

What are the advantages and limits of sex determination in the equine species ?

Auteur : Khiate, Merwan

Promoteur(s) : Deleuze, Stefan

Faculté : Faculté de Médecine Vétérinaire

Diplôme : Master en médecine vétérinaire

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/12462>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

QUELS SONT LES INTÉRÊTS ET LES LIMITES DU SEXAGE DANS L'ESPECE ÉQUINE?

WHAT ARE THE INTEREST AND LIMITATIONS IN THE EQUINE SPECIES?

Merwan KHIATE

Travail de fin d'études

présenté en vue de l'obtention du grade
de Médecin Vétérinaire

ANNÉE ACADEMIQUE 2020/2021

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

QUELS SONT LES INTÉRÊTS ET LES LIMITES DU SEXAGE DANS L'ESPECE ÉQUINE?

WHAT ARE THE INTEREST AND LIMITATIONS IN THE EQUINE SPECIES?

Merwan KHIATE

Tuteur : Dr Stefan Deleuze, Dipl ECAR, PhD

Travail de fin d'études

présenté en vue de l'obtention du grade
de Médecin Vétérinaire

ANNÉE ACADÉMIQUE 2020/2021

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

QUELS SONT LES INTÉRÊTS ET LES LIMITES DU SEXAGE DANS L'ESPECE ÉQUINE?

OBJECTIF DU TRAVAIL:

Offrir une vision sur les techniques actuelles du sexage dans l'espèce équine ainsi que ses perspectives.

RESUME:

Chez les équidés, la détermination du sexe du conceptus présente un intérêt croissant pour l'industrie de l'élevage. Contrairement à d'autres espèces, les chevaux présentent plusieurs particularités de reproduction qui interfèrent avec les technologies de procréation assistée utilisées chez d'autres grands animaux (comme les bovins) et les rendent difficiles à appliquer. Plusieurs techniques ont été développées afin de servir cet objectif. Que ce soit pour des raisons personnelles, sportives ou économiques, il y a donc un grand intérêt à déterminer le sexe de la progéniture le plus tôt possible. Cela a conduit au développement de plusieurs moyens à cet effet qui vont de la manipulation du sex-ratio, au sexage d'embryons ou encore à la détection du sexe in-utero mais aussi de nouvelles techniques qui sont au coeur de la recherche actuelle. Ce travail offre un aperçu de l'état présent de ces procédures, de leurs intérêts et de leur applicabilité ainsi qu'une vision sur les limites et les conditions pratiques de celles-ci.

WHAT ARE THE INTEREST AND LIMITATIONS IN THE EQUINE SPECIES?

AIM OF THE WORK :

To provide a vision on the current techniques of sexing in the equine species and its perspectives

RESUME:

In the equine species, sex determination is of increasing interest to the breeding industry. Unlike other species, horses exhibit several reproductive peculiarities that interfere with assisted reproductive technologies used in other large animals (such as cattle) and make them difficult to apply. Several techniques have been developed to serve this purpose. Whether for personal, sporting or economic reasons, there is therefore a great interest in determining the sex of the offspring as early as possible. This has led to the development of several means for this purpose from manipulation of sex ratio, to sexing of embryos or even to the detection of in-utero sex, but also new techniques which are in the middle of current research. This work offers an overview of the present state of these procedures, their interests and their applicability as well as a vision of their limits and practical conditions.

Remerciements

Au Dr. Stefan Deleuze pour sa disponibilité, ses bons conseils et sa bonne humeur qui ont rendu ce travail des plus agréables.

À mes parents sans qui je n'aurais pas pu réaliser ces études et qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours.

À Lola, qui me m'accompagne au quotidien, avec qui je partage tout et qui me pousse à dépasser mes limites.

À la grande famille cureghemoise, dans laquelle j'ai investi tant de temps et d'énergie, qui me l'a rendu au centuple.

Table des matières

1. Introduction	1
2. Rappel du développement embryonnaire	2
2a. Gène SRY	2
2b. Organogenèse des organes sexuels (morphologie)	3
2b.1 Les organes génitaux chez le fœtus femelle	4
2b.2 Les organes génitaux chez le fœtus mâle	4
3. Techniques actuelles	5
3a. PCR sur biopsie embryonnaire	5
3b. L'échographie	6
3b.1. Identification et localisation échographiques du tubercule génital	7
3b.2 Identification échographique des organes sexuels primaire	8
3b.3 Autres paramètres	10
3c. Les analyses	13
3c.1 Analyse du sexe fœtal dans des cellules prélevées dans le placenta ou dans les liquides fœtaux	13
4. Perspectives de nouvelles approches de sexage	13
4.a Analyse du sexe fœtal dans le matériel fœtal collecté dans la circulation maternelle	13
5. Discussion	15
6. Comparaison avec d'autres espèces	20
6.a Dans l'espèce humaine	20
6.b Dans l'espèce bovine	21
7. Conclusion	22
8. Bibliographie	23

1. Introduction

Chez les équidés, la détermination du sexe du conceptus présente un intérêt croissant pour l'industrie de l'élevage. Chez les chevaux, le sex-ratio de la progéniture dépend des changements de l'état corporel de la mère à la conception et, dans des conditions naturelles, peut donc s'écarter sensiblement d'un rapport de 1:1(Aurich and Schneider, 2014).

La possibilité de choisir le sexe de la progéniture est de la plus haute importance économique pour les éleveurs de chevaux. Contrairement à d'autres espèces, les chevaux présentent plusieurs particularités de reproduction qui interfèrent avec les technologies de procréation assistée utilisées chez d'autres grands animaux (comme les bovins) et les rendent difficiles à appliquer. Ainsi, il y a un *grand* intérêt à déterminer le sexe de la progéniture dès que possible. Plusieurs techniques ont été développées afin de servir cet objectif(Crişan et al., 2016).

La détermination du sexe fœtal peut aider le propriétaire à planifier le potentiel et les dépenses futures de course ou de reproduction. Une jument peut être vendue ou achetée en fonction du sexe de son fœtus. Les évaluations d'assurance peuvent changer selon le sexe du fœtus. (Holder, 2014) L'éleveur peut également insister sur un croisement particulier lors de l'accouplement suivant (Resende et al., 2014).

Plus concrètement, le pur-sang mâle est préféré pour la course ou l'équitation classique, tandis que des prix plus élevés sont payés pour les chevaux Quarterling femelles d'un an élevés pour la course . Dans l'industrie du pur-sang, les poulains valent généralement plus que les pouliches, mais cela varie fréquemment selon le père et la mère. Si le fœtus est de sexe « optimal » pour une jument ou un étalon particulier, on peut évaluer plus précisément la valeur du fœtus et de la jument pleine. un exemple notable de ceci est la race Polo Argentino, dans laquelle les femelles sont considérées comme beaucoup plus désirables que les mâles en raison de leur capacité d'entraînement et de leur agilité.

Un autre exemple: Au concours international de chevaux présenté à Aachen (CHIO) en Allemagne, seulement 24,1% (1641 sur 6801) des chevaux engagés dans les compétitions finales de dressage et de saut d'obstacles entre 1928 et 2010 étaient des femelles.

La valeur accrue des femelles dans des races spécifiques a conduit, dans certains cas, à l'induction systématique de l'avortement chez les juments receveuses portant des fœtus mâles(Riera et al., 2019).

Ainsi, la détermination du sexe fœtal équin peut rendre un service utile aux éleveurs, car elle permet

de mettre en œuvre des stratégies commerciales. La décision de vendre une jument gestante avec un fœtus du sexe désiré ou non et de réformer une poulinière est plus facile lorsque le sexe fœtal est connu (Tonekaboni et al., 2020).

Une méthode rapide et efficace de détermination du sexe chez les embryons équin, utilisable en pratique privée, serait d'un grand intérêt économique et éviterait l'utilisation d'un système dépendant de l'interruption de grossesse (Riera et al., 2019).

2. Rappel du développement embryonnaire

2a. Gène SRY

Le chromosome Y des mammifères joue un rôle crucial dans la détermination du sexe: un embryon qui hérite d'un chromosome Y se développe en tant que mâle, tandis qu'un embryon dépourvu de chromosome Y se développe en tant que femelle. Les gènes déterminant le sexe sur le chromosome Y induisent le développement testiculaire. La différenciation sexuelle masculine ultérieure est une conséquence des hormones sécrétées par le testicule. Le facteur déterminant le testicule codée par le gène SRY été nommé TDF (testis-determining factor) chez l'homme et Tdy (testis-determining Y chromosome) chez la souris. Bien qu'il soit probable que de nombreux gènes différents soient nécessaires pour la détermination du sexe masculin et féminin, la compréhension du mode d'action du TDF peut fournir un modèle général pour le contrôle génétique des décisions de développement chez les mammifères (Sinclair et al., 1990).

Lorsque le testicule commence à se développer avec l'effet du gène SRY, il produit la Mullerian Inhibiting Substance (MIS) qui induit la régression du canal de Müller. La vésicule séminale, l'épididyme, le canal déférent et le canal éjaculateur se développent à partir du canal de Wolff sous l'effet des androgènes testiculaires tandis que le canal de Müller dégénère à cause du MIS. En l'absence d'expression de SRY, les ovaires se développent. La différenciation de l'appareil reproducteur chez le mâle est en fait déterminée par les androgènes et l'AMH (Anti-Müllerian Hormone). Les cellules de Sertoli produisent de l'AMH qui induit une régression du canal de Müller, le précurseur du système reproducteur féminin. Ces androgènes produits sont importants pour la différenciation de diverses parties du canal de Wolff et des glandes accessoires et ils sont essentiels pour le développement testiculaire. Il convient de préciser qu'en l'absence d'hormones

testiculaires et de MIS (Müllerian Inhibiting Substance) respectivement, les canaux wolffiens régressent et les canaux Mullériens sont conservés.

Initialement, deux paires de canaux génitaux, mésonéphraux (Wolffien) et paramésonephraux (Müllérien), se forment chez les deux sexes. Deux conduits sont initialement séparés par un septum intermédiaire. La cloison utérovaginale intermédiaire dégénère et fusionne en un seul canal, formant l'utérus et le vagin unicavitaire (normaux). L'oviducte, l'utérus et le vagin sont développés à partir de paires de canaux paramésonephraux (müllériens). Le vagin vestibulaire est complètement dérivé du sinus urogénital. Bien que les mésonéphros et les canaux mésonéphraux forment le rete testis et les canaux séminifères chez les mâles, ils dégénèrent chez les femelles (Yildirim et al., 2020).

2b. Organogenèse des organes sexuels (morphologie)

Chez le cheval, vers le jour 20 de gestation, le mésonéphros avec le glomérule et les tubules sont présents (Barreto et al., 2018).

Le tubercule génital se distingue au jour 25 (Francioli et al., 2011). Vers le jour 30, un mésonéphros pleinement fonctionnel est apparent, en plus d'un métanéphros en développement et d'une gonade indifférenciée. Les gonades contiennent une masse dense de cellules germinales. Vers le jour 40, le mésonéphros est en régression et le métanéphros se subdivise.

Chez la jument gestante, des taux systémiques élevés de gonadotrophine chorionique équine (eCG) produits par les cupules endométriales pendant les jours 40 à 70 de la gestation peuvent stimuler le développement gonadique, en particulier par l'hyperplasie des cellules interstitielles chez les deux sexes (Barreto et al., 2018). Vers le jour 55, le tubercule génital est situé entre les membres postérieurs du fœtus, à peu près à égale distance entre la queue et le cordon ombilical. Au fur et à mesure de la gestation, il migre vers la queue chez le fœtus femelle et vers le cordon ombilical chez le mâle (Bucca, 2005). Après cela, une augmentation des taux d'œstrogènes chez la jument gestante provenant des gonades fœtales se produit, en particulier après le 80^e jour de gestation. Les cellules interstitielles à l'intérieur des gonades fœtales ont un appareil stéroïdogène pleinement développé, sans différences morphologiques entre les femelles et les mâles (Barreto et al., 2018).



fig. 1: Localisation et aspect du tubercule génital (flèche) chez un fœtus mâle à environ 60 jours de gestation/ **fig2:** Localisation et aspect du tubercule génital (flèche) chez un fœtus femelle à environ 60 jours de gestation (Holder, 2014).

2b.1 Les organes génitaux chez le fœtus femelle

Au début, les ovaires sont en contact avec la paroi dorsale de la cavité abdominale et les marges caudales du rein, situées en position sublombaire. Les fœtus équins ont un clitoris proéminent bien défini entre 75 et 80 jours de gestation (Francioli et al., 2011).

À 90-100 jours de gestation, les ovaires, les trompes utérines, l'utérus, le vagin, le vestibule et la vulve ont été identifiés chez tous les fœtus femelles selon (Barreto et al., 2018). Vers le 90e jour de gestation, la longueur des ovaires sont proportionnellement plus grande que les reins, étant jusqu'à 20% plus grande vers le jour 140. Après ce stade fœtal, les ovaires atteignent la cavité pelvienne caudalement à l'extrémité caudale du rein et sont beaucoup plus petits que les ovaires comparativement à l'âge adulte (Barreto et al., 2018).

2b.2 Les organes génitaux chez le fœtus mâle

À 70 jours, les testicules, les épидидymes, les canaux déférents, les glandes génitales accessoires et le pénis ont été identifiés chez le fœtus mâle. À l'exception des testicules, les structures de tous les autres organes génitaux sont similaires à celles de l'âge adulte. Les testicules étaient positionnés

entre l'extrémité caudale du rein et l'entrée de la cavité pelvienne. Ils étaient beaucoup plus petits que les ovaires à des âges similaires (Barreto et al., 2018).

3. Techniques actuelles

Time of pregnancy	Method	Reliability (%)	Present limitations	References
Conception	High-speed flow cytometric separation of X and Y-chromosome-bearing spermatozoa ("semen sorting") prior to insemination	>90	Low sorting rates detrimental effects of sorting process on sperm function	Buchanan et al. (2000) , Clulow et al. (2008) , Samper et al. (2012a,b) , Panarace et al. (2013)
Day 6 to 8 of pregnancy (blastocyst stage)	Genetic sexing of cell material collected by embryo biopsy	>90	Sophisticated equipment skilled personnel	Choi et al. (2010)
Day 59 to 68 of pregnancy	Transrectal ultrasonographic identification and localization of the genital tubercle	>99	Sufficient experience of the examiner	Curran and Ginther (1989) , Curran (1992) , Bucca (2005) , Holder (2000)
Day 100 to 220 of pregnancy	Identification of the fetal primary genital organs by transabdominal ultrasound	>90	Sufficient experience of the examiner	Renaudin et al. (1999) , Bucca (2005)
Day 90 to 150 of pregnancy	3D ultrasonography of equine fetal sex organs	No information	Sophisticated equipment	Kotoyori et al. (2012)
Final 3 months of pregnancy	Identification of circulating cell-free fetal DNA in maternal blood	85	Unclear, whether fetal cells remain in the circulation beyond parturition	De Leon et al. (2012)

Fig. 3 : (Aurich and Schneider, 2014).

3a. PCR sur biopsie embryonnaire

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une méthode *in vitro* qui permet une amplification plusieurs millions de fois d'une séquence d'ADN spécifique. Il a été inventé par Karry Mullis en 1985 et a commencé à être utilisé pour le sexage des embryons bovins en 1991. Il a une sensibilité, une spécificité et une vitesse élevée. La PCR utilise des amorces spécifiques pour identifier le segment d'ADN cible (généralement de 100 à 1 000 pb de longueur), spécifique au chromosome Y (Crişan et al., 2016).

Des études réalisées sur des biopsies embryonnaires par microlame se sont révélées infructueuses. La technique n'est pas très efficace en raison de la difficulté à pénétrer la membrane. Le sexe a été déterminé par analyse du polymorphisme des loci ZFY/ZFX après amplification PCR. En effet, Le taux de grossesse après biopsie était très faible (21 %), de sorte que la procédure n'a pas été

considérée comme suffisamment bonne pour être utilisée dans un programme commercial.

Il est mentionné dans la littérature que les embryons équins sont plus sensibles à la biopsie cellulaire que ceux issus d'autres espèces, du fait de la présence de sa capsule acellulaire sous la zone pellucide ((Choi et al., 2010) ;(Aurich and Schneider, 2014).

L'étude de (Choi et al., 2010) a porté sur l'évaluation des taux de grossesse suite au transfert d'embryons équins biopsiés par aspiration cellulaire. Dans leur expérience, les résultats du sexage des embryons par PCR ont été comparés aux résultats de l'examen échographique. Ils ont montré que le taux de grossesse était très encourageant. L'une des études s'est concentrée sur la viabilité des embryons aux jours 6, 7 et 8 après avoir percé la capsule par micromanipulation. Les auteurs ont démontré que la viabilité des embryons était maintenue à la fois dans les blastocystes précoces (jour 6) lorsque la capsule n'est pas complètement formée et dans les blastocystes équins (jour 7 et jour 8) qui ont une capsule complète et une capsule de petite taille.

3b.L'échographie

Les méthodes de sexage par échographie ont l'avantage d'être non invasives, portables et de diminuer continuellement leur coût. Elles sont également bien tolérées et ne nécessitent pas la sédation de la jument. Le diagnostic échographique de genre n'est pas un concept nouveau, car les premiers essais publiés remontent à 1989 (Curran et Ginther, 1989). Habituellement, un échographe conventionnel et une sonde linéaire sont utilisés. Les examens sont effectués soit par voie transrectale, soit par voie transabdominale, selon le stade de développement fœtal. Des études récentes ont également appliqué des méthodes Doppler et l'échographie 3D à cet effet(Crişan et al., 2016).

Les taux de réussite de la technique varient considérablement et dépendent beaucoup de l'expertise de l'examineur. La détermination du sexe chez les fœtus équins par échographie transrectale n'est donc pas une pratique courante, mais dans certaines zones géographiques à forte population de poulinières, la demande de détermination du sexe du fœtus par échographie transrectale est élevée. Dans une étude , sur plus de 2500 déterminations du sexe effectuées par un examineur possédant l'expertise et l'expérience appropriée, seulement deux se sont révélées fausses.(Aurich and Schneider, 2014)

3b.1. Identification et localisation échographiques du tubercule génital

Chez le cheval, le sexe du fœtus peut être déterminé par identification échographique transrectale et par la localisation du tubercule génital (précurseur du pénis ou du clitoris).

Le tubercule génital provient de la commissure ventrale des deux plis urogénitaux, chaque pli développe un tubercule labioscrotal latéral. Après le 40^e jour, le tubercule commence sa migration vers le cordon ombilical, chez les mâles, ou vers l'anus et la queue, chez les femelles (Barone, 2001).

Au jour 55 de gestation, le tubercule génital est situé entre les membres postérieurs du fœtus à une distance approximativement égale de la queue et du cordon ombilical. Le moment optimal de détermination de la position du tubercule génital se situe entre les jours 59 et 68 de la gestation.

Le but est d'imaginer cet élément et d'évaluer sa position relative. La migration ne peut être clairement représentée qu'à partir du 55^e jour après l'ovulation. La littérature met en évidence deux intervalles étroits qui se chevauchent comme la meilleure fenêtre d'opportunité: soit 59 à 68 jours soit 60 à 70 jours. L'intervalle ultérieur de 70 à 90 jours est considéré par de nombreux auteurs comme impraticable car l'utérus descend dans l'abdomen.

Ceci est généralement réalisé avec une sonde de 5 MHz mais d'autres préfèrent une sonde de 5 à 7,5 Mhz (Crişan et al., 2016).

La vue en coupe est actuellement privilégiée : des points de repère, tels que la tête, le battement du coeur, les pulsations du cordon ombilical, les membres postérieurs et la queue, sont identifiés. En général, les vues en coupe sont les plus utiles pour l'identification du tubercule génital et des repères décrits. La vue frontale peut aider à déterminer l'emplacement relatif du tubercule génital par rapport aux structures environnantes, bien que ce plan de vue soit plus difficile à obtenir que la vue en coupe transversale.(Curran and Ginther, 1993).

En avançant caudalement le long du tronc, le tubercule génital est représenté sous la forme d'une structure bilobulée hyperéchogène de 2–3 mm. Chez les mâles, il se trouve immédiatement derrière le cordon ombilical. Chez les femelles, il est proche de l'anus, et certains auteurs suggèrent d'utiliser un plan de référence allant de la base de la queue aux jarrets.

Cette technique nécessite une très bonne maîtrise de l'anatomie topographique et une vaste expérience de l'examen échographique transrectal, pour éviter les confusions telles que l'identification des os pelviens comme le tubercule génital féminin.

Si l'examineur est expérimenté, le sexage précoce peut être réalisé en moins de 2 minutes. Alors que la précision du diagnostic rapporté pour l'intervalle optimal varie de 85% à 100%, cette dernière valeur correspond à des niveaux de certitude de 95 à 99%, et la majorité des auteurs recommandent cette méthode comme étant très fiable (Crişan et al., 2016).

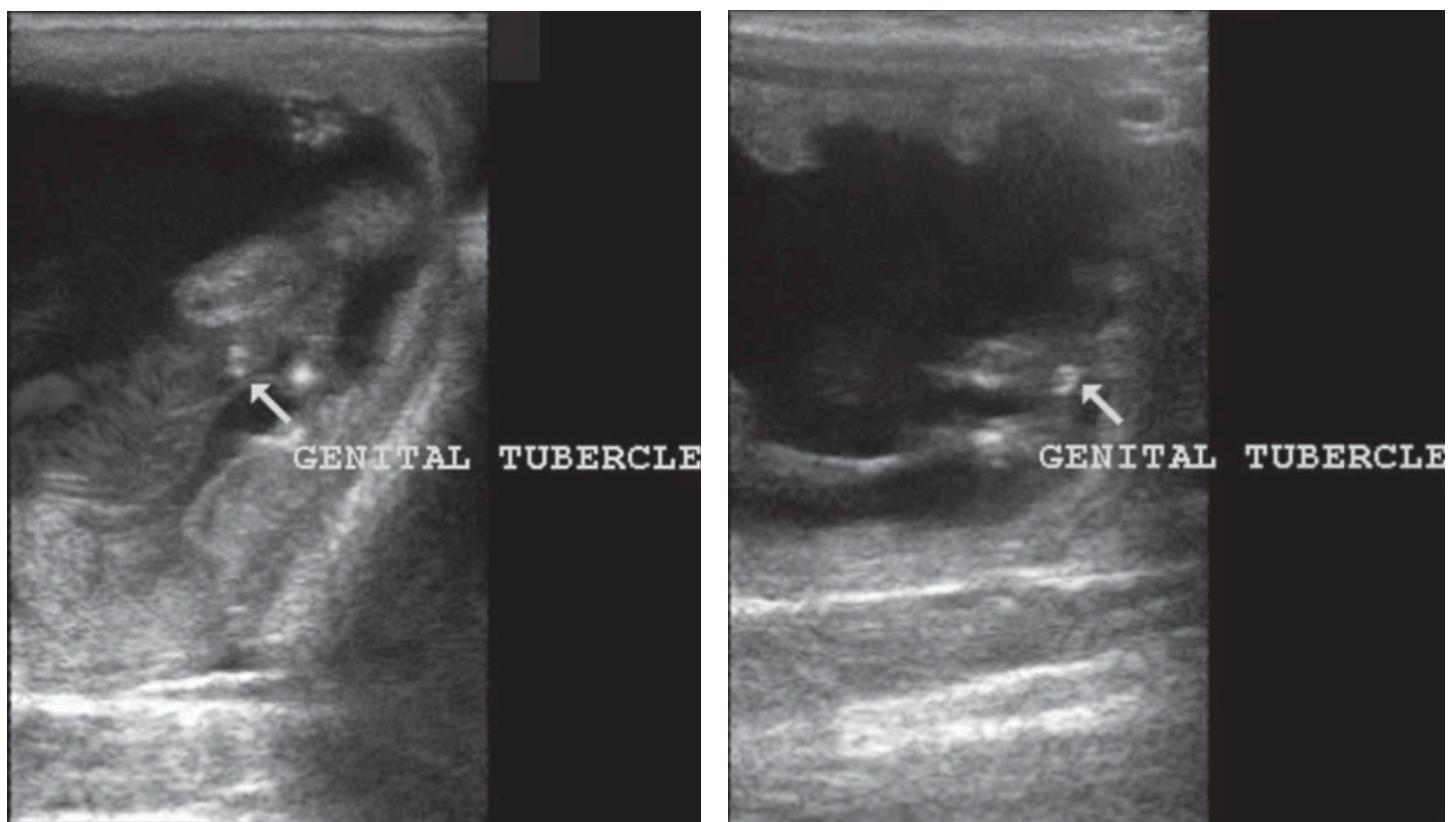


Fig. 4 : image échographique d'un fœtus mâle. Vue en plan II au 65e jour ; le tubercule génital est marqué. fig5: image échographique d'un fœtus femelle. Vue en plan II au 65e jour ; le tubercule génital est marqué (Holder, 2014).

3b.2 Identification échographique des organes sexuels primaire

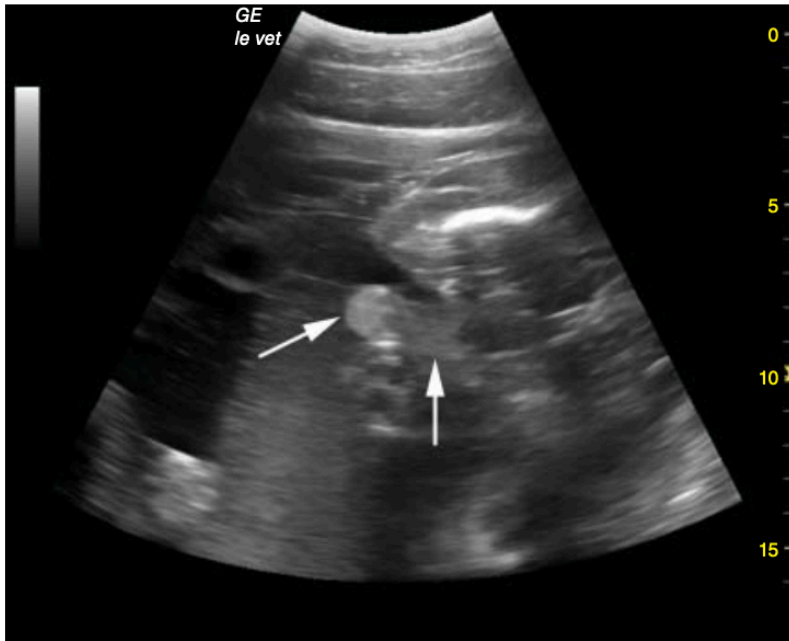


Fig. 6 :Échographie transabdominale d'un fœtus montrant un pénis (flèches blanches). Le gland du pénis est hyperéchogène (flèche gauche) par rapport au corps du pénis (flèche droite) (Holder, 2014).

Après le jour 70, le fœtus a tendance à être placé profondément dans l'utérus de la jument et devient assez inaccessible pour l'imagerie par échographie transrectale. L'imagerie transabdominale percutanée du fœtus équin est possible dès le jour 100. À ce stade, le fœtus peut à nouveau être visualisé dans le bassin de la jument. Une combinaison d'examen transrectaux et transabdominaux est dès lors applicable, l'ensemble du fœtus peut être visualisé par échographie jusqu'à 8 ou 9 mois de gestation et le sexe du fœtus peut être déterminé, avec une fenêtre diagnostique optimale du jour 120 à 210 (Bucca, 2005).

L'échographie réalisée soit par voie transectale, soit par voie transabdominale est utilisée avec la même approche que celle décrite pour la méthode précédente. La vue en coupe transversale est toujours signalée comme la meilleure option pour l'identification génitale (Crişan et al., 2016).

Le sexage échographique se concentre alors sur les organes génitaux externes les plus complexes et sur les gonades.

Chez les mâles, le pénis et/ou le prépuce sont systématiquement imagés de 100 à 220 jours de gestation. Le prépuce ou le pénis sur les coupes transversales ont une forme ronde avec des foyers échogènes linéaires parallèles jusqu'à environ 140 jours, puis apparaissent triangulaire. Le pénis et le prépuce sont souvent difficiles à distinguer l'un de l'autre sur l'image échographique sauf lors d'une érection pénienne. Les gonades mâles sont de forme ovales et mesurent de 2 à 7 cm de long, selon le stade de gestation. Ils sont situés dans l'abdomen ventral caudal le long des cuisses sur les vues de face. Leur échogénicité est similaire à celle du foie fœtal. Ils apparaissent homogènes avec

une fine ligne échogène longitudinale droite et centrale qui n'est pas toujours présente après 125 jours.

Chez les femelles, les glandes mammaires et les mamelles sont observées de 118 jours à 227 jours de gestation. Les gonades femelles sont ovales et de taille et d'emplacement similaires aux gonades mâles. C'est l'observation de l'ovaire fœtal qui permet de poser un diagnostic de sexe féminin de 100 jours à 133 jours de gestation (Renaudin, 2000).

Pour l'échographie transrectale de l'utérus gravide, un transducteur de 5 à 7,5 MHz est utilisé avec une profondeur de pénétration de 15 cm. L'évaluation de la grossesse à un stade ultérieur doit être effectuée avec un transducteur de 2 à 5 MHz et une profondeur de pénétration maximale de 35 cm (Van de Velde et al., 2018).

Cette méthode nécessite 2 à 10 minutes pour réaliser l'examen. L'intervalle optimal pour sa réalisation est compris entre 90 - 150 jours, avec des des taux de réussite variant de 85% à 90%. Alors que certains auteurs considèrent cette méthode comme dépendante de la présentation fœtale qui peut être difficile en raison des différences échomorphologiques peu claires entre les organes génitaux rudimentaires et les tissus environnants, d'autres la considèrent comme incomparable par rapport à la première méthode (Crişan et al., 2016).

La plupart des diagnostics de genre peuvent être effectués en utilisant l'approche transabdominale. Cependant, avant 183 jours de gestation, l'adjonction de l'approche transrectale est utile dans certains cas où les fœtus sont soit situés trop haut dans l'abdomen de la jument, soit dans une présentation postérieure pour être facilement visualisés (Renaudin, 2000).

Il existe un consensus selon lequel au-delà du jour 150, le fœtus devient inaccessible à l'échographie transrectale.

Dès lors cette approche s'avère efficace jusqu'à 210 à 220 jours de gestation, après quoi la croissance et le positionnement du fœtus entravent même les examens transabdominaux (Crişan et al., 2016).

3b.3 Autres paramètres

Avec les progrès de l'échographie, de nouvelles méthodes dans le sexage équin sont apparues. (Resende et al., 2014) ont imaginé l'identification de la vascularisation des gonades (plexus pampiniforme, veine testiculaire, anneau vasculaire entre le cortex et la moelle des ovaires) en utilisant l'échographie Doppler transrectale.

Durant la période comprise entre le 57ème et le 70e jours, le mode Doppler couleur peut aider à faire la différence entre le cordon ombilical et le tubercule génital surtout chez les mâles, ce qui a permis de perfectionner le diagnostic. Alors que, à un stade avancé de la gestation, le mode couleur Doppler est inutile en raison de la faible vascularisation des organes génitaux tant chez le mâle que chez la femelle. Cependant, il redevient utile au stade de 150 à 180 jours (Mebarki et al., 2019).

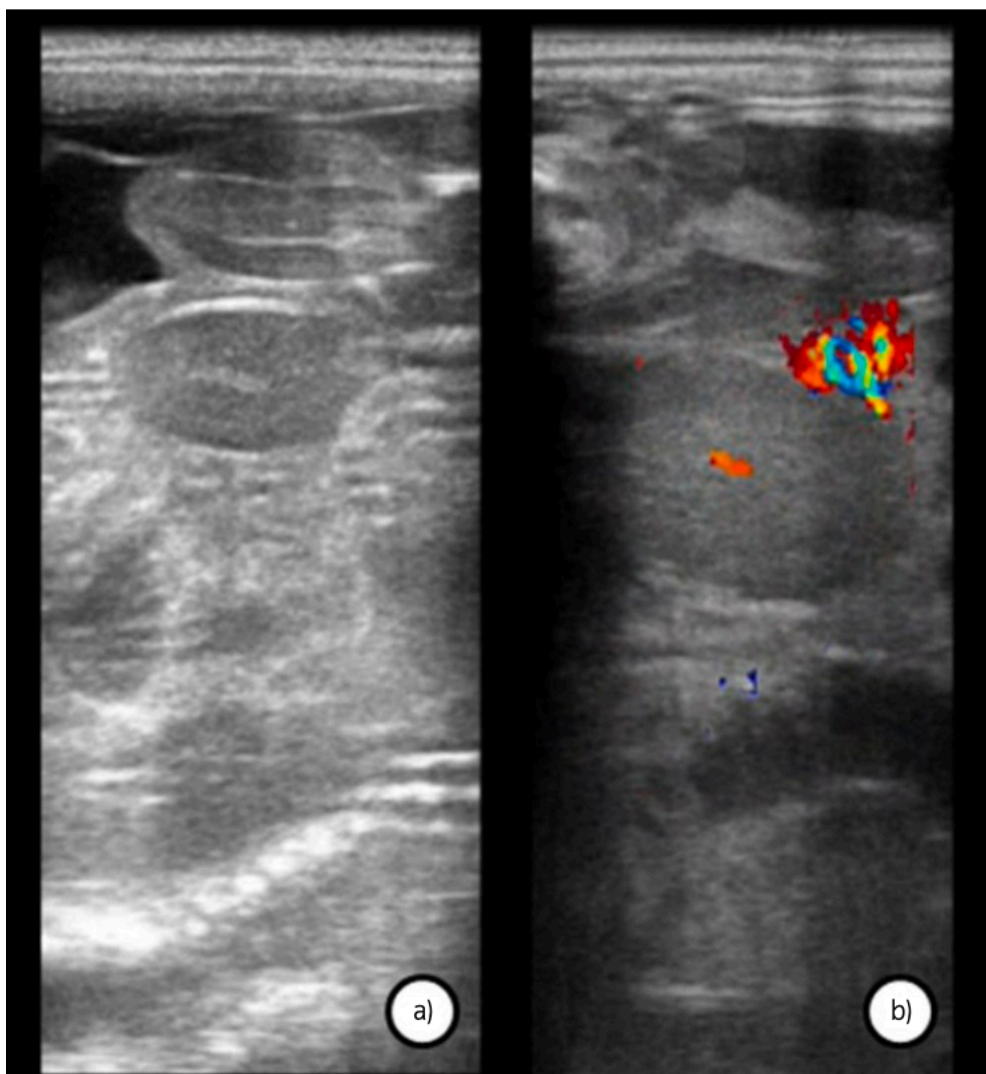


Fig. 7: Gonade mâle visualisée par échographie mode B (a) et vascularisation du plexus pampiniforme et de la veine testiculaire par échographie Doppler couleur (b) (Resende et al., 2014).

En médecine humaine, l'imagerie échographique 3D est un développement qui offre diverses options pour analyser et diagnostiquer un certain nombre de problèmes cliniques, y compris les troubles congénitaux, tels que les malformations fœtales. De nombreux rapports de cas et études ont

révélé les avantages de l'ajout de l'imagerie échographique 3D aux techniques échographiques 2D déjà bien établies pour améliorer le diagnostic prénatal chez l'homme (Kotoyori et al., 2012).

Il a été publié que l'échographie 3D des organes sexuels fœtaux équins permet également l'identification du tubercule génital .

Entre les jours 63 et 76, le tubercule génital du fœtus a été reconnu, alors que les organes reproducteurs externes, par ex. la vulve et le prépuce, sont visualisable sous forme d'image 3D entre les jours 90 et 150 lorsque le fœtus a été localisé est en position caudale lors de l'examen. En utilisant l'échographie 3D du fœtus entre les jours 90 et 150, le prépuce a été reconnu entre les membres postérieurs dans la direction ventro-dorsale, tandis que la vulve a été reconnue sous la queue et entre les faces proximales des membres postérieurs (Kotoyori et al., 2012).

Du jour 90 à 150, l'échographie 3D était meilleure que l'échographie 2D conventionnelle pour examiner en détail les organes reproducteurs sous n'importe quel angle souhaité par l'examineur, tant que le fœtus était en présentation caudale (Kotoyori et al., 2012). (les fœti ont une chance égale de présentation crânienne ou caudale avant le jour 150)

l'échographie 3D du fœtus équin peut être un outil précieux en complément de l'échographie 2D conventionnelle.

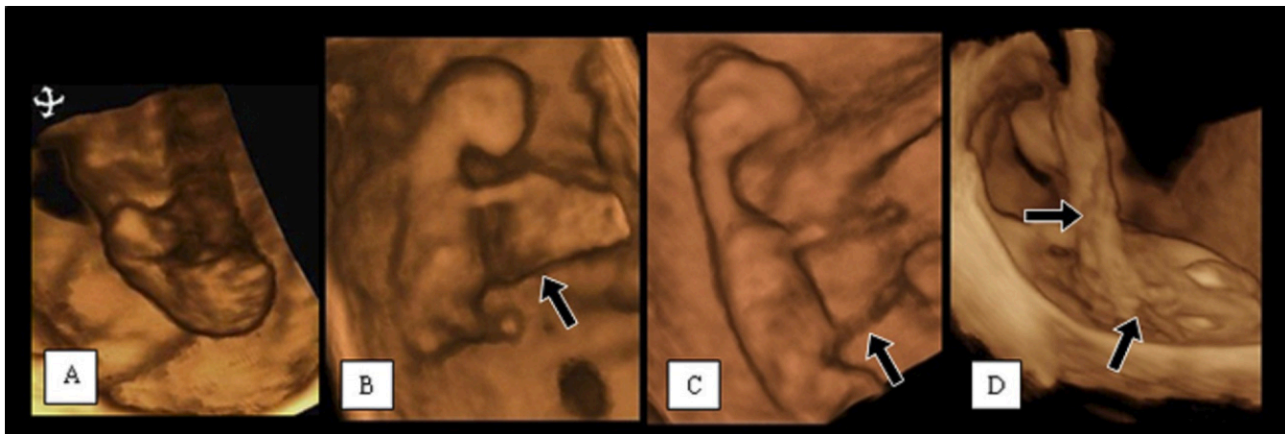


Fig. 8 : Images tridimensionnelles d'un fœtus équin, montrant le corps du fœtus. (A) Jour 48, la tête et le corps ont été reconnus. (B) Jour 55, la tête, le corps, les membres et le cordon ombilical (flèche) ont été observés. (C) Jour 65, l'allongement du membre antérieur est montré. En mode 3D en temps réel, la motilité du fœtus, telle que le battement de tête et la nage, est observée. (D) Jour 85, le cordon ombilical (flèches) a été observé sur l'aspect ventral du fœtus en faisant pivoter l'image volumique 3D. Les membres ont été observés avec de légers artefacts dus aux mouvements du fœtus. (Kotoyori et al., 2012)

3c. Les analyses

3c.1 Analyse du sexe fœtal dans des cellules prélevées dans le placenta ou dans les liquides fœtaux

La détermination du sexe fœtal dans des cellules collectées par amniocentèse à partir de liquides fœtaux n'a jamais été rapportée pour le cheval. Elle a cependant été décrite chez le bovin. La détermination du sexe a été effectuée via une analyse chromosomique. La technique a été améliorée par l'introduction de méthodes de PCR qui permettaient le sexage des cellules fœtales bovines recueillies par amniocentèse via la détermination de l'ADN spécifique au sexe. La praticabilité de la technique est limitée car la collecte du liquide fœtal est difficile. Cependant, dans la plupart des cas, le liquide fœtal a été collecté avec succès lors de la première pénétration de l'aiguille (29 grossesses sur 33), mais chez d'autres animaux, des pénétrations d'aiguille répétées ont été nécessaires pour aspirer le liquide fœtal. Au total, 5 animaux sur 35 ont avorté dans la semaine suivant l'aspiration de liquide amniotique. l'expertise et l'expérience peuvent diminuer le risque d'avortement qui devrait être plus élevé chez les chevaux que chez les bovins (Aurich and Schneider, 2014).

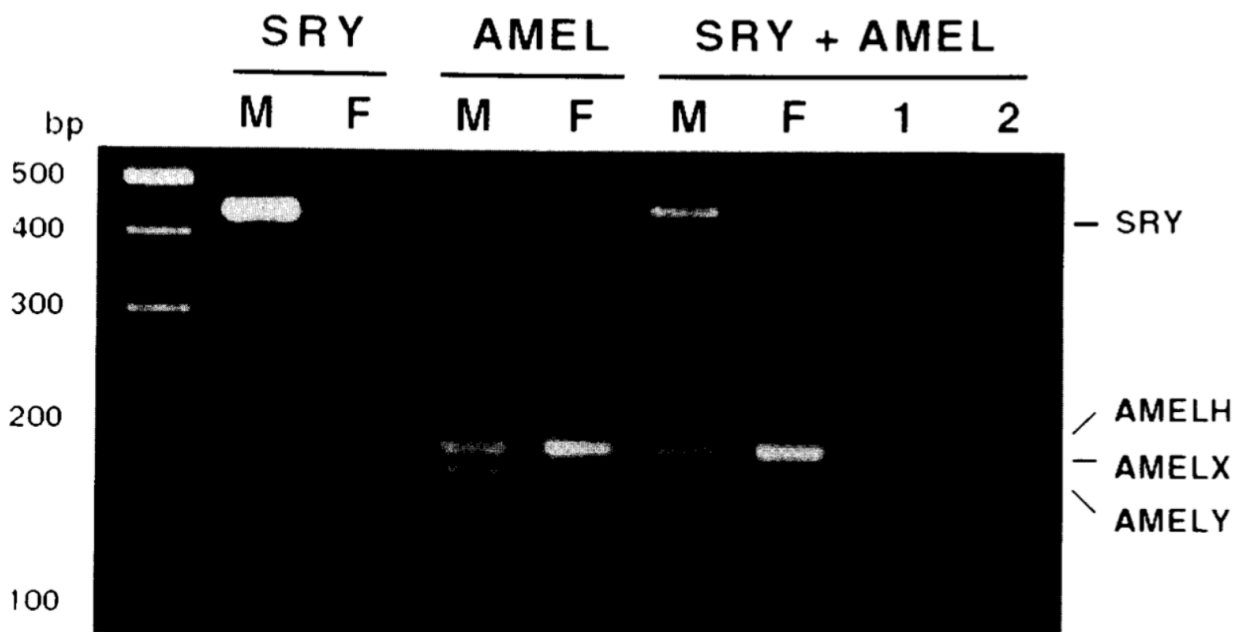
4. Perspectives de nouvelles approches de sexage

4.a Analyse du sexe fœtal dans le matériel fœtal collecté dans la circulation maternelle

Une nouvelle méthode prometteuse pour le sexage fœtal chez le cheval est l'identification de l'ADN fœtal libre de cellules circulantes (ccffDNA) dans le sang maternel.

Le gène de l'amélogénine est situé dans le chromosome sexuel. La détection de 6 paires de bases de différence de l'amélogénine (AMELX-AMELY) peut aider à évaluer le sexe fœtal prénatal.

Dans la médecine humaine, il a été principalement utilisé pour le diagnostic prénatal non-invasif des troubles héréditaires paternels ainsi que le diagnostic du sexe fœtal (Kim et al., 2012).



Le risque de cette technique pour la mère et le fœtus est minime car elle ne nécessite que la collecte de sang maternel. L'absence de séquences du chromosome Y dans le plasma maternel implique que le fœtus est une femelle; cependant, ceci peut également être la conséquence de concentrations indétectables d'ADNcf en présence de fœtus mâle. Les résultats de l'étude de (Tonekaboni et al., 2020) démontrent que la meilleure prédiction non invasive du sexe fœtal peut être obtenue en examinant l'ADNcf au cours du dernier trimestre de la grossesse avec une sensibilité, une spécificité et une précision respectivement de 66,66 %, 100 % et 75 %. Toujours selon (Tonekaboni et al., 2020), la prédiction du sexe fœtal a été réalisée en détectant le fragment du gène SRY dans des échantillons de plasma de juments gravides. Cette étude visait également à évaluer les anomalies dans les chromosomes sexuels des fœti. Des marqueurs génétiques, en plus du gène SRY, ont été détectés dans des échantillons de plasma de juments gravides.

À ce jour, l'échographie est la technique de référence de détermination du sexe chez les animaux de ferme. D'autre part, la technique moléculaire basée sur le ADNcf peut être une alternative fiable et pratique dans le sexage fœtal.

L'importance de cette méthode ou d'une méthode similaire serait encore plus grande si elle pouvait être mise en œuvre à un stade précoce de la grossesse. À l'heure actuelle, on ne sait pas si les cellules fœtales de la ceinture chorionique pénètrent dans la circulation maternelle au moment de l'invasion de l'endomètre.

La possibilité d'intrusion dans les vaisseaux sanguins ne peut donc être exclue et constituerait la base d'une présence très précoce d'ADN fœtal dans le sang maternel (Aurich and Schneider, 2014).

Fig. 9 : *Electrophorèse des fragments des gènes SRY et amélogénine. M : étalon normal, F : jument normale, 1 : jument XY cas 11), 2 : jument XY cas 241. La bande SRY (429 pb) n'a été détectée que chez l'étalon normal. Les bandes AMELY (160 pb) et AMELH (hétéroduplex AMELX/ AMELY vu autour de 200 pb) ont été détectées chez l'étalon et la jument XY. La jument normale ne présente qu'une seule bande AMELX (184 pb) (Hasegaw et al., 2000).*

5. Discussion

Le sexage des embryons équins a suscité un intérêt considérable au cours des dernières années. Il existe plusieurs méthodes de diagnostic, mais les plus fréquemment utilisées sont la réaction en chaîne par polymérase pour le sexage des embryons et l'examen échographique pour le sexage fœtal. La première méthode a un impact économique plus important sur l'élevage des chevaux, permettant la sélection du sexe de la progéniture. La procédure elle-même n'est pas très chère, mais elle exige des laboratoires bien équipés et du personnel expérimenté.

Quant à l'examen échographique, les avantages majeurs sont le fait qu'il s'agit d'une méthode non invasive avec des coûts minimes et qu'elle peut être réalisée sur le terrain. La principale limite de cette méthode est le fait qu'elle ne peut être utilisée que dans un intervalle étroit spécifique de la gestation (Crişan et al., 2016).

Bien que l'échographie soit une technique précise pour le sexage fœtal, il convient de souligner qu'elle nécessite un équipement d'échographie de haute résolution et une pratique considérable. La génération actuelle d'appareils à ultrasons est d'une qualité suffisante pour effectuer la détermination du sexe fœtal en milieu agricole. Les sondes avec une bande passante et une profondeur de balayage correctes sont très importants pour le diagnostic. (Van de Velde et al., 2018). Les connaissances et la technique peuvent être apprises en un temps relativement court, mais il faut de nombreuses heures de pratique pour développer des niveaux élevés de certitude et de précision et un temps d'examen court (Curran, 1992).

Une bonne connaissance de l'anatomie fœtale et une identification rapide des parties fœtales sont essentielles pour faciliter le diagnostic. Des vues en coupe transversale et sagittale sont nécessaires

pour mener à bien l'examen. Le temps requis pour effectuer un examen concluant est de 2 à 15 minutes pour l'examineur expérimenté. La variabilité dépend de la difficulté rencontrée pour visualiser les zones d'intérêt. Les fœtus très actifs sont de mauvais candidats pour un diagnostic rapide, car les membres postérieurs du fœtus peuvent souvent interférer avec une imagerie appropriée. L'enregistrement vidéo offre des possibilités d'études plus détaillées (Mar et al., 2002). Bien qu'une échographie chez les juments en milieu de gestation ne rentre pas dans les bilans de grossesse de routine, elle peut être réalisée, par exemple, en complément de la vaccination contre l'Herpès Virus équin à 5 mois de gestation (Van de Velde et al., 2018) ou pour vérifier d'autres paramètres concernant la santé fœtale comme la fréquence cardiaque fœtale, les mouvements fœtaux et l'échogénicité des fluides fœtaux qui sont tous des paramètres importants. Cela donne au propriétaire de la jument des informations supplémentaires sur la grossesse en cours (Bucca, 2005).

La détermination échographique du sexe fœtal est une technique rapide, fiable et réalisable. Le sexage du fœtus est possible pendant deux périodes préférentielles (Mebarki et al., 2019).

Concernant la période de sexage précoce, elle s'étend de 57 à 70 jours de gestation, avec un temps optimal entre 59 et 68 jours. Durant cette période, le diagnostic de sexe est basé sur la position du tubercule génital par rapport aux structures environnantes (Mebarki et al., 2019).

Elle a pour avantage principal de fournir une détection précoce du genre du fœtus ce qui est, dans un cadre commercial, important pour les éleveurs de chevaux (Van de Velde et al., 2018).

La possibilité de visualiser le conceptus par ultrasons soit pour le diagnostic de grossesse soit pour déterminer le sexe fœtal permet la détection d'autres conditions potentielles. Ceux-ci peuvent inclure la présence de jumeaux, une mort fœtale, des tissus fœtaux conservés après la mort fœtale ou un pyomètre (Curran, 1992).

Il existe néanmoins plusieurs désavantages à la technique; celle-ci est qu'elle ne peut être pratiquée que par un examen transrectal, ce qui est plus invasif qu'une auscultation transabdominale. De plus, l'erreur dans la détermination du sexe est plus fréquente chez les femelles que chez les mâles. Ceci peut s'expliquer par la grande difficulté de localisation du tubercule génital chez la femelle qui peut être masqué par la queue du fœtus. Il existe plusieurs structures anatomiques qui peuvent être confondues avec le tubercule génital, telles que les coupes transversales du cordon ombilical, de la queue ou de la moelle épinière. De même, une coupe transversale d'un membre postérieur fléchi peut simuler le tubercule génital d'un fœtus mâle. Les principales causes du niveau élevé d'erreur peuvent venir des conditions de travail non optimales ou du nombre d'exams réalisés insuffisants

(Curran, 1992; Mar et al., 2002).

La courte période de temps pour effectuer la détermination du sexe, l'expérience nécessaire pour faire une prédiction fiable et l'évaluation d'un seul trait distinctif sont les plus grands inconvénients. Le fait que le fœtus équin est se déplace du fait des mouvements de liquide allantoïdien générées par l'examen conduit à des ombres acoustiques qui aggravent la détermination du genre (Holder, 2014).

Cependant, la seconde technique a une fenêtre de temps optimale beaucoup plus large (100 à 220 jours de gestation contre 59 à 68 jours de gestation) permettant ainsi des contrôles afin de confirmer ou de faire un diagnostic final.(Renaudin, 2000).

Pour rappel, après le jour 70, le fœtus a tendance à être placé profondément dans l'utérus de la jument et devient assez inaccessible pour l'imagerie par échographie transrectale. L'imagerie transabdominale percutanée du fœtus équin est possible dès le jour 100. À ce stade, le fœtus peut à nouveau être visualisé dans le bassin de la jument. En utilisant une combinaison d'examen transrectaux et transabdominaux, l'ensemble du fœtus peut être visualisé par échographie jusqu'à 8 ou 9 mois de grossesse et le sexe du fœtus peut être déterminé, avec une fenêtre diagnostique optimale des jours 120 à 210.(Bucca, 2005).

Pendant cette période, le diagnostic sexuel repose sur l'observation des organes génitaux externes du fœtus. En pratique, il est recommandé d'effectuer un sexage précoce du fœtus, mais en cas de doute, un deuxième examen est à faire dans le délai optimal entre 90 et 120 jours de gestation.

La détermination du sexe du fœtus au cours de la gestation intermédiaire à avancée est un outil de diagnostic efficace. La large fenêtre de diagnostic rend cette technique très attrayante pour les cliniciens. Selon (Mar et al., 2002), la fiabilité des résultats de cette technique peut être augmentée en réalisant l'examen plus d'une fois et toujours dans des conditions de travail les plus optimales possibles, c'est-à-dire avec la jument bien maîtrisée, la lumière extérieure tamisée et l'échographe à hauteur des yeux.

L'approche transabdominale est très sûre, le risque de déchirure rectale est moindre et il est avantageux pour les petites juments, comme les chevaux et poneys américains miniatures lorsque la palpation rectale est extrêmement difficile voire impossible (Renaudin, 2000).

Une évaluation rapide du bien-être fœto-placentaire peut être menée simultanément ; cela peut s'avérer bénéfique, comme contrôle de routine à mi-gestation de l'environnement et de la croissance du fœtus. (Bucca, 2005).

Enfin, le large laps de temps garantit que les examens peuvent être effectués à la fin de la saison ou

en hiver, ce qui le rend plus réalisable après la saison de reproduction chargée (Toenissen et al., 2016).

Malgré cela, plus la grossesse est avancée, plus il devient difficile de visualiser la région des organes génitaux. Les ombres acoustiques causées par les os ou le cordon ombilical peuvent fausser le diagnostic (Bollwein et al., 2019).

Selon (Holder, 2014), à 150 jours et au-delà la technique est plus difficile, prend plus de temps à réaliser et a un pourcentage plus élevé de « non-détermination » qu'au stade précoce de la gestation. Les organes génitaux fœtaux sont bien développés, mais l'image visuelle n'est généralement pas aussi claire qu'une image transrectale à des stades plus précoces. De plus, il est plus difficile d'obtenir un bon plan de visualisation que lors d'une échographie transrectale car l'angle de la sonde est limité par la courbure de l'abdomen.

Ces facteurs, ainsi que l'expérience et l'expertise de l'examineur, sont les paramètres les plus importants qui influencent le résultat et le temps requis pour établir un diagnostic. (Van de Velde et al., 2018)

Il peut être intéressant d'enregistrer l'examen. En effet, les praticiens qui n'ont pas d'expérience en échographie transabdominale peuvent déterminer le sexe en se référant aux bandes vidéo prises lors des examens. L'identification des caractéristiques distinctives nécessite beaucoup de pratique et d'expérience (Toenissen et al., 2016).

L'utilisation du Doppler couleur augmente le succès de la détermination du genre. La précision des diagnostics est optimale entre le 4ème et le 5ème mois de gestation (Toenissen et al., 2016).

L'utilisation du Doppler transrectal est une technique efficace à la fois au stade précoce de la gestation (57-70 jours) et au stade tardif de la gestation. Pour (Mebarki et al., 2019), le temps nécessaire pour déterminer le sexe est de <180 s, ce qui permet d'employer cette pratique même au plus fort de la saison de reproduction. La précision de la détermination du sexe peut être augmentée au début de la période entre 57 et 70 jours en utilisant le mode Doppler par rapport au mode 2D, en particulier chez les mâles plutôt que chez les femelles (Resende et al., 2014). La fiabilité du résultat dépend des conditions de réalisation (luminosité et contention animale), du réglage et de la qualité de l'échographe, et de l'expérience de l'opérateur (Mebarki et al., 2019).

Concernant l'utilisation d'une vue en 3 dimensions, la fiabilité d'un diagnostic de genre dépend aussi principalement de l'expérience de l'examineur. Selon (Becsek et al., 2020), en évaluant à plusieurs reprises les images 3D, les diagnostics peuvent non seulement être effectués de manière

plus fiable, mais également plus rapide. La méthode 3D permet à l'examineur inexpérimenté de diagnostiquer plus facilement le sexe, car l'image 3D multiplan permet de s'orienter plus facilement sur le fœtus et ainsi de générer des images transversales bidimensionnelles optimales pour représenter le tubercule génital. Pour les examinateurs expérimentés, cependant, la technologie des ultrasons 3D n'offre pas d'avantages décisifs en termes de fiabilité dans la détermination du sexe et prend également plus de temps. L'application de l'échographie 3D peut générer de nouvelles opportunités pour l'évaluation de l'anatomie fœtale normale et la détection des anomalies. (Kotoyori et al., 2012). L'échographie 3D du fœtus équin peut être un outil précieux en complément de l'échographie 2D conventionnelle (Kotoyori et al., 2012).

Afin d'éviter les artefacts de mouvement (généralement dus aux mouvements fœtaux et maternels), des enregistrements répétés d'images 3D d'une structure et d'un moment ciblés sont nécessaires. Il s'agit d'un inconvénient distinct de l'utilisation d'images tridimensionnelles, qui comprend la capture d'une structure fœtale parfaitement focalisée en une seule vue et la réalisation de l'examen dans un court intervalle (Kotoyori et al., 2012). Enfin, l'achat d'un appareil à ultrasons compatible 3D est actuellement associé à des coûts environ deux à trois fois plus élevés qu'une machine 2D. Ceci, ainsi qu'une augmentation du temps requis pour l'examen et l'évaluation et les problèmes de flou de mouvement peuvent rendre le passage à cette technologie plus difficile (Becsek et al., 2020).

À ce jour, l'échographie est considérée comme la meilleure méthode de détermination du sexe chez les animaux de ferme. D'autre part, la technique moléculaire basée sur le ADNcf peut être une alternative fiable et pratique dans le sexage fœtal (Tonekaboni et al., 2020).

Cette découverte offre une nouvelle opportunité pour l'évaluation non invasive de la grossesse, y compris l'identification prénatale du sexe du fœtus. De plus, il est possible d'utiliser l'ADNcf pour détecter des maladies génétiques (de Leon et al., 2012). Le principal problème dans la détermination du sexe fœtal basée sur l'ADNcf vient du fait que les fœtus femelles ne sont pas détectés directement, mais plutôt déduits d'un résultat négatif pour les séquences spécifiques du chromosome Y. Cela peut produire des résultats faussement négatifs en raison des niveaux indétectables de ADNcf (Kim et al., 2012).

Il est rapporté que dans la phase initiale de la gestation, la concentration de l'ADN fœtal circulant dans le plasma maternel est très faible, mais ce chiffre augmente progressivement au fur et à mesure pour être détectable dans la partie tardive de la gestation (Tonekaboni et al., 2020).

Un point majeur relève du prix coûteux de la machine ce qui peut limiter l'application clinique de

cette technique.

Il n'y a à l'heure actuelle que très peu de littérature sur cette technique dans la détermination du genre foetal chez la jument. Auparavant, seules deux études avaient examiné la possibilité d'utiliser l'ADNcff dans le plasma sanguin de juments gravides pour déterminer le sexe foetal. Cette technique est bien plus décrite chez d'autres espèces notamment chez les animaux de production ou même en médecine humaine.

6.Comparaison avec d'autres espèces

6.a Dans l'espèce humaine

Chez les humains, il peut y avoir des raisons médicales pour déterminer le sexe du fœtus. Par exemple, la mère peut être porteuse d'une maladie liée à l'X telle que la dystrophie musculaire de Duchenne. Cependant, il est également fréquent que les parents souhaitent connaître le sexe du fœtus pour des raisons non médicales (sociales). Ces raisons incluent la planification et la préparation, le désir d'un attachement émotionnel plus étroit au fœtus. La détermination du sexe peut également être effectuée à des fins de sélection du sexe. La sélection du sexe peut être motivée par une préférence culturelle pour un sexe. Il existe des preuves que la sélection du sexe en faveur des hommes se produit dans plusieurs régions du monde, y compris l'Inde, la Chine et le Caucase. La sélection du sexe peut également être motivée à des fins d'équilibre familial. Les deux justifications de la sélection du sexe soulèvent des questions éthiques complexes.

L'identification échographique est actuellement le moyen le plus courant de déterminer le sexe, mais son niveau de précision n'approche celui du testing prénatal non-invasif (NIPT=Analyse du sexe foetal dans le matériel foetal collecté dans la circulation maternelle) que plus tard au cours de la grossesse. Le NIPT peut déterminer le sexe avec plus de précision que l'échographie aux premiers stades de la gestation (Bowman-Smart et al., 2020). Les tests de diagnostic invasifs tels que la choriocentèse (CVS) peuvent également être utilisés pour déterminer le sexe foetal de manière très précise. Cependant, en général, la CVS n'est pas effectué avant 10 semaines de gestation, en raison d'un risque accru de malformation des membres. La nature invasive de la CVS en fait également

une option moins souhaitable que le NIPT. Il comporte un risque, même minime, de fausse couche. (p. ex., au-delà de 14 semaines).

La détermination du sexe fœtal à l'aide de sang maternel peut être élevée si elle est effectuée par RTQ-PCR sur un échantillon de sang prélevé à un moment de la grossesse où une quantité suffisante d'ADNc_{ff} est présente (à 7 semaines de gestation ou plus). Cette technologie peut être utile en milieu clinique pour la détection précoce des fœtus à risque de troubles liés au sexe nécessitant des tests de suivi (Devaney et al., 2011).

6.b Dans l'espèce bovine

Le développement de stratégies méthodologiques permettant de prédire le sexe fœtal chez les bovins reste encore un défi zootechnique. Différentes méthodes ont été mises en œuvre pour orienter la gestion des animaux, donnant aux producteurs un avantage dans la prise de décision concernant la planification des activités et les gains financiers (Shea, 1999).

Peu de méthodes ont été proposées pour la détermination précoce du sexe fœtal chez les bovins avec une efficacité relative et l'échographie reste la plus fréquemment utilisée. Il existe des restrictions et des limitations techniques, des coûts accrus, des problèmes de sécurité et de gestion des animaux qui limitent l'utilisation de l'échographie pour déterminer le sexe du fœtus chez les bovins (Hylan et al., 2009).

Pour des résultats complets et efficaces dans les programmes d'élevage et de sélection, il est nécessaire d'inclure une stratégie rentable et fiable pour la détermination précoce du sexe fœtal (Chan et al., 2004) afin d'augmenter le gain génétique dans le troupeau et de réduire le coût des tests de descendance. Outre la gestion adéquate des troupeaux, la détermination précoce du sexe fœtal pourrait être utilisée pour diriger les ventes de veaux avant leur naissance, augmentant ainsi la valeur commerciale.

La détermination prénatale du sexe est possible chez les bovins par PCR en utilisant l'ADNc_{ff} de vaches gravides à partir de 45 jours après la fécondation, sans limitation de temps due à la progression de la gestation (da Cruz et al., 2012).

Les résultats de l'étude de (da Cruz et al., 2012) démontrent que la PCR peut être appliquée en routine aux conditions de la ferme pour déterminer avec précision le sexe fœtal chez les bovins, atteignant une précision de 99,9 %.

Pour la détermination précoce du sexe chez les bovins, la PCR utilisant des marqueurs spécifiques à Y remplacerait progressivement l'échographie comme méthode de choix.

7. Conclusion

En conclusion, il existe de nombreuses techniques accessibles à ce jour pour le praticien afin de déterminer le sexe du fœtus dans l'espèce équine. Ces techniques nécessitent néanmoins un niveau d'expertise nécessaire et/ou du matériel adéquat afin d'avoir la sensibilité la plus élevée possible. Chaque technique a ses limites et ses avantages et c'est pour cela qu'il convient de déterminer l'objectif de l'utilisation au préalable avant d'entreprendre un examen quelconque.

Le « Gold standard » actuel reste l'échographie de par son accessibilité mais d'autres techniques existent et elles ne sont pas à négliger. Au vu des avancées dans le domaine de la biologie moléculaire, bien que très peu accessible à l'heure actuelle, la technique de l'identification de l'ADN fœtal libre de cellules circulantes dans le sang maternel pourrait devenir de plus en plus commune sur le terrain et apporter des éléments diagnostiques supplémentaires.

Enfin, malgré les différentes techniques exposées, il ne faut pas oublier que l'on peut les associer afin d'augmenter la sensibilité du diagnostic.

8. Bibliographie

Aurich, C., Schneider, J., 2014. Sex determination in horses - current status and future perspectives. *Anim Reprod Sci* 146, 34-41.

Barreto, R.S.N., Romagnolli, P., Mess, A.M., Rigoglio, N.N., Sasahara, T.H.C., Simões, L.S., Fratini, P., Matias, G.S.S., Jacob, J.C.F., Gastal, E.L., Miglino, M.A., 2018. Reproductive system development in male and female horse embryos and fetuses: Gonadal hyperplasia revisited. *Theriogenology* 108, 118-126.

Becsek, A., Schweizer, A., Knutti, B., Bollwein, H., 2020. [Gender determination in equine fetuses in early pregnancy using two- and three-dimensional ultrasound]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 48, 166-171.

Bollwein, H., Pricking, S., Spilker, K., Martinsson, G., Rau, J., Toenissen, A., Sieme, H., 2019. Equine Fetal Gender determination in mid- and advanced gestation by transabdominal approach - Comparative study using 2D B-Mode ultrasound, Doppler sonography, 3D B-Mode and following tomographic ultrasound imaging. *Pferdeheilkunde* 35.

Bowman-Smart, H., Savulescu, J., Gyngell, C., Mand, C., Delatycki, M.B., 2020. Sex selection and non-invasive prenatal testing: A review of current practices, evidence, and ethical issues. *Prenat Diagn* 40, 398-407.

Bucca, S., 2005. Equine fetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. *Theriogenology* 64, 568-571.

Chan, K.C., Zhang, J., Hui, A.B., Wong, N., Lau, T.K., Leung, T.N., Lo, K.W., Huang, D.W., Lo, Y.M., 2004. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 50, 88-92.

Choi, Y.H., Gustafson-Seabury, A., Velez, I.C., Hartman, D.L., Bliss, S., Riera, F.L., Roldán, J.E., Chowdhary, B., Hinrichs, K., 2010. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction* 140, 893-902.

Crișan, M.I., Damian, A., Morar, I., Páll, E., Peștean, C., Groza, I., 2016. Equine Embryo Sexing and Ultrasonographic Foetal Sexing - Interests and Applicability. *Anat Histol Embryol* 45, 329-337.

- Curran, S., 1992. Fetal sex determination in cattle and horses by ultrasonography. *Theriogenology* 37, 17-21.
- Curran, S., Ginther, O.J., 1993. Ultrasonic fetal gender diagnoses during Months 5 to 11 in mares. *Theriogenology* 40, 1127-1135.
- da Cruz, A.S., Silva, D.C., Costa, E.O.A., De M-Jr, P., da Silva, C.C., Silva, D.M., da Cruz, A.D., 2012. Cattle fetal sex determination by polymerase chain reaction using DNA isolated from maternal plasma. *Animal Reproduction Science* 131, 49-53.
- de Leon, P.M., Campos, V.F., Dellagostin, O.A., Deschamps, J.C., Seixas, F.K., Collares, T., 2012. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). *Theriogenology* 77, 694-698.
- Devaney, S.A., Palomaki, G.E., Scott, J.A., Bianchi, D.W., 2011. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *Jama* 306, 627-636.
- Francioli, A.L., Cordeiro, B.M., da Fonseca, E.T., Rodrigues, M.N., Sarmiento, C.A., Ambrosio, C.E., de Carvalho, A.F., Miglino, M.A., Silva, L.A., 2011. Characteristics of the equine embryo and fetus from days 15 to 107 of pregnancy. *Theriogenology* 76, 819-832.
- Hasegaw, T., Sato, F., Ishida, N., Fukushima, Y., Mukoyama, H., 2000. Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. *J Vet Med Sci* 62, 1109-1110.
- Holder, R.D., 2014. Ultrasound Determination of Fetal Sex, In: *Equine Reproductive Procedures*. pp. 195-200.
- Hylan, D., Giraldo, A.M., Carter, J.A., Gentry, G.T., Jr., Bondioli, K.R., Godke, R.A., 2009. Sex Ratio of Bovine Embryos and Calves Originating from the Left and Right Ovaries1. *Biology of Reproduction* 81, 933-938.
- Kim, S.Y., Lim, J.H., Park, S.Y., Kim, M.Y., Choi, J.S., Ryu, H.M., 2012. Non-invasive prenatal determination of fetal gender using QF-PCR analysis of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chim Acta* 413, 600-604.

- Kotoyori, Y., Yokoo, N., Ito, K., Murase, H., Sato, F., Korosue, K., Nambo, Y., 2012. Three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. *Theriogenology* 77, 1480-1486.
- Mar, G., Castagnetti, C., Belluzzi, S., 2002. Equine fetal sex determination using a single ultrasonic examination under farm conditions. *Theriogenology* 58, 1237-1243.
- Mebarki, M., Kaidi, R., Azizi, A., Basbaci, M., 2019. Comparative efficacy of two-dimensional mode and color Doppler sonography in predicting gender of the equine fetus. *Vet World* 12, 325-330.
- Renaudin, C., 2000. Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender (31 Mar 2000).
- Resende, H.L., Carmo, M.T., Ramires Neto, C., Alvarenga, M.A., 2014. Determination of equine fetal sex by Doppler ultrasonography of the gonads. *Equine Vet J* 46, 756-758.
- Riera, F.L., Roldán, J.E., Espinosa, J.M., Fernandez, J.E., Ortiz, I., Hinrichs, K., 2019. Application of embryo biopsy and sex determination via polymerase chain reaction in a commercial equine embryo transfer program in Argentina. *Reprod Fertil Dev* 31, 1917-1925.
- Shea, B.F., 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogenology* 51, 841-854.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-244.
- Toenissen, A., Martinsson, G., Pricking, S., Otzen, H., Ertmer, F., Rau, J., Sielhorst, J., Rohn, K., Sieme, H., 2016. Transabdominal ultrasonographic determination of fetal gender in the horse during mid-gestation - a comparative study using randomized video images to investigate variation in diagnostic performance among raters, and the effect of month of gestation. *Pferdeheilkunde* 32, 29-+.
- Tonekaboni, F.R., Narenjisani, R., Staji, H., Ahmadi-Hamedani, M., 2020. Comparison of Cell-Free Fetal DNA Plasma Content Used to Sex Determination Between Three Trimesters of Pregnancy in Torkaman Pregnant Mare. *J Equine Vet Sci* 95, 103273.

Van de Velde, M., Roels, K., Ververs, C., Gerits, I., Govaere, J., 2018. Equine foetal gender determination in mid- to late gestational mares: A practical inquiry. *Reprod Domest Anim* 53, 1027-1032.

Yildirim, E., Aksoy, S., Onel, T., Yaba, A., 2020. Gonadal development and sex determination in mouse. *Reprod Biol* 20, 115-126.

Chapitre de livre

Barone, R., 2001: *Anatomie Comparee des Mammiferes Domestiques*, Tome 4, Splanchnologie II, 3eme edn. Paris: Editure Vigot.