

Le sexage des spermatozoïdes : état des lieux et perspectives

X. DRUART et C. RIBEIRO BENTO DOS SANTOS

Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Animale (UNCEIA), Département Recherche et Développement, 13 rue Jouet. 94704 Maisons Alfort Cedex

RESUME - Le sexage des spermatozoïdes est un procédé dont les progrès réalisés au cours des dix dernières années permettent d'envisager son utilisation dans le cadre de la production de semence et de l'insémination chez les espèces domestiques. En effet, la séparation des spermatozoïdes X ou Y par cytométrie en flux en fonction de leur contenu en ADN a permis l'obtention de naissances du sexe souhaité chez sept espèces différentes (bovin, porc, équin, ovin, lapin, élan et humain). Les animaux domestiques produits à ce jour avec cette technologie ne présentent pas un taux d'anomalie supérieur à la normale. Cependant, le faible rendement de production de semence sexée, la complexité et le coût élevé de la méthode associées à une baisse de la fertilité induite par le procédé de tri limitent encore son utilisation à des applications spécifiques. D'autres méthodes de sexage, plus simples d'utilisation et plus facilement intégrables dans les centres de production de semence, sont actuellement recherchées. Le volume des spermatozoïdes, les antigènes de surface, la charge électrique ou encore d'éventuelles propriétés physiologiques liées au sexe sont des paramètres actuellement étudiés en vue de la conception de méthodes originales de tri des spermatozoïdes.

Semen sexing : current status and perspectives

X. DRUART et C. RIBEIRO BENTO DOS SANTOS

Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Animale (UNCEIA), Département Recherche et Développement, 13 rue Jouet. 94704 Maisons Alfort Cedex

SUMMARY - Advances in the last ten years in sperm sexing technology now allow its introduction, albeit limited, in AI production centres. Offspring from seven mammalian species (cattle, pigs, rabbits, horses, sheep, elk and humans) have been produced after sperm sorting based on fluorescence flow cytometry and DNA content. No gross abnormalities have been reported among the offspring produced after sperm sexing. However, the low efficiency of sperm sorting, the complexity and cost of the method associated to a decreased fertility of sperm induced by cell sorting restrict its use for specific applications. Alternative methods, more suitable for semen production centres, are sought. Volumetric differences, surface antigenic differences, electric charge of the surface or possible sex dependant physiological differences are considered as possible candidates for a new sperm sorting technology alternative to DNA quantification with DNA binding dyes.

1. INTRODUCTION

Dans les années 80, le Dr Johnson de l'Université de Beltsville (USA) fut le premier à montrer que le tri de la semence des principales espèces domestiques était techniquement réalisable en séparant les spermatozoïdes en fonction de leur contenu en ADN par cytométrie en flux. Cependant les performances permises par les cytomètres de cette époque ont longtemps confiné les résultats dans les laboratoires de recherche. Depuis quelques années, une nouvelle génération de cytomètres aux performances nettement accrues a relancé l'intérêt envers cette technologie et permet d'espérer son utilisation à une échelle industrielle. Parallèlement, d'autres projets diamétralement opposés ont vu le jour, en particulier la recherche de protéines de surface spécifiques du sexe permettant une séparation par technique immunologique.

Cet article a pour but de faire le point sur les méthodes actuelles de séparation et les progrès attendus dans les prochaines années.

2. LES PARAMETRES POTENTIELS DE TRI

2.1 LE CONTENU EN ADN

Au cours de la méiose, le nombre de chromosomes passe de $2n$ à n . Les spermatozoïdes possèdent donc un seul chromosome de chaque paire originale. Dans le cas des chromosomes sexuels, ils possèdent soit le chromosome X, soit le chromosome Y.

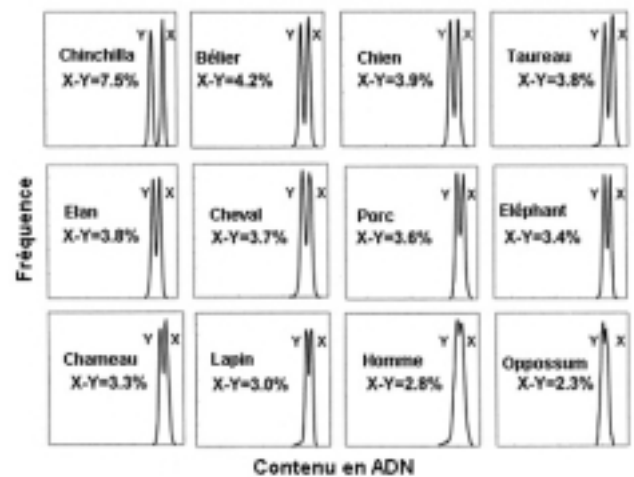


Figure 1 : différence de contenu en ADN entre les spermatozoïdes X et Y mesurée par marquage au Hoechst 33342 et cytométrie en flux chez diverses espèces (modifié d'après Johnson, 2000).

Le chromosome X ayant une taille supérieure à celle du chromosome Y, le contenu en ADN des spermatozoïdes X est supérieur à celui des spermatozoïdes Y. Ainsi les spermatozoïdes X et Y diffèrent par leur contenu en ADN selon une proportion variant de 2,3 à 7,5 % selon les espèces analysées (figure 1 ; 3,8 % pour les bovins).

Il est possible de quantifier le contenu en ADN grâce à l'utilisation d'un marqueur fluorescent: le Hoechst 33342. Celui-ci lorsqu'il est lié à l'ADN et excité par une lumière ultra-violette émet une fluorescence bleue. L'intensité de fluorescence émise par un spermatozoïde marqué au Hoechst et excité par un faisceau UV est directement proportionnelle à son contenu en ADN. La quantité de fluorescence émise par un spermatozoïde X bovin sera donc supérieure de 3,8 % à celle émise par un spermatozoïde Y. La cytométrie en flux permet d'analyser individuellement plusieurs milliers de cellules par seconde. Ainsi, la quantité de fluorescence émise par chaque spermatozoïde traversant le faisceau laser est mesurée et permet d'identifier les spermatozoïdes X et Y. Du fait de la forme asymétrique des spermatozoïdes, leur orientation lors de leur passage au travers du faisceau laser conditionne la qualité de la mesure de l'intensité de fluorescence. Seuls les spermatozoïdes correctement orientés pourront être triés (figure. 2). C'est pourquoi une buse d'injection conçue pour orienter correctement les gamètes permet de trier 70 % des spermatozoïdes contre 25 % avec une buse conventionnelle (Rens *et al.*, 1998).

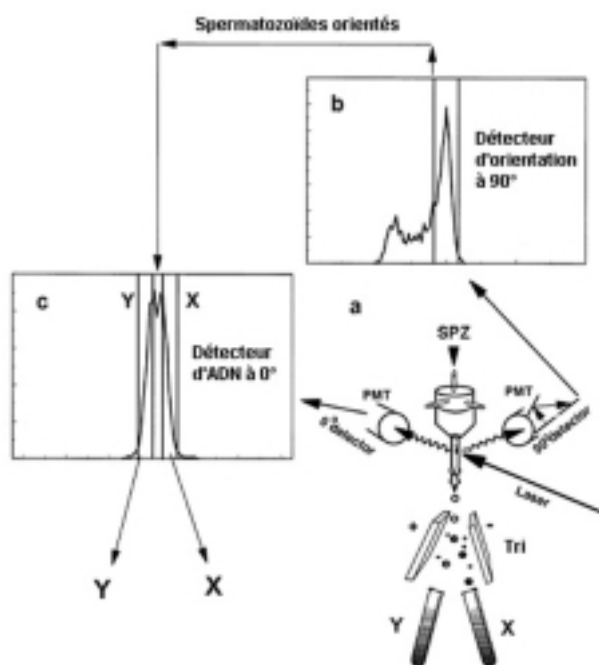


Figure 2 : méthode de sexage des spermatozoïdes par cytométrie en flux selon le contenu en ADN (modifié d'après Johnson, 2000).

A. Les spermatozoïdes sont introduits sous pression dans la buse d'orientation des spermatozoïdes.
 B. Après excitation par un laser UV, la fluorescence des spermatozoïdes est mesurée par un photomultiplicateur (PMT) placé à 90° par rapport au laser. La population de spermatozoïdes la plus fluorescente correspond aux spermatozoïdes bien orientés par rapport au laser.
 C. La fluorescence des spermatozoïdes bien orientés identifiés par le PMT à 90° (b) est simultanément mesurée par le PMT situé dans l'axe du laser (0°). Les populations de spermatozoïdes X et Y sont alors identifiées et triées par la migration du flux de gouttes chargées vers les électrodes.

Cette technique s'est révélée être efficace pour trier les spermatozoïdes de la plupart des espèces domestiques. Une pureté de 85-95 % peut être obtenue actuellement à un taux d'environ 15 millions de spermatozoïdes par heure (Johnson

et Welch, 1999). Le principal facteur limitant reste la vitesse de tri, celle-ci étant inversement liée à la pureté. Il est nécessaire de trouver un compromis entre la vitesse et la pureté en fonction des objectifs recherchés. Le chevauchement important des histogrammes de distribution de la fluorescence des populations X et Y contraint à sélectionner les extrémités des pics. Ceci conduit à ne retenir que 30 % des spermatozoïdes analysés. A vitesse de tri égale, la pureté des spermatozoïdes X est supérieure à celle des spermatozoïdes Y car ils se trouvent à l'extrémité du pic de fluorescence supérieure, moins sujet à une contamination par des spermatozoïdes X.

Si l'on tient compte du taux d'orientation correcte (70 %) et du taux de sélection après analyse (30 %), ceci conduit à trier effectivement 20 % des spermatozoïdes.

2.2 LE VOLUME DES SPERMATOZOÏDES

Van Munster *et al.* (1999) ont analysé le volume de la tête de spermatozoïdes bovins. Par une technique de microscopie quantitative suivie d'une analyse d'image informatisée, la surface et l'épaisseur de la tête sont mesurées, permettant le calcul du volume. La différence moyenne de volume mesurée entre les têtes des spermatozoïdes X et Y est de 3,8 %, valeur identique à la différence de leur contenu en ADN. Ceci montre bien qu'il existe une différence de taille mesurable entre les têtes des spermatozoïdes X et Y et qu'elle est due à leur différence de contenu en ADN.

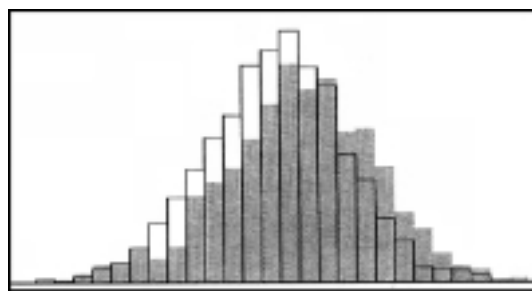


Figure 3 : distribution du volume de la tête des spermatozoïdes bovins mesuré par microscopie interférentielle. En blanc : les spermatozoïdes Y. En gris : les spermatozoïdes X. La différence moyenne de volume entre les spermatozoïdes X et Y est égale à la différence de contenu en ADN mais la variabilité intrapopulation est élevée, entraînant un chevauchement élevé des populations (d'après van Munster, 1999).

Le volume des spermatozoïdes serait un critère de tri très intéressant car il permettrait de s'affranchir de la coloration avec un fluorochrome et de l'excitation par un laser UV. Cependant, pour permettre le tri des spermatozoïdes, un critère doit bien sûr être suffisamment différent entre les populations X et Y mais également présenter une variation biologique la plus faible possible à l'intérieur de chaque population, celle-ci conditionnant le rendement du tri. D'après les mesures de la variabilité biologique du volume de la tête des spermatozoïdes réalisées par van Munster *et al.*, une sélection de 10 % des spermatozoïdes permettrait d'obtenir une pureté théorique de 80 %. Toutefois, les mesures effectuées sur les spermatozoïdes par van Munster et son équipe l'ont été sur des têtes isolées et non pas des spermatozoïdes entiers. La différence de taille entre spermatozoïdes entiers n'est donc pas connue. Il est possible que les variations de la taille du flagelle masquent les différences de taille entre les têtes des spermatozoïdes X et Y.

Afin d'utiliser la microscopie interférentielle comme outil de tri, un bloc d'optique interférentielle a été installé sur un cytomètre en flux classique (Van Munster, 2002). Cette mesure du volume de la tête des spermatozoïdes en flux a permis d'obtenir des fractions enrichies à 60-65 % en spermatozoïdes X ou Y à une fréquence de 300 cellules triées par seconde.

2.3 LES PROTEINES DE SURFACE

Afin de pallier à la complexité et à la lourdeur du tri individuel des spermatozoïdes par cytométrie, une séparation de masse des populations par un procédé simple a été envisagée.

Des systèmes de purification d'une population complète en une seule étape basés sur l'agglutination ou la séparation magnétique après reconnaissance par un anticorps spécifique existent déjà pour d'autres types cellulaires. C'est pourquoi la production d'anticorps spécifiques des spermatozoïdes X ou Y est recherchée. Ce concept *a priori* simple suppose qu'il existe des différences antigéniques entre les spermatozoïdes X et Y. L'expression du matériel génétique aboutissant à la production de protéines, on peut supposer que les différences de matériel génétique entre les spermatozoïdes X et Y induisent également des différences de contenu protéique. Cependant l'existence de ponts cytoplasmiques permettant l'échange de molécules entre les cellules germinales limite ces différences.

En effet, lors de la spermatogenèse, les cellules germinales, jusqu'au stade spermatide, sont reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques et forment un syncytium. Ce syncytium assure la diffusion de molécules entre les cellules d'un même stade.

Dans le processus de différenciation de la spermatogenèse, les spermatides sont la dernière étape avant le stade spermatozoïde. Les spermatides sont des cellules haploïdes post-méiotiques qui possèdent soit le chromosome X, soit le chromosome Y. Certains gènes présents uniquement sur le chromosome X ou sur le chromosome Y s'expriment spécifiquement au stade spermatide. On devrait donc s'attendre à ce que les ARNm issus de la transcription de ces gènes et les protéines issues de la traduction des ARNm soient localisés uniquement dans les spermatides (X ou Y) où les gènes s'expriment. Or les ARNm et les protéines sont retrouvés dans toutes les spermatides. Ce passage de l'ARNm via les ponts intercellulaires n'est pas un mécanisme de simple diffusion. En effet, certains ARNm possèdent une séquence de reconnaissance par une protéine appelée TB-RBP, c'est à dire qu'ils possèdent un site d'accrochage à ce transporteur. L'ARNm ainsi lié au TB-RBP est transmis aux différentes spermatides où il sera ensuite traduit en protéine.

Cette communication cellulaire entre les cellules germinales plaide en faveur d'une uniformité protéique des spermatozoïdes. De plus une analyse de la composition en protéines de la membrane de spermatozoïdes X ou Y séparés selon leur contenu en ADN n'a pas révélé de différence (Hendriksen, 1999). Cependant la technique utilisée, l'électrophorèse bidimensionnelle, ne permet pas de révéler toutes les protéines. Les protéines de petite taille (<15 kDa) ou de grande taille (>150 kDa) sont difficilement détectées, de même que les protéines aux caractéristiques

biochimiques particulières (forte hydrophobicité, forte acidité).

La méthode immunologique employée par Blecher *et al.* de l'Université de Guelph (Canada) a permis, par l'élimination dans un premier temps des protéines non spécifiques du sexe, d'identifier ensuite des protéines spécifiques du sexe. Des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques des spermatozoïdes X ont entraîné l'agglutination de la moitié des spermatozoïdes et les spermatozoïdes non agglutinés ont permis par FIV d'obtenir 90 % d'embryons mâles (Blecher *et al.*, 1999).

L'antigène H-Y est un antigène présent à la surface des spermatozoïdes et des embryons bovins. La littérature concernant H-Y est abondante et très controversée mais il est désormais clair que cet antigène est présent à la surface de tous les spermatozoïdes X et Y et ne peut être utilisé pour le tri des spermatozoïdes (Hendriksen *et al.*, 1993).

2.4 ELECTROPHORESE EN FLUX LIBRE

Cette méthode, qui repose sur l'hypothèse d'une différence de charge électrique de surface entre les spermatozoïdes X et les spermatozoïdes Y, consiste à séparer les spermatozoïdes en les soumettant à un champ électrique puissant. Les spermatozoïdes sont introduits par un flux de liquide conducteur dans un système d'électrophorèse et séparés en deux populations selon leur attraction induite par chacune des électrodes.

Un enrichissement en spermatozoïdes Y au niveau de l'anode et en spermatozoïdes X au niveau de la cathode a été décrit chez le taureau (Manger *et al.*, 1997, Blotner *et al.*, 1994) mais les résultats sont très variables selon les études et les espèces. De plus, le nombre très limité de spermatozoïdes qui peut être obtenu ainsi qu'une forte altération de leur mobilité par le champ électrique limite l'utilisation de cette méthode à la FIV.

2.5 PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES

De nombreux travaux ont tenté, en vain, de mettre en évidence des différences physiologiques entre les spermatozoïdes X et Y. Récemment des études semblent indiquer que le vieillissement de la semence *in vitro* (14 à 24 h à 34°C) favorise la production d'embryons femelle par FIV (Edwards *et al.*, 2004 ; Lechniak *et al.*, 2003).

Toutefois, il est connu que les embryons mâle et femelle produits *in vitro* présentent une vitesse de développement différente entraînant un sexe ratio variable selon le stade de développement observé. Il faut donc préciser si le vieillissement de la semence modifie réellement le sexe ratio des spermatozoïdes féconds au moment de l'insémination ou si il influe sur les vitesses de développement liées au sexe.

3. QUALITE ET FERTILITE DE LA SEMENCE SEXEE.

3.1 INFLUENCE DU PROCEDE DE TRI SUR LA VIABILITE DES SPERMATOZOÏDES.

Le tri des spermatozoïdes par cytométrie en flux conduit à une diminution de la viabilité de la semence. En étudiant l'influence des différentes étapes sur la qualité des spermatozoïdes, il apparaît que ce sont surtout les étapes de dilution / centrifugation et de cytométrie qui sont préjudiciables.

Dans le cas du taureau, les spermatozoïdes doivent d'abord être dilués à faible concentration pour permettre un tri optimal. Puis, lors de l'analyse et du tri, les spermatozoïdes sont conduits sous pression dans un système d'orientation de faible diamètre (70 µm) les contraignant à se présenter face au laser puis sont collectés dans un tube à une vitesse proche de 90 km / h. La collecte nécessite donc de réceptionner les spermatozoïdes sur un milieu assurant une protection mécanique et une conservation à température ambiante pendant une durée prolongée. Puis la dilution induite par le tri nécessite une étape de centrifugation pour concentrer la semence et permettre le conditionnement en vue de la congélation.

En revanche, il semble que l'incubation avec le fluorochrome et l'excitation par le laser n'aient pas d'influence directe sur leur viabilité. De plus, cette diminution de la qualité de la semence par le procédé de tri est compensée par le fait que seuls les spermatozoïdes vivants avant tri sont triés. En effet, le fluorochrome Hoechst 33342 utilisé permet l'analyse simultanée de la viabilité et du sexe des spermatozoïdes.

3.2 LA FERTILITE DE LA SEMENCE SEXEE

Le rendement actuel de tri par cytométrie en flux contraint à produire des doses de semence bovine congelée avec un nombre réduit de spermatozoïdes. Différents essais terrains ont permis de montrer qu'il était possible d'inséminer des génisses avec des doses de 2 millions de spermatozoïdes sexés tout en conservant une bonne fertilité, d'environ 80 % de celle obtenue avec des doses standards de 20 millions de spermatozoïdes non sexés (Seidel et Garner, 2002). Cette diminution de fertilité est liée à la fois au nombre faible de spermatozoïdes utilisés et à l'altération de la semence par le procédé de tri sans que l'influence respective de ces deux paramètres soit clairement établie. Toutefois, si la semence sexée est utilisable pour l'insémination des génisses, la chute de fertilité observée chez la vache est rédhibitoire.

Chez le mouton, des naissances ont été obtenues après FIV et transfert embryonnaire en utilisant de la semence congelée, sexée puis recongelée. Ces résultats préliminaires montrent que l'optimisation des techniques de tri et de congélation permet d'élargir l'utilisation du sexage à de la semence disponible sous forme congelée (Hollinshead *et al.*, 2004).

4. DISPONIBILITE DE LA METHODE ET PERSPECTIVES

La seule méthode de sexage des spermatozoïdes réellement efficace à ce jour est le tri par cytométrie en flux selon le contenu en ADN des spermatozoïdes bovins. Cette méthode est la propriété exclusive de la société XY, Inc (Fort Collins, Colorado). Le brevet comprend le système original d'orientation des spermatozoïdes, la coloration au Hoechst 33342 des spermatozoïdes et le tri par cytométrie en flux à haut débit. Le tri s'effectue avec un cytomètre spécialement conçu pour le sexage des spermatozoïdes de type MoFlo® de la société Cytomation (USA). La diffusion de cette technique est actuellement fortement limitée pour des raisons techniques et économiques. Le frein technique est la complexité de la cytométrie en flux, le faible rendement de

production de semence sexée et une baisse de fertilité limitant l'application aux génisses. Le frein économique est le coût de la licence, du cytomètre en flux et de sa maintenance et du personnel qualifié. En Europe, deux centres de production de semence ont acquis la licence et le matériel permettant la production et la commercialisation de semence sexée (Cogent au Royaume Uni et Big-X en Suisse).

Le monopole de XY, Inc sur le sexage a conduit plusieurs équipes à rechercher d'autres procédés. Il faut pour cela disposer d'un critère de tri et d'un outil adapté. En dépit de son coût (environ 300 000 €), de sa complexité et de ses limites en termes de capacité de tri (10 000 cellules /sec), la cytométrie en flux reste actuellement le meilleur outil de séparation à haut débit des spermatozoïdes. Plusieurs sociétés proposent des cytomètres en flux utilisables pour le tri des spermatozoïdes et dont l'interface informatique utilisateur / machine en pleine évolution facilite progressivement l'utilisation.

Le volume des spermatozoïdes pourrait être un critère de tri intéressant car il ne nécessite pas de marquage au Hoechst ni d'orientation par rapport au laser. Et même si la pureté théorique ne dépasse pas 80 %, elle pourrait être suffisante pour de nombreuses applications si le rendement de production était supérieur aux 10-20 % actuels. Il faudra cependant développer de nouveaux outils de mesure du volume sur les cytomètres en flux.

Les antigènes de surface restent une alternative d'intérêt car la purification avec anticorps nécessiterait très peu d'investissement en matériel avec un rendement élevé et un maintien de l'intégrité cellulaire. Mais pour l'instant les connaissances actuelles de la spermatogenèse semblent défavorables quant à l'existence d'antigènes spécifiques du sexe. Quant aux résultats prometteurs obtenus par Blecher en 1999, ils n'ont pas pu être reproduits en dépit d'une recherche développée pendant plusieurs années avec de grands moyens scientifiques et financiers par la société GENSEL (Canada).

Blecher S.R., Howie R., Detmar J., Blahut L.M., 1999. Theriogenology ; 52:1309-1321.

Blotner S., Bostedt H., Mewes K., Pitra C., 1994. Zentralbl Veterinarmed A. 41:466-74

Edwards J.L., Bredbacka P., Saxton A.M., Shrick F.N., 2004. Reproduction Fertility and Development 16:285-285.

Hendricksen P.J.M., 1999. Theriogenology ; 52:1295-1307.

Hendricksen P.J.M., Tieman M., van der Lende T., Johnson L.A., 1993. Molec Reprod Dev 35:189-196.

Hollinshead F.K., Evans G., Catt S.L., Maxwell W.M.C., O'Brien J.K., 2004. Reproduction 127:557-568.

Johnson L.A., Welch G.R., 1999. Theriogenology ; 52:1323-1341.

Johnson L.A., 2000. Animal reproduction Science 60-61:93-107.

Lechniak D., Strabel T., Bousquet D., King A.W., 2003. Reprod Domest Anim. Jun ; 38:224-7.

Manger M., Bostedt H., Schill W.B., Mileham A.J., 1997. Andrologia. 29:9-15.

Rens W, Welch GR, Johnson LA.,1998. Cytometry 33:476-481.

Seidel G.E., Garner D.L., 2002. Reproduction 124,733-743.

Van Munster E.B., Stap J., Hoebe R.A., Meerman G.J., Aten J.A., 1999. Theriogenology ; 52:1281-1293.

Van Munster E.B., 2002. Cytometry 47:192-9.