal of Pediatrics*. 1994; **153** : 2-10.
- 147- KUBIEN E.M., POZOR M.A., TISCHNER M.. Clinical, Cytogenetic and Endocrine Evaluation of a Horse with a 65,XXY Karyotype. *Equine Veterinary Journal*. 1993 ; **25** : 333-335.
- 148- KUSZ K., KOTECKI M., WOJDA A., SZARRAS-CZAPNIK M., LATOS-BIELENSKA A., WARENIK-SZYMANKIEWICZ A., RUSZCZYNSKA-WOLSKA A., JARUZELSKA J.. Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the SRY gene on an inactive X chromosome. *Journal of Medical Genetics*. 1999 ; **36** : 452-456.
- 149- LANGFORD C.F., FISCHER P.E., BINNS M.M., HOLMES N.G., CARTER N.P.. Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog. *Chromosome Research*. 1996 ; **4** : 115-123.

- 150- LARZUL D.. *La PCR, un procédé de réplication in vitro*. Paris : Tec et Doc Lavoisier/Editions Médicales Internationales, 1993, 388 pages.
- 151- LAWRENCE J., MEISELS R.. A lateral canine hermaphrodite. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1952 ; **121** : 171-172.
- 152- LEADON D.P.. Aberrant sexual development in the horse. *Irish Veterinary Journal*. 1987 ; **41** : 270.
- 153- LEADON D.P.. When is a filly not a filly? *Equine Veterinary Journal*. 1990 ; **22** : 149.
- 154- LEDERER H.A.. What is your diagnosis ? *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1975 ; **167** : 239-240.
- 155- LEE J.. Paraphimosis in a pseudohermaphrodite dog. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*. 1976 ; **71** : 1076-1077.
- 156- LEIGHTON R.L.. Ablation of the penis and castration in a male pseudohermaphrodite dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1976 ; **12** : 664-665.
- 157- LE MOIGNE A.. *Biologie du développement*. 4e édition. Paris, Masson, 1997. Chapitre 6, 261-284.
- 158- LENNOZ G.. A case of hermaphroditism in a young dog. *Point Vétérinaire*. 1988 ; **20** : 95-98.
- 159- LOFSTEDT R.M, BUOEN L.C, WEBER A.F, JOHNSTON S.D, HUNTINGTON A, CONCANNON P.W.. Prolonged proestrus in a bitch with X chromosomal monosomy (77,XO). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1992 ; **200** : 1104-1106.
- 160- LONG S.E.. Chromosome anomalies and infertility in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 1988 ; **20** : 89-93.
- 161- MAC DONOUGH PG. The Y-chromosome and reproductive disorders. *Reproduction, Fertility and Development*. 1998 ; **10** : 1-16.
- 162- MAC ELREAVEY 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*. 1993 ; **90** : 3368-3372.
- 163- MAC FEELY R.A., BIGGERS J.D.. A rare case of female pseudohermaphroditism in the dog. *Veterinary Record*. 1965 ; **77** : 696-698.
- 164- MAC FEELY R.A., HARE W. C. D., BRIGGER J.D.. Chromosome studies in 14 cases of intersex in domestic mammals. *Cytogenetics*. 1967 ; **6** : 242-253.
- 165- MAC FEELY R.A.. A review of cytogenetics in equine reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1975 ; suppl. **23** : 371-374.

- 166- MAC FEELY R.A.. Chromosome abnormalities. *Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice*. 1993 ; **9** : 11-22
- 167- MAC ILWRAITH CW, OWEN RA, BASRUR PK. An equine cryptorchid with testicular and ovarian tissues. *Equine Veterinary Journal*. 1976 ; **8** : 156-160.
- 168- MAC LAREN A., SIMPSON E., TOMONARI K., CHANDLER P., HOGG H.. Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature*. 1984 ; **312** :552-555.
- 169- MÄKELÄ, O., GUSTAVSSON, I., HOLLMÉN, T.. A 64, X, i(Xq) karyotype in a Standardbred filly. *Equine Veterinary Journal*. 1994 ; **26** : 251-254.
- 170- MAKINEN A., KATILA T., KOUKKANEN M.T. X0 syndrome in the mare. *Nordisk Veterinær Medecine* 1986 ; **38** : 16-21.
- 171- MAKINEN A., HASEGAWA T., MAKILA M, KATILA T.. Infertility in two mares with XY and XXX sex chromosomes. *Equine Veterinary Journal*. 1999 ; **31** : 346-349.
- 172- MAKINEN A., KATILA T., ANDERSSON M., GUSTAVSSON I.. Two sterile stallions with XXY-syndrome. *Equine Veterinary Journal*. 2000 ; **32** : 358-360.
- 173- MARGARIT E, SOLER A, CARRIO A, OLIVA R, COSTA D, VENDRELL T, ROSELL J, BALLESTA F. Molecular, cytogenetic, and clinical characterisation of six XX males including one prenatal diagnosis. *Journal of Medical Genetics*. 1998 ; **35** : 727-730.
- 174- MARSHALL L.S., OEHLERT M.L., HASKING M.E., SELDEN J.R. PATTERSON D.F.. Persistent Müllerian duct syndrome in miniature Schnauzer. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1982 ; **181** : 798-801.
- 175- MASKILL G.J.. Bizarre effect of a testicular tumor. *Veterinary Record*. 1992 ; **131** : 40.
- 176- MEDLEAU L.. Sex hormon associated endocrine alopecias in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1989 ; **25** : 689-694.
- 177- MELNICZEK J.R., DAMBACH D., PROCIUK U., JEZYK P.F., HENTHORN P.S., PATTERSON D. F., GIGER U.. Sry-Negative XX Sex Reversal in a Family of Norwegian Elkhounds. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1999 ; **13** :564-569.
- 178- 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.
- 179- MEYERS-WALLEN V.N, PATTERSON D.F.. XX sex reversal in the American cocker spaniel dog: phenotypic expression and inheritance. *Human Genetics*. 1988 ; **80** : 23-30.
- 180- MEYERS-WALLEN V.N, JAMES A.. Genetics of sexual differentiation and anomalies in dogs and cats. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. 1993; **47** :441-452.

- 181- MEYERS-WALLEN V.N, BOWMAN L, ACLAND G.M, PALMER V.L, SCHLAFER D, FAJT V.J.A.. Sry-negative XX sex reversal in the German shorthaired pointer dog. *Journal of Heredity*. 1995; **86** : 369-374.
- 182- MEYERS WALLEN V.N., HURTGEN J., SCHLAFER D., TULLENERS E., CLELAND W.R., RUTH G.R., ACLAND G.M.. SRY-negative XX true hermaphroditism in a Pasa Fino horse. *Equine Veterinary Journal*. 1997 ; **29** : 404-408.
- 183- MEYERS-WALLEN V.N, SCHLAFER D., BARR I., LOVELL-BADGE R., KEYZNER A.. Sry-negative XX sex reversal in Purebred Dogs. *Molecular Reproduction and Development*. 1999 ; **53** : 266-273.
- 184- MEYERS-WALLEN VN. Inherited disorders in sexual development. *Journal of Heredity*. 1999 ; **90** : 93-95.
- 185- MILLIKEN J.E., PACCAMONTI D.L., SHOEMEKER R.S., GREEN W.H.. XX male pseudohermaphroditism in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1995 ; **207** : 77-79.
- 186- MINH H.N., BELAISCH J., SMADJA A.. Hermaphrodisme et pseudo-hermaphrodisme masculin. *La Presse Médicale*. 1992 ; **21** : 1862-1867.
- 187- MINH H.N., BELAISCH J., SMADJA A.. Pseudo-hermaphrodisme féminin. *La Presse Médicale*. 1993 ; **22** : 1735-1740.
- 188- MITTWOCH U.. Sex reversal in the horse - 2 sides of a common coin. *Equine Veterinary Journal*. 1997 ; **29** : 333-334.
- 189- MOLTENI L., DE GIOVANNI MACCHI A., MEGGIOLARO D., SIRONI G., ENICE F., POPESCU P.. New cases of XXY constitution in cattle. *Animal Reproduction Science*. 1999 ; **55** : 107-113.
- 190- MORENO-MILLAN M., DELGADO BERMEJO J.V., LOPEZ CASTILLO G.. An intersex horse with X chromosome trisomy. *Veterinary Record*. 1989 ; **124** : 169-170.
- 191- MORNET E., GIBRAT J.F.. A 3D model of human P450c21: study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. *Human Genetics*. 2000 ; **106** : 330-339.
- 192- MORRIS P.D.G.. Pseudohermaphrodite dog. *British Veterinary Journal*. 1952 ; **108** : 375-376.
- 193- MOWSZOWICZ I., BERTHAUIT I., MESTAYER C., WRIGHT F., KUTTENN F., MAUVAIS-JARVIS P.. 5-alpha-reductases : physiologie et pathologie. *Annales d' Endocrinologie (Paris)*. 1995 ; **56** : 555-559.
- 194- MURTI G.S., GILBERT D.L., BORGMANN A.R.. Canine intersex states. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1966 ; **149** : 1183-1185.

- 195- NEMZEK J.A., HOMCO L.D., WHEATON L.G., GRMAN G.L.. Cystic ovaries and hyperestrogenism in a canine female pseudohermaphrodite. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1992 ; **28** : 403-406.
- 196- NEWMAN R.H.. Pyometra and a Sertoli cell tumor in a hermaphroditic dog. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*. 1979 ; **74** : 1757.
- 197- NICKEL R.F., UBBINK G., VAN DER GAAG G.I., VAN SLUIJS F.J.. Persistent Mullerian duct syndrome in the Basset Hound. *Tijdschrift Diergeneeskunde*. 1992 ; **117** (suppl. 1): 31S.
- 198- NIE G.J., MOMONT H.W., BUOEN L.. A Survey of Sex Chromosome Abnormalities in 204 Mares Selected for Breeding. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1993 ; **13** : 456-459.
- 199- NIE G.J., SHIRLEY D. J., et al. Theriogenology question of the month. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1998 ; **212** : 1545-1547.
- 200- NIXON A.J., BROWER-TOLAND B.D.. Analysis on equine Sox9 expression in healing cartilage. IN: *GenBank* (<http://www.nlm.nih.gov/nlm/online>). 2000 ; **GI= "8072314"** (locus AF265207).
- 201- NOMURA K.. Canine male pseudohermaphroditism with female chromosomal pattern. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*. 1986 ; **39** : 520-524.
- 202- NORRIDIN R.W., BAUM A.C.. A male pseudohermaphrodite dog with a Sertoli's cell tumor, mucometre and vaginal glands. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1970 ; **156** : 204-207.
- 203- NUNEZ B.S., LOBATO M.N., WHITE P.C., MESEGUER A.. Functional analysis of four CYP21 mutations from spanish patients with congenital adrenal hyperplasia. *Biochemical and Biophysiological Research Communications*. 1999 ; **262** : 635-637.
- 204- OLIVIER M., LUST G. Two DNA sequences specific for the canine Y chromosome. *Animal Genetics*. 1998 ; **29** : 146-149.
- 205- OLIVIER M., BREEN M., BINNS M.M., LUST G.. Localization and characterization of nucleotide sequences from the canine Y chromosome. *Chromosome Research*. 1999 ; **7** : 223-233.
- 206- OLSON P.N., SEIM H.B., PARK R.D., GRANDY J.L., FRESHMAN J.L., CARLSON E.D.. Female pseudohermaphroditism in three sibling Greyhounds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1989 ; **194** : 1747-1749.
- 207- PAILHOUX E., POPESCU P.C., PARMA P., BOSCHER J., LEGAULT C., MOLTENI L., FELLOUS M., COTINOT C. Genetic analysis of 38XX males with genital ambiguities and true hermaphrodites in pigs. *Animal Genetics*. 1994 ; **25** : 299-305.

- 208- 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.
- 209- PALMER S., BURGOYNE P.S.. The *Mus musculus domesticus* Tdy allele : a basis for XY sex reversal in C57BL/6-Y^{POS} mice. *Development*. 1991 ; **113** : 709-714.
- 210- PAVAUX C. Spanchnologie des animaux domestiques. Fascicule III : *Anatomie du développement / Splanchnologie des Oiseaux*. E.N.V.T., document pédagogique, 1987-265 pages.
- 211- PAYNE H.W., ELLSWORTH K. DE GROOT A.. Aneuploidy in an infertile Mare. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1968 ; **153** : 1293-1299.
- 212- PERL S. , KLOPFER U., NYSKA A.. A case of female pseudohermaphroditism in a dog. *Refuah Veterinarith*. 1979 ; **36** : 143-145.
- 213- PHILIPS J.M., BRIEF B.K, SUTTON T.S., MILLS J.W.. Hermaphroditism. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1939 ; **95** : 663-676.
- 214- PLACHOT M., CROZET N.. Fertilization abnormalities in human in-vitro fertilization. *Human Reproduction*. 1992 ; suppl. 7 : 89-94.
- 215- PLOCHL E., VLASAK I., RITTINGER O., BERGENDI E., STOPAR M., KURNIK P., NACHTIGALL M., ZIERLER H., RAPPOLD G.A., SCHIEBEL K.. Clinical, cytogenetic and molecular analysis of three 46,XX males. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 1999 ; **12** : 389-395.
- 216- PODLIACHOUCK L, VANDEPLASSCHE M, BOUTERS R. Gestation gémellaire, chimérisme et freemartinisme chez le cheval. *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia*. 1974 ; **58** : 13-28.
- 217- POPESCU P., HAYES H., DUTRILLAUX B.. Techniques de cytogénétique animale. Paris : INRA Editions, 1998, 260 pages.
- 218- POTTER W.R., RIGGOTT J.M.. A pseudohermaphrodite dog. *Veterinary Record*. 1967; **80** : 647-648.
- 219- POTTER W.L., COOPER J.W., BLACKSHAW A.W.. Cytogenetical studies of infertile pigs. *Australian Veterinary Journal*. 1980 ; **56** : 133-136.
- 220- POWER M.M.. XY sex reversal in a mare. *Equine Veterinary Journal*. 1986 ; **18** : 233-236.
- 221- POWER M.M.. Chromosomes of the horse. IN : *Domestic Animals Cytogenetics*. New York : R.A. McFeely. Academic Press, 1990, 131-167.
- 222- POWER M.M., LEADON D.P.. Diploid-triploid chimaerism (64, XX/96,XXY) in an intersex foal. *Equine Veterinary Journal*. 1990 ; **22** : 211-214.

- 223- PREPIN J., JOST A., VIGIER B.. Les cellules germinales des freemartins. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 1977 ; **121** : 537-545.
- 224- PULLEN C.M.. True bilateral hermaphroditism in a Beagle. A case report. *American Journal of Veterinary Research*. 1970 ; **31** :1113-1117.
- 225- RANDOLPH J., CENTER S.A., MC ENTEE M., GOLDBERG E.. H-Y antigen-positive XX true bilateral hermaphroditism in a German Shorthair Pointer. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1988 ; **24** : 417-420.
- 226- REGO A., MARGARIT E., ESTIVILL X., REGAL M., GARCIA-MAYOR R.V.. Development in a 46 XX boy with positive SRY gene. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 1996 ; **9** : 623-626.
- 227- REID S.W., WEATHERSTONE J.F., ROBINSON B.N.. X chromosome mosaicism and infertility in a mare. *Canadian Veterinary Journal*. 1987 ; **28** : 533-534.
- 228- REIMANN N., BARTNITZKE S., BULLERDIEK J., SCHNUTZ U., ROGOLLA P., NOLTE I., RÖNNE M. An extended nomenclature of the canine karyotype. *Cytogenetics Cell Genetics*. 1996 ; **73** : 140-144.
- 229- REYES RIVERA M.L., WONG SANCHEZ E., CASAS SANTISREBE A.L., DE LEON R.A., CASTILLO MENCHACA F.. Female pseudohermaphroditism. Mixed germ cell tumor of the ovary. A case report. *Ginecologia y Obstetricia de Mexico* 1998 ; **66** : 24-28.
- 230- RICHER C.L., POWER M.M., KLUNDER L.R., MCFEELY R.A., KENT M.G.. Standard karyotype of the domestic horse (*Equus caballus*). Committee for standardized karyotype of *Equus caballus*. The Second International Conference for Standardization of Domestic Animal Karyotypes, INRA, Jouy-en Josas, France, 22nd-26th May 1989. *Hereditas*. 1990; **112** : 289-293.
- 231- RHOADES J.D., FOLEY C.W.. Cryptorchidism and intersexuality. *Veterinary Clinics of North America*. 1977 ; **7** : 789-794.
- 232- ROTHUIZEN J., VOORHOUT G., OKKENS A.C., BIEWENGA W.S.. Urovagina associated with a female pseudohermaphroditism in four bitches from one litter. *Tijdschrift Diergeneeskunde*. 1978 ; **103** : 1104-1113.
- 233- ROUILLER-FABRE V., CARMONA S., MERHI R.A., CATE R., HABERT R., VIGIER B.. Effect of anti-Mullerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats. *Endocrinology*. 1998 ; **139** : 1213-1220.
- 234- SAEZ J.M., LEJEUNE H., AVALLET O., HABERT R., DURAND P.. Le contrôle des fonctions différenciées des cellules de Leydig. *Médecine / Sciences*. 1995 ; **11** : 547-553.
- 235- SALKIN M.S.. Pyometra in a male pseudohermaphrodite dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1978 ; **172** : 943-946.
- 236- SCHAFER A.J., GOODFELLOW P.N.. Sex determination in humans. *Bioessays*. 1996 ; **18** : 955-963.

- 237- SCHERER G., HELD M., ERDEL M., MESCHEDE D., HORST J., LESNIEWICZ R., MIDRO A.T.. Three novel SRY mutations in XY gonadal dysgenesis and the enigma of XY gonadal dysgenesis cases without SRY mutations. *Cytogenetics Cell Genetics*. 1998 ;80 : 188-192.
- 238- SCHNECK G.W.. Hermaphroditism in a Shetland Sheepdog. *Veterinary Record*. 1975 ; **96**: 323.
- 239- SCHNECK G.. Ein Fall von Hermaphroditismus bei einem Sheltie. *Kleintier-Praxis*. 1976 ; **21** : 67-68.
- 240- SCHLUTZ M.G.. Male pseudohermaphroditism diagnosed with aid of sex chromatin technique. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1962 ; **140** : 241-244.
- 241- SCHULENBERG A.. Phenotypic development anomaly in a long-haired Dachshund. *Praktische-Tierarzt*. 1994 ; **75** : 961-962, 964.
- 242- SELDEN J.R., WACHTEL S.S., KOO G.C., HASKINS M.E., PATTERSON D.F.. Genetic basis of XX male syndrome and XX true hermaphroditism: evidence in the dog. *Science*. 1978 ; **201**: 644-646.
- 243- SELDEN J.R., MOORHEAD P.S., KOO G.C., WACHTEL S.S., HASKINS M.E., PATTERSON D.F.. Inherited XX sex reversal in the cocker spaniel dog. *Human Genetics*. 1984 ; **67** : 62-69.
- 244- SERALINI G.E.. Molecular characterization and expression of equine testicular aromatase. IN: *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi/online>). 1999 ; **GI= "4469170"** (locus ECA012610).
- 245- 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.
- 246- SHKOLNY D.L., BEITEL L.K., GINSBERG J., PEKELES G., ARBOUR L., PINSKY L., TRIFIRO M.A.. Discordant measures of androgen-binding kinetics in two mutant androgen receptors causing mild or partial androgen insensitivity, respectively. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999 ; **84** : 850-810.
- 247- SHOOK T.E., LOKAI M.D., BUERGELT C.D., KIEHL A.R. Gonadal intersex in a mare. *Equine Practice*. 1990 ; **12** : 7-10.
- 248- SILVERMAN K., COUPEY S.M., MURAM D.. Non-classic 21-hydroxylase deficiency in an 18-year-old female athlete. A case report. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*. 2000 ; **13** : 96-97.
- 249- SINCLAIR AH. Human sex determination. *Journal of Experimental Zoology*. 1998 ; **281** : 501-505.

- 250- SINNECKER G.H., HIORT O., DIBBELT L., ALBERS N., DORR H.G., HAUSS H., HEINRICH U., HEMMINGHAUS M., HOEPFFNER W., HOLDER M., SCHNABEL D., KRUSE K.. Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *American Journal of Medical Genetics*. 1996 ; **63** : 223-230.
- 251- SMITH FW JR, BUOEN LC, WEBER AF, JOHNSTON SD, RANDOLPH JF, WATERS DJ.. X-chromosomal monosomy (77,X0) in a Doberman Pinscher with gonadal dysgenesis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1989; **3** :90-95.
- 252- SOBTI V.K., SINGH S., RATHORE S.S. Surgical Removal of a Clitoral Os-Penis from a Doberman Pup. *Indian Veterinary Journal*. 1990 ; **67** : 277.
- 253- SOMMER MM, MEYERS-WALLEN V.N.. XX true hermaphroditism in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1991 ; **198** : 435-438.
- 254- STEWART R.W., MENGES R.W., SELBY L.A., RHOADES J.D., CRENSHAW D.B.. Canine intersexuality in a Pug breeding kennel. *Cornell Veterinarian*. 1962 ; **62** : 464.
- 255- STEWARTSCOTT I.A. Infertile mares with chromosome abnormalities. *New Zealand Veterinary Journal*. 1988 ; **36** : 63-65.
- 256- STEWARTSCOTT I.A., PEARCE P.D., BURKIN D.J.. Further Cases of Equine Sex Chromosome Abnormalities. *New Zealand Veterinary Journal*. 1990 ; **38** : 54-56.
- 257- STRAIN L., WARNER J.P., JOHNSTON T., BONTHRON D.T.. A human parthogenetic chimera. *Nature Genetics*. 1995 ; **11** : 164-169.
- 258- SUNDBERG J.P.. A case of true bilateral hermaphroditism in a dog. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*. 1979 ; **74** : 477-482.
- 259- SVENDSEN C.K., THOMSEN P.D., BASSE A.. Two cases of male pseudohermaphroditism in a the dog. Clinical macroscopic, Karyotypic and therapeutic features. *Nordisk Veterinær Medecin*. 1985 ; **37** : 358-363.
- 260- SWITONSKI M., REIMANN N., BOSMA A.A., LONG S., BARTNITZKE S., et al.. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. *Chromosome Research*. 1996 ; **4** : 306-309.
- 261- SWITONSKI M., GODYNICKI S., JACKOWIAK H., PIENKOWSKA A., TURCZUK-BIERLA I., SZYMAS J., GOLINSKI P., BERESZYNSKI A. X trisomy in an infertile bitch: cytogenetic, anatomic, and histologic studies. *Journal of Heredity*. 2000 ; **91** : 149-150.
- 262- SYSA P.S., SLOTA E.. The XXY syndrome in cattle. *6 th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals*. 1984, 120-128.
- 263- TALERMAN A., VERP M.S., SENEKJIAN E., GILEWSKI T., VOGELZANG N.. True hermaphrodite with bilateral ovotestes, bilateral gonadoblastomas and dysgerminomas, 46,XX/46,XY karyotype, and a successful pregnancy. *Cancer*. 1990 ; **66** : 2668-2672.
- 264- TANGNER C.H., BREIDER M. A., AMOSS M. S.. Lateral hermaphroditism in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1982 ; **181** : 70-71.

- 265- TAR A., SOLYOM J., GYORVARI B., ION A., TELVI L., BARBAUX S., SOULEYREAU N., VILAIN E., FELLOUS M., MCELREAVEY K.. Testicular development in an SRY-negative 46,XX individual harboring a distal Xp deletion. *Human Genetics*. 1995 ; **96** : 464-468.
- 266- THIELE B., WEIDEMANN W., SCHNABEL D., ROMALO G., SCHWEIKERT H.U., SPINDLER K..D Complete androgen insensitivity caused by a new frameshift deletion of two base pairs in exon 1 of the human androgen receptor gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999 ; **84** : 1751-1753.
- 267- THIERS V.. Présentation de la PCR. IN : LARZUL D.. La PCR, un procédé de réplication in vitro. Paris : Tec et Doc Lavoisier/Editions Médicales Internationales, 1993, 26-31.
- 268- THOMAS T.N., OLSON P.N., HOOPES P.J.. Lateral hermaphroditism and seminoma in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1986 ; **189** : 1596-1597.
- 269- THOMSEN P.D., POULSEN P.H.. Analysis of the gonadal sex of five intersex pigs using Y chromosomal markers. *Hereditas*. 1993 ; **119** : 205-207.
- 270- THOMPSON M.W., MCINNES R.R., WILLARD H.F.. *Génétique médicale* . Traduction française de la 5e édition. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1995. Chapitre 2, Base chromosomique de l'hérédité, 13-30 ; Chapitre 9, Cytogénétique clinique : principes généraux et anomalies des autosomes, 201-229 ; Chapitre 10, Les Chromosomes sexuels et leurs anomalies, 754-787.
- 271- THULINE H.C., NORBY D.E.. Spontaneous occurrence of chromosome abnormality in cats. *Science*. 1961 ; **134** : 554-555.
- 272- 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.
- 273- VAIMAN D., KOUTITA O., OUSTRY A., ELSEN J.M., MANFREDI E., FELLOUS M., CRIBIU E.P.. Genetic mapping of the autosomal region involved in XX sex-reversal and horn development in goats. *Mammalian Genome*. 1996 ; **7** : 133-137.
- 274- VALENTINO R., SAVASTANO S., TOMMASELLI A.P., DORATO M., SCARPITTA M.T., CALVANESE E., DEL PUENTE A., LOMBARDI G.. Female pseudohermaphroditism and inefficient peak bone mass in an untreated subject affected by 21-hydroxylase congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Endocrinological Investigations*. 2000 ; **23**(5) : 317-320.
- 275- VANDERVELDE J.E.. True hermaphroditism in a dog. *Canadian Veterinary Journal*. 1965 ; **6** : 241-242.
- 276- VAN SCHOUWENBURG SELMA J.E.M., LOUW G.J.. A case of dysuria as a result of a communication between the urinary bladder and corpus uteri in a Cairn Terrier. *Journal of the South African Veterinary Association*. 1982 ; **53** : 65-66.
- 277- VENTA P.J., BROUILLETTE J.A., YUZBASIYAN-GURKAN V., BREWER G.J.. Gene-specific universal mammalian sequence-tagged site ; application to the canine genome.

IN: *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi/online>). 1996 ; GI= "1261794" (locus DOGWT1B).

278- VIGIER B., PREPIN J., PERCHELLET J.P., JOST A.. Développement de l'effet freemartin chez un foetus de veau. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 1977 ; **121** : 521-536.

279- VIGIER B, TRAN D, LEGEAI L, BEZARD J, JOSSO N. Origin of anti-Mullerian hormone in bovine freemartin fetuses. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1984 ; **70** : 473-479.

280- VISSER J.A., MCLUSKEY A., VAN BEERS T., WEGHUIS D.O., VAN KESSEL A.G., GROOTEGOED J.A., THEMME A.P.. Structure and chromosomal localization of the human anti-mullerian hormone type II receptor gene. *Biochemical and Biophysiological Research Communications*. 1995 ; **215** : 1029-1036.

281- VOLPE P., IZZO B., PIA DI MEO G., PERUCATTI A., IANNUZZI L.. Male pseudohermaphroditism in a dog : a clinical case. *Veterinary Record*. 2000 ; **146** : 532-533.

282- WALKER A.M., WALKER J.L., ADAMS S., SHI E., MCGLYNN M., VERGE C.F.. True hermaphroditism. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2000 ; **36** : 69-73.

283- WALKER K.S., BRUERE A.N.. XO condition in mares. *New Zealand Veterinary Journal*. 1979; **27** : 18-19

284- WALKER R.G.. Hermaphroditism in a bitch. A case report. *Veterinary Record*. 1961 ; **73**: 670-671.

285- WATSON E.D.. Infertility in the Mare. *Journal of Comparative Pathology*. 1994 ; **111** : 333-351

286- WEAVER A.D., HARVEY M.J., MUNRO C.D., ROGERSON P., MCDONALD M.. Phenotypic intersex (female pseudohermaphroditism) in a Dachshund dog. *Veterinary Record*. 1979 ; **105** : 230-232.

287- WHITE DJ, FAREBROTHER DA. A case of intersex in a horse. *Veterinary Record*. 1969 ; **85** : 203-204.

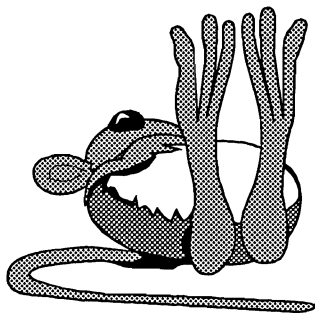
288- WHITE P.C, SPEISER P.W.. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrinology Reviews*. 2000 ; **21**: 245-291.

289- WILLIAMS J., PARTINGTON B.P., SMITH B., HEDLUND C.S., LAW J.M.. Pyovagina and stump pyometra in a neutered XX sex-reversed beagle: a casereport. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1997; **33** :83-90.

290- WINTER H.. Pathogenic classification of intersex. *Veterinary Record*. 1977 ; **100** : 307-310.

291- WOLFF E.. *Les changements du sexe*. Paris : Gallimard, 1946.

292- ZHU Y.S., CAI L.Q., CORDERO J.J., CANOVATCHEL W.J., KATZ M.D., IMPERATO-MCGINLEY J.. A novel mutation in the CAG triplet region of exon 1 of androgen receptor gene causes complete androgen insensitivity syndrome in a large kindred. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999 ; **84** : 1590-1594.



Toulouse, 2001

NOM : PAGET

PRENOM : SANDRINE

TITRE : ETUDE CYTOGENETIQUE ET MOLECULAIRE D'UN CAS D'INTERSEXUALITE CHEZ LE CHIEN ET LE CHEVAL

RESUME :

Essentiellement décrite chez les animaux de rente, l'intersexualité peut affecter de nombreuses espèces de Mammifères, y compris l'espèce humaine, et avoir différentes répercussions sur le devenir des individus atteints. Qu'il s'agisse du pseudo-hermaphroditisme mâle, du pseudo-hermaphroditisme femelle, ou bien de l'hermaphroditisme vrai, l'intersexualité se définit par une incohérence entre le sexe chromosomique, le sexe gonadique et le sexe phénotypique de l'individu. Elle résulte d'une anomalie du déterminisme du sexe ; la rupture dans la cascade du développement sexuel normal peut se faire à différents moments de la vie foetale et conduire à une des trois formes d'intersexualité.

Contrairement à ce qu'on observe dans les cas d'hypogonadisme, les sujets intersexués présentent des phénotypes très variés, allant de l'apparence normale, mâle ou femelle, à un phénotype ambigu. D'autre part, l'intersexualité peut être responsable de troubles comportementaux ou de pathologies parfois délétères pour la santé. Elle est généralement liée à une infertilité. Tous les caractères de cette anomalie sont présentés de façon plus exhaustive à travers l'étude bibliographique des cas décrits dans les espèces canine et équine depuis une trentaine d'années.

Cette grande variabilité peut parfois rendre le diagnostic complexe : l'approche clinique s'avère souvent insuffisante, et des examens complémentaires sont nécessaires. Il s'agit entre autres d'une étude chromosomique. A l'heure actuelle, les méthodes de Cytogénétique tendent à être complétées par une étude moléculaire et par la recherche de gènes impliqués dans le développement sexuel. Mais si ces deux méthodes d'investigations permettent d'aboutir au diagnostic d'intersexualité, la caractérisation de celle-ci repose sur une analyse histologique des gonades.

L'approche diagnostique ainsi que les répercussions de ce trouble du développement sexuel sont illustrées à travers l'étude d'un cas chez le chien et le cheval.

MOTS CLES : intersexualité, cytogénétique, biologie moléculaire, chien, cheval.

ENGLISH TITLE : CYTOGENETICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF INTERSEXUALITY IN DOG HORSE : CASE REPORTS

ABSTRACT:

Mainly described in farm animals, intersexuality could be encountered in numerous Mammalian species, including Man. It can have various effects on the life of affected individuals. Intersexuality (male pseudo-hermaphroditism, female pseudo-hermaphroditism or true hermaphroditism) can be defined as the lack of coherence between chromosomal, gonadic and phenotypic sex. It relates to an abnormality of sexual determinism. The break point in the processes of normal sexual development can occur at various stages of foetal life and leads to one of the three forms of intersexuality.

Unlike hypogonadism, the phenotypic variability associated to the intersex condition is rather important: very different clinical descriptions have been reported, from normal male to normal female. More over, intersexuality can be responsible of behavioural pathology and can lead to deleterious effects on health. It is generally associated with infertility. The characteristics of this anomaly are presented more exhaustively through the bibliographic analysis of the cases reported in the canine and equine species during the last thirty years.

This important phenotypic variability evocated above induces some difficulties in the establishment of the diagnostic. Indeed, clinical approach is often insufficient and must be completed by laboratory analyses. One of them is the establishment of the karyotype of affected individuals. Nowadays, cytogenetical methods are generally associated with molecular studies aiming at detecting genes involved in sex determination. Even if those two methods allow the diagnostic of intersexuality, the only way to characterize accurately the anomaly is the histological analysis of the gonads.

The techniques of diagnosis and the possible effects of intersexuality are illustrated through the study of one case in the dog and one case in the horse.

KEY WORDS: intersexuality, cytogenetics, molecular biology, dog, horse.