

DÉTERMINATION DU SEXE SENSIBLE À LA TEMPÉRATURE CHEZ UNE TORTUE (*EMYS ORBICULARIS*): IMPORTANCE DU COMPOSANT GÉNÉTIQUE

par

Marc GIRONDOT*, Jean SERVAN** et Claude PIEAU*

* Laboratoire de biochimie du développement, Institut Jacques Monod,
CNRS et Université Paris 7,
2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France

** Laboratoire d'Évolution des Systèmes Naturels et Modifiés,
Muséum National d'Histoire Naturelle,
36, rue Geoffroy-Saint-Hilaire,
75005 Paris, France

RÉSUMÉ

La détermination du sexe chez les reptiles est classée traditionnellement en deux catégories distinctes: la détermination du sexe génotypique (GSD) et la détermination du sexe dépendante de la température (TSD). Dans TSD, la sensibilité à la température présente une variabilité génétique, mais de nombreux auteurs admettent que cette dernière n'a que peu d'influence sur la détermination du sexe dans les conditions naturelles.

La tortue *Emys orbicularis* présente TSD. L'analyse de la sex ratio ponte par ponte à trois températures d'incubation (28,3, 28,5 et 28,7°C) dans l'intervalle de température de transition (TRT) permet de conclure que la différenciation sexuelle a bien une composante génétique polymorphe. Mais la sex-ratio varie quand même significativement d'une température à l'autre ce qui indique que, dans le TRT, la détermination du sexe demeure sensible à la température et n'est pas strictement génétique.

Dans le but de trouver un marqueur moléculaire du composant génétique, une nouvelle stratégie d'analyse du polymorphisme des séquences d'ADN répétées en tandem a été mise au point. Elle consiste à établir des profils de référence en hybridant une sonde oligonucléotidique de synthèse avec un mélange d'ADN de plusieurs individus mâles ou de plusieurs individus femelles, puis de comparer les profils individuels aux profils de référence.

Avec les sondes (GATA)₅ et (GGAT)₅, des bandes différentes chez les mâles et les femelles ont été mises en évidence. Cependant, ces bandes correspondent à des allèles rares qui, par le jeu du hasard, étaient plus représentés dans un sexe que dans l'autre. Par contre, la sonde (GGCT)₅ caractérise deux bandes d'ADN qui sont significativement plus présentes chez les mâles que chez les femelles. Cette différence entre les sexes n'est pas due à une méthylation différente de l'ADN.

Mots-clés: Détermination du sexe - Température - TSD - Composant génétique - Reptiles.

SUMMARY

Temperature-dependent sex determination in a turtle (*Emys orbicularis*): importance of genetic component. Two mechanisms of sex determination are generally distinguished in reptiles: genotypic sex determination (GSD) and temperature-dependent sex determination (TSD). In TSD, the sensitivity to temperature shows genetic variability. However, many authors consider that this variability has little influence in natural conditions.

The turtle *Emys orbicularis* exhibits TSD. Sex ratio has been analyzed, clutch by clutch, at three incubation temperatures (28.3, 28.5 et 28.7°C) in the transitional range of temperature (TRT). This analysis clearly reveals a polymorphic genetic component of sex determination. However, sex ratio varies significantly at each of these temperatures, thus indicating that in TRT, sex determination remains sensitive to temperature and is not strictly genetic. In order to find a molecular marker of the genetic component, a new strategy of analysis of the polymorphism of tandem repeats DNA has been carried out. Reference profiles are obtained by hybridization of a synthetic oligonucleotide probe with a mixture of DNA from several male individuals or from several female individuals. Then, individual profiles are compared to these reference profiles.

Different bands in males and in females have been obtained with (GATA)₅ and (GGAT)₅ probes. However, these bands correspond to rare alleles which, by chance, were more represented in one sex than in the other. With the (GGCT)₅ probe, two bands were significantly more present in males than in females, a sexual difference not due to a different methylation of DNA.

I - INTRODUCTION

La détermination du sexe présente une grande variété de formes chez les reptiles puisqu'à côté d'espèces ayant une détermination génotypique du sexe, -de type mâle hétérogamétique ou femelle hétérogamétique-, de nombreuses espèces présentent une sensibilité de la détermination du sexe à la température (BULL, 1980; RAYNAUD and PIEAU, 1985; JANZEN and PAUKSTIS, 1991).

En 1966, CHARNIER (1966) observa des sex ratios notablement déviées de 1 mâle: 1 femelle parmi des nouveau-nés d'un lézard, *Agama agama* (Agamidae) dont les oeufs avaient été mis à incuber dans des conditions différentes de température et de substrat. Elle avait émis l'hypothèse que chez les reptiles la température pouvait influencer la sex-ratio. Un peu plus tard, PIEAU (1970) fut frappé de n'obtenir que des embryons mâles de *Testudo graeca* à partir d'oeufs incubés à 26-27°C ou 30°C. En mettant à incuber à des températures différentes des oeufs de cette espèce et des oeufs d'*Emys orbicularis* (tortue aquatique indigène), il démontra que la température était bien le facteur influençant la détermination du sexe (PIEAU, 1971; PIEAU, 1972).

Ce phénomène, appelé TSD ("Temperature-dependent Sex Determination", BULL, 1980) a, depuis, été mis en évidence chez environ une centaine d'espèces de reptiles (JANZEN and PAUKSTIS, 1991). Les réponses à la température sont de quatre types. Le type A correspond à une différenciation femelle à basses températures et mâle à hautes températures. Il est observé chez quelques lézards. Dans le type B, une différenciation mâle s'effectue à basses températures et une différenciation femelle à hautes températures. Ce type s'observe chez plusieurs espèces de chéloniens. Le type C, différenciation femelle à basses et hautes températures, différenciation mâle à des températures intermédiaires, est décrit chez tous les crocodiliens étudiés ainsi que chez quelques tortues et quelques lézards. Enfin le type D correspond à une insensibilité de la détermination du sexe à la température d'incubation des oeufs; il est décrit chez des espèces appartenant à tous les ordres reptiliens à l'exception des crocodiliens (JANZEN and PAUKSTIS, 1991).

Dans le phénomène de TSD, la température influence la détermination du sexe pendant les premières étapes de la différenciation des gonades, généralement au début du deuxième tiers du développement embryonnaire (PIEAU and DORIZZI, 1981). De plus, il existe toujours un intervalle de température dans lequel les deux sexes peuvent être obtenus (PIEAU, 1988). Cet intervalle de température a été appelé le TRT ("transitional range of temperature", MROSOVSKY and PIEAU, 1991). Les gonades des individus incubés dans cet intervalle de température peuvent montrer des signes d'intersexualité à la fin de la période thermosensible, c'est à dire présenter à la fois un cortex ovarien plus ou moins développé et des cordons médullaires typiques de ceux observés dans un testicule. L'étude post-natale des gonades intersexuées montre qu'elles évoluent vers un type testiculaire (GIRONDOT, 1993).

L'amplitude du TRT varie de 0,5°C chez *Dermochelys coriacea* à 4,5°C chez *Chelonia mydas*, deux chéloniens ayant une détermination du sexe de type B. Chez ces deux espèces, l'incubation des oeufs est possible dans un intervalle de températures d'environ 10°C (PRIT pour "permissive range of incubation temperature"), ce qui signifie que chez *Chelonia mydas*, 45% des températures d'incubation dans le PRIT permettent d'obtenir les deux sexes au sein de mêmes pontes. Chez *Emys orbicularis*, le TRT est de 1,5°C et donc l'incubation dans 15% du PRIT permet d'obtenir les deux sexes.

Chez les tortues *Chelydra serpentina* et *Chrysemys picta*, une très forte héritabilité du caractère définissant la sex-ratio d'une ponte a été mise en évidence pour des incubations à température constante dans le TRT (BULL *et al.*, 1982; JANZEN, 1992). Dans cette héritabilité, la composante interaction température d'incubation et génotype est nulle et toute la variabilité est donc génétique (JANZEN, 1992). Ceci signifie donc qu'il existe un polymorphisme génétique dans la réponse de la détermination du sexe à la température d'incubation qui peut s'exprimer dans le TRT.

L'antigène H-Ys détectable par des méthodes sérologiques est considéré comme un marqueur du sexe hétérogamétique (ZABORSKI, 1985). L'étude de son expression dans les cellules sanguines d'individus mâles et femelles d'*Emys orbicularis* venant de populations naturelles de Brenne a permis de proposer l'existence d'un déterminisme génétique de type monogénique bi-allélique de la détermination du sexe, la température n'inversant le sexe que de moins de 10% des individus (SERVAN *et al.*, 1989; GIRONDOT *et al.*, 1994). Il semblerait donc qu'un composant génétique influence aussi la détermination du sexe dans des conditions naturelles. Mais les études de génétique des populations effectuées avec l'antigène H-Ys restent très limitées car l'expression de cet antigène est soumis à dominance. Une des catégories phénotypique est donc constituée de deux génotypes sans qu'il soit possible de calculer leur fréquence respective. Il convenait donc de rechercher un nouveau marqueur moléculaire.

Plusieurs techniques s'offraient à nous, mais dans tous les cas il fallait trouver un caractère génétique polymorphe présent à une fréquence différente chez les mâles et les femelles. Ce marqueur serait alors en déséquilibre gamétique avec le caractère qui influence la détermination du sexe en conditions naturelles. Mais cette recherche aurait nécessité le criblage de très nombreux locus polymorphes alors que la tortue *Emys orbicularis* est une espèce chez laquelle la génétique moléculaire n'est pas du tout développée et aucun marqueur polymorphe n'a été décrit jusqu'à présent. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser des séquences de type microsatellites (répétitions en tandem dans le génome de courtes séquences d'ADN) qui ont l'avantage d'être représentées quasi-ubiquitairement chez les eucaryotes avec un polymorphisme généralement très important (ARMOUR *et al.*, 1993). De plus, des séquences répétées en tandem GATA et GACA ont déjà été mises en évidence sur les chromosomes sexuels d'environ la moitié des espèces étudiées (EPPLEN, 1992), des répétitions de GGAT ont été détectées sur les chromosomes sexuels du guppy (NANDA *et al.*, 1990; NANDA *et al.*, 1992) et des répétitions de TTCCA sont présentes sur le chromosome Y humain (ALI *et al.*, 1992). Les VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) peuvent donc effectivement être des marqueurs génétiques des chromosomes sexuels. En revanche, contrairement à certaines hypothèses qui prédisaient un rôle particulier pour les séquences *Bkm* par exemple (répétitions en tandem de GATA et GACA) (JONES and SINGH, 1981; SINGH *et al.*, 1984; SCHÄFER *et al.*, 1986), la séquence des répétitions semble indépendante de la capacité du microsatellite à se trouver sur les chromosomes sexuels.

Le polymorphisme des VNTRs est tellement important que leur utilisation est très difficile pour les études de génétique des populations (GILBERT *et al.*, 1990). Pour éviter ce problème, une nouvelle stratégie d'étude des VNTRs a été mise au point. Elle consiste à séparer en plusieurs catégories les individus en fonction du caractère phénotypique que l'on cherche à mettre en relation avec un caractère génétique. Les ADN des individus de chaque catégorie sont groupés de façon à ce que chaque animal soit représenté par une quantité fixe d'ADN et ce regroupement est traité comme un seul échantillon. Lorsqu'un

locus révélé par un VNTR est lié génétiquement au caractère phénotypique distinguant deux catégories d'individus, une des bandes de révélation du VNTR peut être différente entre ces deux catégories. Cette technique peut être utilisée pour la recherche de différences génétiques entre les sexes.

Nous présentons ici les résultats préliminaires d'études entreprises chez la tortue *Emys orbicularis*. Dans un premier temps, nous avons recherché si un composant génétique influençait la sex-ratio des pontes d'*Emys orbicularis* lors d'incubations dans le TRT comme ce qui a été montré chez *Chelydra serpentina* et *Chrysemys picta*. L'hypothèse que la détermination du sexe est strictement génétique dans le TRT a pu être testée en comparant les résultats d'incubation à trois températures proches à l'intérieur du TRT. Dans un deuxième temps, nous avons recherché un nouveau marqueur de type microsatellite du composant génétique influençant la détermination du sexe dans des conditions naturelles.

II - MATÉRIELS ET MÉTHODES

II. 1 - Mise en évidence d'un composant génétique

a) Incubation et développement des oeufs

Les femelles d'*Emys orbicularis*, capturées en bordure des étangs de Brenne, ont pondu au laboratoire après injection intrapéritonéale d'ocytocine (4-5 UI). Les oeufs ont été incubés en atmosphère humide dans des incubateurs réglés à température constante placés eux-mêmes dans une pièce à température régulée (25°C). Rappelons que chez cette espèce, l'incubation des oeufs à des températures inférieures à 28°C donne 100% de mâles phénotypiques, alors qu'au dessus de 29,5°C, 100% de femelles phénotypiques sont obtenues (PIEAU, 1976; RAYNAUD and PIAU, 1985). Le TRT est donc 28-29,5°C. Les températures d'incubation dans le TRT ont été 28,3, 28,5 et 28,7°C, toutes à $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Les résultats présentés portent sur des incubations réalisées entre 1982 et 1992. De 1982 à 1989, les oeufs ont été groupés par ponte dans les incubateurs. A partir de 1990, ils ont été disposés au hasard dans les cristallisoirs grâce au tirage de nombres pseudo-aléatoires (QuickBasic 4.0, Microsoft). Le tableau 1 présente un récapitulatif année par année des pontes et des températures d'incubation utilisées. En se fondant sur la table de *Chelydra serpentina* (YNTEMA, 1968), 27 stades embryonnaires ont été définis chez *Emys orbicularis*, le stade 0 correspondant à la ponte, le stade 26 à l'éclosion. La période thermosensible pour la différenciation des gonades est comprise entre les stades 16 et 22 (PIEAU and DORIZZI, 1981). Les individus ont été sacrifiés à la fin de la vie embryonnaire (stades 24 et 25), à l'éclosion (stade 26) et après l'éclosion entre 1 et 14 mois.

c) Analyse statistique des sex-ratios

Pour mettre en évidence l'éventuelle participation d'un composant génétique présentant un polymorphisme dans la différenciation sexuelle lors d'incubations dans le TRT, la variance observée des sex ratios des différentes pontes (V_o) a été comparée à la variance théorique (V_t) qui peut être calculée si aucun polymorphisme génétique n'est impliqué dans la différenciation sexuelle. S'il existe un composant génétique polymorphe impliqué dans la différenciation sexuelle, alors la variance théorique (V_t) devrait être plus faible que la variance observée (V_o). En effet, plus la variabilité inter-ponte dans la probabilité de se différencier en mâle ou en femelle est forte, plus la variance des sex ratios des différentes pontes est importante. Pour chaque année, la variance théorique de la sex ratio par ponte sans intervention de composant génétique dans la différenciation sexuelle (V_t) ainsi que sa

variance ont été estimées par simulation de 5000 incubations effectuées avec le même nombre de pontes et d'œufs par ponte que l'incubation réelle. Pour la simulation des pontes d'une année donnée, la probabilité qu'un embryon soit mâle est donnée par la sex ratio (SR, fréquence des mâles) sans qu'il y ait de variabilité intra- ou inter-ponte dans cette probabilité. En effet, si cette variabilité est nulle, cela signifie qu'il n'existe pas de composant génétique polymorphe impliqué dans la différenciation sexuelle. La moyenne des variances théoriques (sans intervention d'un composant génétique polymorphe) ainsi que leur variance est estimée, pour chaque année, à partir de ces 5000 tirages et comparée à la variance observée. Le programme informatique (QuickBASIC et Pascal) permettant d'effectuer ces comparaisons est disponible sur la base de données WWW à l'adresse <http://bioldev1.ijm.jussieu.fr/abstracta/RESBSOCECO.html> (*via* Mosaic par exemple).

II .2 - Recherche d'un nouveau marqueur moléculaire du composant génétique

a) Capture des animaux

Tous les animaux utilisés pour cette étude ont été capturés dans des étangs de Brenne (Indre) à l'aide de pièges. Ils proviennent de l'étang Neuf et de l'étang des Fontenelles qui sont distants d'environ 20 m et sont reliés par un ruisseau ainsi que de l'étang des Salles qui est distant des précédents de 20 km. Le sang est prélevé à une patte antérieure dans une seringue héparinée. Le sang est laissé 1 heure à 4°C en décantation et le culot de cellules sanguines est congelé et conservé à -80°C avant traitement. Après la prise de sang, les animaux sont marqués et relâchés.

b) Préparation de l'ADN génomique

Tous les produits chimiques utilisés proviennent des établissements Merck sauf quand le fournisseur est cité. L'ADN génomique est préparé à partir des cellules sanguines de tortues (toutes nucléées) selon un protocole utilisé pour extraire l'ADN des lymphocytes humains (JEANPIERRE, 1987). Après décongélation, 100 à 500 µl de cellules sanguines sont remises en suspension dans 5 ml de tampon PBS 1x (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 6,7 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM pH 7,4) . Seize ml de solution de lyse (14:16 de chlorure de guanidine 6 M; 1:16 de sarkosyl de sodium 20%; 1:16 d'acétate d'ammonium 7,5 M) sont ajoutés, ainsi que 150 µl de protéinase K à 10 mg/ml; l'ensemble est agité pendant 1 heure à 68°C ou 16 heures à 37°C. Une extraction phénolique est effectuée par addition de 10 ml de phénol saturé en tris-HCl 10 mM pH 7 (Interchim) et 10 ml d'une solution 24:1 de chloroforme et alcool isoamylique. L'ensemble est agité pendant 10 mn et centrifugé à 1000 g pendant 10 min. La phase aqueuse est retirée avec une seringue et l'ADN est précipité par ajout de 20 ml d'éthanol absolu à température ambiante. Le précipité d'ADN est lavé dans 10 ml d'éthanol absolu puis dans 10 ml d'éthanol 70%. Il est séché à l'air puis repris dans 1 ml de Tris-EDTA (Tris-base 10 mM; EDTA 1 mM pH 7 avec HCl 6 M) et agité à 4°C jusqu'à remise en solution.

c) Marquage des sondes oligonucléotidiques

Des sondes (GATA)₅, (GGAT)₅, (GATT)₅ et (GGCT)₅ ont été synthétisées à l'institut Jacques Monod (Service de synthèse d'oligonucléotides, M^me C. Dubuc). Elles sont marquées par ajout d'une queue poly-A/U-digoxigénine en utilisant le "DIG-DNA trailing kit" (Boehringer) selon les recommandations du fabricant. Pour chaque réaction, 100 pmol de chaque sonde sont marquées. Les nucléotides non-incorporés sont retirés par précipitation avec l'isopropanol. Le culot est repris dans 50 µl de Tris-EDTA.

d) *Électrophorèse et transfert*

Quarante μl de chaque échantillon d'ADN génomique sont digérés par 20 unités d'enzyme de restriction *Alu I* et 4 μl du tampon de réaction approprié (Gibco BRL) pendant 4 heures à 37°C. La quantité d'ADN par échantillon est alors mesurée par fluorimétrie (TKO 100, Hoefer Scientific Instruments) en présence du fluorochrome Hoeschst 33258. Deux μl de l'échantillon à tester sont dilués dans 2 ml de TNE 1x et la fluorescence est lue à 460 nm après excitation du fluorochrome à 365 nm. La quantité d'ADN dans l'échantillon est estimée par comparaison avec un standard d'ADN de thymus de veau à 100 mg/ml.

Le gel de 1 cm d'épaisseur est composé de 0,8% d'agarose (Appligène) dans un tampon Tris-base 0,036 M; NaH_2PO_4 0,03 M; EDTA 0,01 M pH 7,5 avec HCl 6 M. Le tampon d'électrophorèse est le même que le tampon du gel. Dans chaque puits, un volume correspondant à 10 μg d'ADN ajusté à 30 μl avec de l'eau distillée et 6 μl de solution de charge (Ficoll 400, 20%; bleu de bromophénol, 0,1%) sont déposés. Dans 2 ou 3 puits, le marqueur de poids moléculaire 1Kb ladder (Gibco BRL) est déposé.

L'électrophorèse est conduite pendant 14 heures à 50 V et 170 mA en chambre froide avec une circulation et une agitation du tampon d'électrophorèse.

A la fin de la migration, le gel est mis dans les bains successifs suivants:

- | | |
|---|--------------------|
| - HCl 0,25 M | 40 min puis 10 min |
| - NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M | deux fois 15 min |
| - eau distillée | deux fois 15 min |
| - Tris-base 10 mM; NaCl 1,5 M pH 7,5 avec HCl 6 M | deux fois 15 min |

Le transfert sur membrane de Nytran (Schleicher & Schüll) est effectué en pression positive (Posiblot, Stratagène) en présence de SSC 10x (SSC 20x : NaCl 3 M; citrate de sodium 0,3 M) pendant 1 heure. La membrane est ensuite lavée pendant 5 min dans du SSC 6x et séchée grossièrement. L'ADN est fixé sur la membrane par une exposition à 365 nm, 120 mJ/cm^2 (Stratalinker 1800, Stratagène). La partie de la membrane où se trouvent les marqueurs de poids moléculaire est découpée et colorée au bleu de méthylène (Sigma) (WILKINSON *et al.*, 1991). L'autre partie de la membrane placée dans un sac scellé est mise en présence de 20 ml de la solution de préhybridation (11 ml d'eau distillée; 2,3 ml de Denhardt 50x; 6,9 ml de SSC 20x; 2 ml d'une solution à 10% de blocking reagent; 575 μl de SDS 20%) pendant au moins 2 heures à 45°C.

e) *Hybridation, lavages et révélation*

La membrane est placée dans un autre sac à 45°C pendant 14 heures avec 20 ml de la solution d'hybridation additionnée de 4 μl de la solution d'oligonucléotides marqués (≈ 10 pmol). Les oligonucléotides non fixés spécifiquement sont alors éliminés par deux lavages à température ambiante de 30 min dans 250 ml de SSC 2x, SDS 0,1% puis deux lavages de 30 min dans des solutions identiques à 45°C. La révélation avec un anticorps anti-digoxigénine (Boehringer) puis du lumigen PPD (Boehringer) est effectuée selon les indications du fabricant. La révélation est effectuée avec un film pour autoradiographie.

Les profils d'hybridation sont alors numérisés (OneScanner et Quadra 700, Apple) pour être analysés.

III - RÉSULTATS

III. 1 - Analyse des sex-ratios

Les résultats des sex ratios sont donnés par ponte et par année dans le tableau 1.

Un effet très significatif de la température d'incubation sur la sex ratio par ponte est observé ($F_{56}^2 = 10,58$; $P < 0,0001$). Les sex ratios (SR, fréquence des mâles) sont significativement différentes pour les 3 températures d'incubation (test t multiple protégé; $28,3^\circ\text{C}$ vs. $28,5^\circ\text{C}$: $P < 0,005$; $28,5^\circ\text{C}$ vs. $28,7^\circ\text{C}$: $P < 0,05$; $28,3^\circ\text{C}$ vs. $28,7^\circ\text{C}$: $P < 0,001$) et peuvent être classées:

$$SR_{28,3^\circ\text{C}} > SR_{28,5^\circ\text{C}} > SR_{28,7^\circ\text{C}}$$

Durant les années 1982-1989, les oeufs n'ont pas été mis dans les incubateurs au hasard et on ne peut pas rejeter un effet local de différences de température lors de l'incubation. Ces données ne sont pas incluses dans le test. Pour les années 1990-1992, les variances observées et les variances théoriques comparées par un test ϵ année par année ne sont pas significativement différentes (tableau 1). Par contre lorsque les trois années sont prises globalement, la variance observée (V_o) de la sex ratio par ponte est significativement plus forte que la variance théorique (V_t) (test t de données appariées; $t = 4,895$; $dl = 2$; $P < 0,05$) ce qui signifie qu'il existe bien un composant génétique polymorphe influençant la détermination du sexe lors d'incubations dans le TRT.

III. 2 - Recherche d'un nouveau marqueur moléculaire du composant génétique

Une analyse du polymorphisme individu par individu montre un profil de restriction très complexe et il est très difficile de trouver des bandes significativement plus présentes dans un sexe que dans l'autre (non montré). Pour pallier cet inconvénient, les ADN des animaux ont été regroupés en fonction de leur phénotype sexuel. Parmi les quatre sondes utilisées, seule $(GATT)_5$ n'a donné aucune hybridation alors que la sonde était normalement marquée.

Lors de l'hybridation avec la sonde $(GATA)_5$, deux bandes (une de haut poids moléculaire, l'autre de bas poids moléculaire) apparaissent différentes chez les femelles et les mâles de Brenne (figure 1A). La bande de plus haut poids moléculaire correspond à une bande retrouvée chez deux mâles sur les 13 testés et chez une femelle sur les 32 testées. Cette bande correspond donc à un allèle rare qui n'est pas spécifique du sexe (test exact de Fisher, $P > 0,15$). La bande de bas poids moléculaire est dans une zone de faible résolution du gel et le dénombrement des individus ayant cette bande n'a pas pu être effectué.

Lorsque l'hybridation est effectuée avec $(GGAT)_5$, une bande apparaît absente chez les mâles et présente chez les femelles (figure 1B). Cette bande n'est retrouvée que chez 4 femelles sur 29 testées et chez 1 mâle sur 11 testés. Le mâle chez lequel cette bande est présente vient de l'étang des Salles, ce qui explique qu'elle n'ait pas été détectée dans le regroupement des mâles qui ne comportait que les animaux des étangs Neuf et des Fontenelles. Cette bande correspond également à un allèle rare non spécifique du sexe (test exact de Fisher, $P > 0,99$). Pour éviter que des allèles rares n'apparaissent différemment chez les mâles et les femelles simplement par le jeu du hasard, le nombre de mâles a été porté de 10 à 17 et le nombre de femelles de 29 à 35 dans le test suivant.

Tableau 1. Sex ratios parmi des individus issus d'oeufs d'*Emys orbicularis* mis en incubation dans l'intervalle de température de transition (TRT), par ponte et par an. Pour chaque ponte (P^{te}), le nombre de mâles+intersexués (M) et le nombre de femelles (F) sont donnés. La sex ratio (SR) est calculée en terme de fréquence des mâles en prenant l'ensemble des oeufs d'une année. Elle est suivie de son écart-type. Vo indique la variance observée de la sex ratio par ponte, Vt la variance théorique calculée par simulation ainsi que sa variance, ε est l'écart réduit de la comparaison des variances Vo et Vt par leur différence et P est le risque de première espèce. La température d'incubation (T°C) est indiquée ($\pm 0,1^\circ\text{C}$). Dans les pontes suivantes, des oeufs n'ont pas éclos:

1 oeuf non-éclos: 82.III et .VIII, 83.V et .IX, 87.VII, 88.VII, .VIII et .IX, 89.I, 90.V

2 oeufs non-éclos: 83.II, 88.III et .V, 89.II et .IV, 90.I, .II, .III et .VI

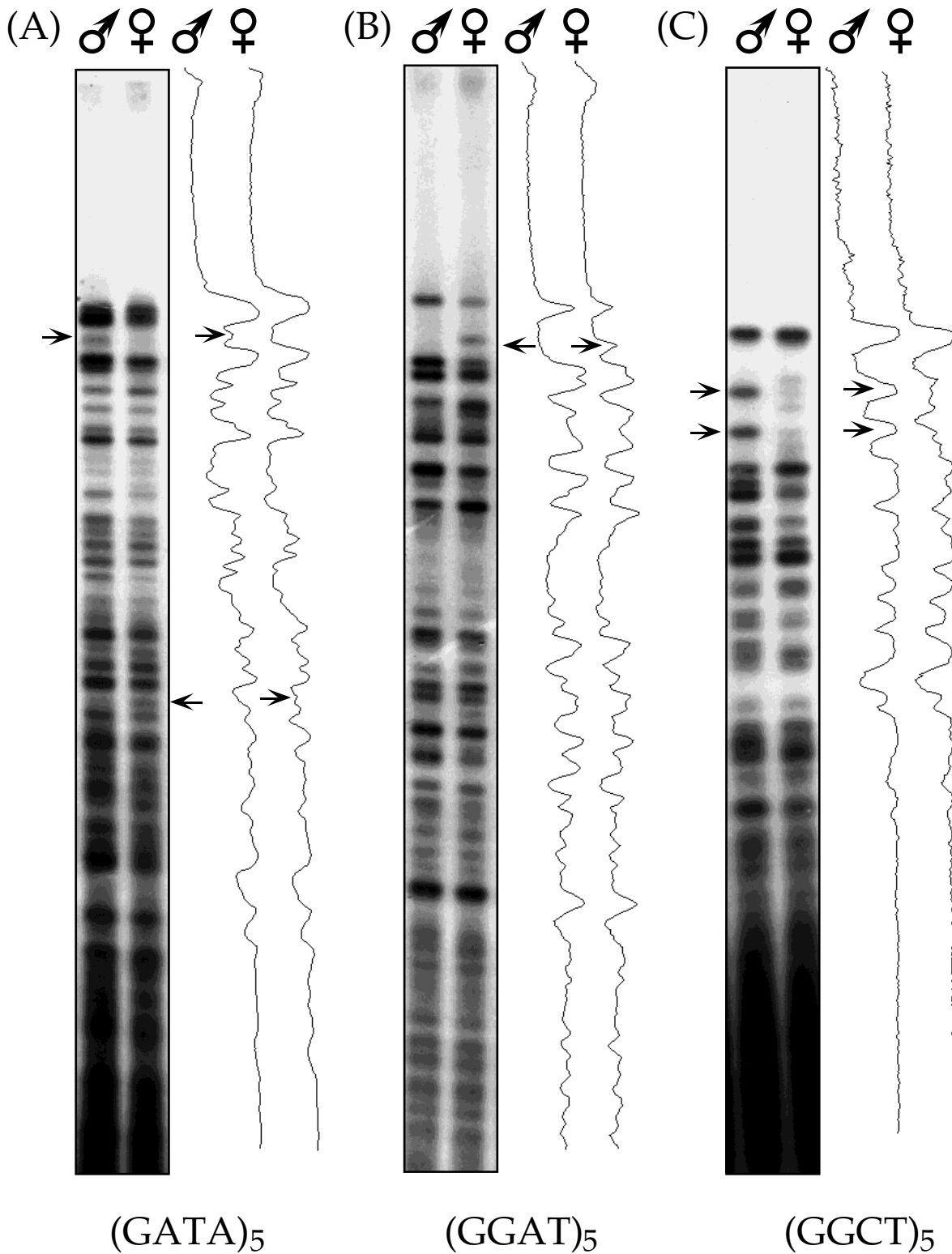
3 oeufs non-éclos: 87.V, 89.V, 90.VIII et .IX, 91.II

4 oeufs non-éclos: 89.VI, 90.VII, 91.I, 92.II

Années

Pte	1982		1983		1987		1988		1989		1990		1991		1992	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
I	3	4	1	5	16	0	10	0	0	9	0	7	3	5	4	3
II	5	2	2	4	9	0	11	0	0	9	0	7	6	3	0	3
III	1	6	5	2	2	7	4	0	2	5	0	8	3	5	3	4
IV	5	1	6	0	12	0	3	7	0	12	2	8	9	1	2	6
V	8	1	0	8	5	1	6	2	4	2	1	8	8	1		
VI	2	9	1	8	4	7	7	2	4	4	4	10				
VII	1	6	0	10	5	0	9	0			2	4				
VIII	5	1	3	5			5	3			5	1				
IX	4	6	4	1			0	6			4	4				
X							7	1								
Tal	34	36	22	43	53	15	62	21	10	41	18	57	29	15	9	16
SR	0,48 \pm 0,06		0,33 \pm 0,06		0,77 \pm 0,05		0,74 \pm 0,05		0,19 \pm 0,05		0,24 \pm 0,05		0,65 \pm 0,07		0,36 \pm 0,10	
Vo	0,0961		0,1296		0,1089		0,1156		0,0841		0,0729		0,0676		0,0576	
Vt	0,0299 0,0002		0,0286 0,0002		0,0177 0,0001		0,0216 0,0001		0,0156 0,0001		0,0199 0,0001		0,0205 0,0002		0,0325 0,0006	
ε	1,39		1,61		1,54		1,78		1,38		1,48		1,04		0,51	
P	0,17		0,11		0,13		0,08		0,17		0,14		0,30		0,62	
T°C	28,5		28,5		28,3		28,3		28,7		28,7		28,5		28,5	

Figure 1. Hybridation des oligonucléotides $(GATA)_5$, $(GGAT)_5$ et $(GGCT)_5$ sur de l'ADN coupé par *Alu I* d'individus regroupés en fonction de leur phénotype sexuel (10 mâles et 29 femelles des étangs Neuf et Fontenelles pour les deux premières sondes et 17 mâles et 35 femelles des étangs Neuf, Fontenelles et Salles pour la dernière). Les profils digitalisés de chaque catégorie sont présentés. Les flèches indiquent des bandes potentiellement spécifiques du phénotype sexuel (voir texte).



L'hybridation avec la sonde (GGCT)₅ montre deux bandes très intenses chez les mâles et de faible intensité chez les femelles (figure 1C). Ces deux bandes sont présentes chez 9 mâles sur 17 testés et chez 8 femelles sur 36 testées. La liaison du phénotype sexuel avec la présence de ces deux bandes est significative (test exact de Fisher, $P < 0,04$). De plus, ces deux bandes sont toujours détectées ensemble alors que les autres bandes des profils individuels présentent du polymorphisme.

Il est peu probable que les différences relevées ici entre les mâles et les femelles soient dues à une différence de méthylation entre l'ADN des mâles et celui des femelles. En effet, l'enzyme de restriction utilisé, *Alu I*, coupe entre les G et C dans des séquences XAG↓CTY si les A et C ne sont pas méthylés. Les sites de méthylation chez les vertébrés sont les séquences de type CpG, séquence absente du site de coupure de l'enzyme *Alu I* quelles que soient les bases X et Y.

IV - DISCUSSION

L'analyse des sex ratios obtenues de 1990 à 1992 chez des individus issus d'oeufs incubés dans TRT prouve l'existence d'un composant génétique polymorphe impliqué dans la détermination du sexe chez *Emys orbicularis*. En effet, la variance observée des sex ratios par ponte est significativement plus forte que la variance théorique obtenue s'il n'y avait pas de différence de probabilité d'être mâle ou femelle entre pontes. Ce résultat est compatible avec la très forte héritabilité du caractère définissant la sex ratio à la température seuil chez *Graptemys ouachitensis* (BULL *et al.*, 1982) et *Chelydra serpentina* (Janzen, 1992). Dans l'hypothèse où la détermination du sexe dans le TRT est strictement génétique (PIEAU, 1973; PIAEU, 1974), aucune différence entre les sex ratios à 28,3°C, 28,5°C et 28,7°C n'aurait dû être observée. Or, les différences de sex ratios entre ces trois températures sont significatives. L'effet de la température semble donc se superposer de façon graduelle à celui du composant génétique lors d'incubation à température constante.

La présence d'un composant génétique impliqué dans la sensibilité de la détermination du sexe avait déjà été proposée chez *Emys orbicularis* lors d'études de l'expression de l'antigène H-Ys. Cet antigène est exprimé de façon constitutive dans les tissus extra-gonadiques (ZABORSKI *et al.*, 1982; ZABORSKI *et al.*, 1988). A 28,5°C, il est plus fortement exprimé chez les animaux qui se différencient en femelles que chez ceux qui se différencient en mâles (ZABORSKI *et al.*, 1988). Les embryons incubés à 25°C (phénotype mâle) ou 30°C (phénotype femelle) sont de phénotype H-Ys⁺ ou H-Ys⁻ indépendamment de leur phénotype sexuel (ZABORSKI *et al.*, 1988). L'interprétation proposée pour expliquer ce résultat est qu'un facteur régulant l'expression de l'antigène H-Ys est lié génétiquement au composant génétique de la différenciation sexuelle chez *Emys orbicularis*.

Mais comme nous l'avons vu, une forte expression de H-Ys est un marqueur dominant et l'étude de son expression est peu appropriée pour une approche génétique à l'échelle des populations. Un nouveau marqueur du composant génétique est décrit ici pour les populations de Brenne. Il correspond à un locus riche en répétitions de GGCT. L'analyse de ce locus n'est pas terminée et, en particulier, les hétérozygotes n'ont pas encore été caractérisés. Le clonage de ce locus, étape obligée pour la compréhension de sa structure, ne sera pas chose aisée car les VNTRs subissent des réarrangements lors des procédures de clonage et l'ADN cloné peut être très différent de l'ADN initial (STUDER *et al.*, 1991).

Dans un premier temps, une analyse plus fine avec d'autres enzymes de restriction semble indispensable.

Les résultats préliminaires obtenus dans cette étude indiquent que les répétitions en tandem de GGCT sont portées chez *Emys orbicularis* sur des chromosomes sexuels non différenciés morphologiquement. La séquence (GGCT)₁₀ a été recherchée dans les banques de données Genbank (version 77.0) et EMBL (version 35.0) par le service BLAST du National Center for Biotechnology Information (NCBI, NIH). Deux séquences présentent 100% d'identité sur les 40 bases. Elles correspondent à des régions d'ADN ribosomique chez le lépidoptère *Bombyx mori* et chez l'amphibien anoure *Ascaphus truei*. Le seul chromosome portant un organisateur nucléolaire chez *Emys orbicularis* est un chromosome télocentrique de taille moyenne (SCHMID *et al.*, 1982). Cependant, il est impossible de conclure avec certitude quant à une possible localisation de la séquence (GGCT)_n près des gènes ribosomiques chez *Emys orbicularis* car les séquences répétées en tandem peuvent être perdues ou acquises très rapidement à un locus particulier dans une lignée phylogénétique (HARDING *et al.*, 1992).

Enfin, il convient d'être réservé quant à la possibilité de mettre en parallèle directement le composant génétique révélé lors d'incubations dans le TRT avec celui révélé avec la sonde (GGCT)₅ dans des populations naturelles. En effet, toutes les incubations effectuées dans le TRT se passent à température constante, alors que les oeufs incubés dans les conditions naturelles subissent des fluctuations de température très importantes pendant les 12-15 jours pendant lesquels la détermination du sexe est sensible à la température d'incubation. Des études de ségrégation du marqueur GGCT lors d'incubation dans le TRT seront donc nécessaires pour prouver définitivement que ce marqueur est bien lié au locus portant le composant génétique influençant la détermination du sexe.

BIBLIOGRAPHIE

- ALI, S., GAURI, S. and BALA, S. - 1992 - A synthetic oligonucleotide probe (5'TTCCA 3')_n uncovers a male specific hybridization pattern in the human genome. **Mol Cell Probe**, 6: 521-525.
- ARMOUR, J.A.L., MONCKTON, D.G., NEIL, D.L., CROSIER, M., TAMAKI, K., MACLEOD, A. and JEFFREYS, A.J. 1993. Minisatellite mutation and recombination. In Summer, A.T. and Chandley, A.C. (eds.), *Chromosome Today*. Chapman & Hall, London, Vol. 11, pp. 406.
- BULL, J.J. - 1980 - Sex determination in reptiles. **Quart. Rev. Biol.**, 55: 3-21.
- BULL, J.J., VOGT, R.C. and BULMER, M.G. - 1982 - Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination. **Evolution**, 36: 333-341.
- CHARNIER, M. - 1966 - Action de la température sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (*Agamidae*, Lacertilien). **C. R. Soc. Biol. Paris**, 160: 620-622.
- EPPLEN, J.T. 1992. The methodology of multilocus DNA fingerprinting using radioactive or non-radioactive oligonucleotide probes specific for simple repeat motifs. In Chrambach, A., Dunn, M.J. and Radola, B.J. (eds.), *Advances in electrophoresis*. VCH, Weinheim, FRG, Vol. 5, pp. 59-112.

GILBERT, D.A., LEHMAN, N., O'BRIEN, S.J. and WAYNE, R.K. - 1990 - Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California channel island fox. **Nature**, 344: 764-767.

GIRONDOT, M. 1993. Analyse des facteurs génétiques et épigénétiques impliqués dans la détermination du sexe chez les reptiles. **Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6- Pierre et Marie Curie**.

GIRONDOT, M., ZABORSKI, P., SERVAN, J. and PIEAU, C. - 1994 - Genetic contribution to sex determination in turtles with environmental sex determination. **Genet. Res.**, 63: 117-127.

HARDING, R.M., BOYCE, A.J. and CLEGG, J.B. - 1992 - The evolution of tandemly repetitive DNA - recombination rules. **Genetics**, 132: 847-859.

JANZEN, F.J. - 1992 - Heritable variation for sex ratio under environmental sex determination in the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*). **Genetics**, 131: 155-161.

JANZEN, F.J. AND PAUKSTIS, G.L. - 1991 - Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution, and experimental design. **Quart. Rev. Biol.**, 66: 149-179.

JEANPIERRE, M. - 1987 - A rapid method for the purification of DNA from blood. **Nucleic Acid Res.**, 15: 9611.

JONES, K.W. and SINGH, L. - 1981 - Conserved repeated DNA sequences in vertebrate sex chromosomes. **Hum. Genet.**, 58: 46-53.

MROSOVSKY, N. and PIEAU, C. - 1991 - Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. **Amphibia-Reptilia**, 12: 169-179.

NANDA, I., FEICHTINGER, W., SCHMID, M., SCHRÖDER, J.H., ZISCHLER, H. and EPPLER, J.T. - 1990 - Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. **J. Mol. Evol.**, 30: 456-462.

NANDA, I., SCHARTL, M., FEICHTINGER, W., EPPLER, J.T. and SCHMID, M. - 1992 - Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. **Chromosoma**, 101: 301-310.

PIEAU, C. - 1970 - Effets de l'oestradiol sur l'appareil génital de l'embryon de tortue mauresque (*Testudo graeca* L.). **Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp.**, 59: 297-318.

PIEAU, C. - 1971 - Sur la proportion sexuelle chez les embryons de deux Chéloniens (*Testudo graeca* L. et *Emys orbicularis* L.) issus d'oeufs incubés artificiellement. **C. R. Acad. Sci. Paris**, 272(D): 3071-3074.

PIEAU, C. - 1972 - Effets de la température sur le développement des glandes génitales chez les embryons de deux Chéloniens, *Emys orbicularis* L. et *Testudo graeca* L. **C. R. Acad. Sci. Paris**, 274(D): 719-722.

- PIEAU, C. - 1973 - Nouvelles données expérimentales concernant l'effet de la température sur la différenciation sexuelle chez les embryons de Chéloniens. **C. R. Acad. Sc. Paris**, 277: 2789-2792.
- PIEAU, C. - 1974 - Différenciation du sexe en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chélonien); effets des hormones sexuelles. **Ann. Embryol. Morphog.**, 7: 365-394.
- PIEAU, C. - 1976 - Données récentes sur la différenciation sexuelle en fonction de la température chez les embryons d'*Emys orbicularis*. **Bull. Soc. Zool. France**, 101: 46-53.
- PIEAU, C. - 1988 - Températures seuils et différenciation sexuelle chez les reptiles. **Bull. Soc. Ecophysiol.**, 12: 101-113.
- PIEAU, C. and DORIZZI, M. - 1981 - Determination of temperature sensitive stages for sexual differentiation of the gonads in embryos of the turtle, *Emys orbicularis*. **J. Morph.**, 170: 373-382.
- RAYNAUD, A. and PIEAU, C. 1985. Embryonic development of the genital system. In Gans, C. and Billett, F. (eds.), *Biology of the Reptilia*. John Wiley and Sons, New York, Vol. 15, Development B, pp. 149-300.
- SCHÄFER, R., BÖLTZ, E., BECKER, A., BARTELS, F. and EPPLEN, J.T. - 1986 - The expression of the evolutionarily conserved GATA/GACA repeats in mouse tissues. **Chromosoma**, 93: 496-501.
- SCHMID, M., LÖSER, C., SCHMIDTKE, J. and ENGEL, W. - 1982 - Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. **Chromosoma**, 86: 149-179.
- SERVAN, J., ZABORSKI, P., DORIZZI, M. and PIEAU, C. - 1989 - Female-biased sex-ratio in adults of the turtle *Emys orbicularis* at the northern limit of its distribution in France: a probable consequence of interaction of temperature with genotypic sex determination. **Can. J. Zool.**, 67: 1279-1284.
- SINGH, L., PHILLIPS, C. and JONES, K.W. - 1984 - The conserved nucleotide sequences of *Bkm*, which define *Sxr* in the mouse, are transcribed. **Cell**, 36: 111-120.
- STUDER, R., KAMMERBAUER, C., ZISCHLER, H. and HINKKANEN, A. - 1991 - Highly instable (GATA)_n-containing sequences of the mouse during the cloning process. **Electrophoresis**, 12: 153-158.
- WILKINSON, M., DOSKOW, J. and LINDSEY, S. - 1991 - RNA blots: staining procedures and optimization of conditions. **Nucleic Acid Res.**, 19: 679-680.
- YNTEMA, C.L. - 1968 - A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. **J. Morph.**, 125: 219-251.
- ZABORSKI, P. - 1985 - H-Y antigen in nonmammalian vertebrates. **Arch. Anat. microsc. Morphol. exp.**, 74: 33-37.

ZABORSKI, P., DORIZZI, M. and PIEAU, C. - 1982 - H-Y antigen expression in temperature sex-reversed turtles (*Emys orbicularis*). **Differentiation**, 22: 73-78.

ZABORSKI, P., DORIZZI, M. and PIEAU, C. - 1988 - Temperature-dependent gonadal differentiation in the turtle *Emys orbicularis*: Concordance between sexual phenotype and serological H-Y antigen expression at threshold temperature. **Differentiation**, 38: 17-20.