

Etudes de chromosomes et autres relevés sur des croisements entre équidés

Gerald Stranzinger¹, Josef Achermann², Fengtang Yang³ et Dominik Burger⁴

¹EPFZ et VetsuisseZurich, Breedingbiology, 8092 Zurich

²Genetica AG Zurich, 8001 Zurich

³The Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK

⁴Haras national suisse HNS, 1580 Avenches

Renseignements: Gerald Stranzinger, Im Grund 27, 8123 Ebmatingen



Alpha (croisement jument) et Beta-poulain Trolle (père Begase).

Introduction

La famille des équidés comprend des nombres chromosomiques allant de $2n = 32$ (*E. zebra hartmannae*) à $2n = 66$ (*E. przewalskii*); (Ryder, Epel et Benirschke 1978). Le cheval domestique (*E. caballus*) avec $2n = 64$ chromosomes ne remonte pas au cheval Przewalski, la séparation évolutive ayant eu lieu il y a environ 2 millions d'années (Oakenfull *et al.* 2000; Graphodatsky et Yang 2008); les ancêtres directs de nos chevaux domestiques ont disparu. Dans les espèces d'équidés encore existantes, la fécondité des produits de croisement est très fortement limitée, à l'exception de ceux entre cheval domestique et Przewalski. Les mulets et les bardots ($2n = 63$) issus de croisements entre cheval et âne sont stériles à près de 100 %, et le développement des gonades diffère fortement entre les sexes. Les mulets et bardots femelles présentent un développement ovarien quasi complet, avec

maturation d'ovocytes et ovulation. Les mulets et bardots mâles développent une spermatogénèse dégénérative jusqu'à la puberté, leur éjaculat ne contenant pratiquement pas de spermatozoïdes (Allen et Short 1997). On a aussi étudié la désactivation des chromosomes X (hypothèse de Lyons – Lyon, 1961) chez les mulets femelles, et observé une désactivation préférentielle des chromosomes X asiniens; l'augmentation de l'âge des individus peut conduire à une sélection contre les cellules contenant le X asinien, d'où résulte une domination des cellules porteuses du X chevalin. Les X chevalin et asinien se différencient aussi sur le plan morphologique, le X chevalin étant métacentrique et le X asinien acrocentrique. Plusieurs différences s'observent entre les chromosomes autosomes asiniens et chevalins, qui peuvent en partie être mises en évidence grâce à des colorations par bandes (Yang *et al.* 2003; Trifonov *et al.* 2008). Du point de vue morphologique, les chromosomes X sont identiques entre le cheval domestique et le Przewalski; pourtant, une fusion selon Robertson entre les chromosomes 23 et 24 ramène à $2n = 64$ le nombre de chromosomes chez le cheval domestique; il en est issu le chromosome n° 5 typique du cheval. Ce fait a été documenté par des attributions de gènes (Ahrens 2004).

La population Przewalski, qui était pratiquement éteinte, a été si bien reproduite dans les jardins zoologiques au cours des 50 dernières années que des programmes de mise en liberté sont devenus possibles en Mongolie. Bien entendu, cette situation soulève de nouvelles questions, auxquelles on trouvera réponse par des analyses génétiques, études de comportement et autres expériences scientifiques (Feh et Munkhtuya 2008). Des cartes chromosomiques comparatives et des analyses génétiques ont fortement contribué à démarquer entre eux les différents équidés; en particulier, des colorations par bandes, des hybridations *in situ* et des analyses génomiques par scannage des chromosomes se sont avérées très utiles (Ansari *et al.* 1988; Bowling *et al.* 1997; Yang *et al.* 2003; Trifonov *et al.* 2008). Pour des raisons juridiques et biologiques, les essais de croisement entre

les espèces d'équidés ne sont possibles que de manière très restreinte; pourtant, les observations développées ci-après permettraient d'en déduire des connaissances de grande valeur.

Matériel et méthodes

L'étalon Przewalski provient du jardin zoologique de la Ville de Zurich (Langenberg), qui détient un troupeau Przewalski et des animaux rassemblés en vue de l'essai de mise en liberté en Mongolie. Un jeune étalon a été isolé d'un groupe de trois (étourdissement à l'aide d'un fusil narcotisant Teleinject-France et d'une seringue 3 ml S300V réutilisable), puis, à l'aide d'une clôture spéciale, il a été mis en présence d'une jument Haflinger en vue d'accouplement (fig. 1 a). L'accouplement, la gestation et la mise-bas ont été enregistrés par caméra vidéo. De même, l'élevage du poulain Alpha (fig. 1b), son développement, l'insémination avec la semence asinienne des baudets Babalu (fig. 1c) et Begase (fig. 1d), ainsi que la naissance des quatre poulains (Beta Jojo, Beta Lars, Beta Jasmin et Beta Trolle – de père Begase; fig. 1 e, f, g, h) ont été saisis et documentés avec précision. Des échantillons de sang et de poils ont été prélevés sur tous les animaux, et des cultures rapides de leucocytes (protocole de Genetica pour chromosomes humains) ont été établies pour l'analyse chromosomique. De plus, des biopsies musculaires ont été prélevées sur les animaux fondateurs, et des cultures de fibroblastes ont été faites (Ahrens 2004). Des préparations par bandes Q ont été mises en valeur par le système d'analyse Zeiss, et des caryogrammes ont été établis pour les animaux parents et pour Alpha. Puis les taux de testostérone ont été déterminés pour quelques animaux (tabl. 2). D'autre part, une étude histologique du placenta a été faite pour l'animal croisé Alpha lors de sa première mise-bas (naissance du poulain Beta Jojo; fig. 2a); enfin, une étude histologique des testicules a été faite pour le poulain mâle Beta Lars (fig. 2b). Chez le mâle croisé, les analyses méiotiques ont été élaborées par la méthode de préparation conventionnelle pour la représentation de diakinèses, de même que par l'étude du complexe synaptonémal. Toutes les particularités comportementales particulières ont été documentées.

Résultats

Analyses cytogénétiques

Le tableau 1 contient les résultats chromosomiques de tous les animaux étudiés dans la famille de croisements. La représentation des caryogrammes n'a été réalisée que pour les animaux fondateurs et la jument Alpha, la séquence des chromosomes dans les caryogrammes

Résumé Les croisements entre cheval et âne se produisent dans la nature; leurs produits, mulets et bardots, sont utilisés en agriculture. Les autres genres de croisement sont rares et peu étudiés. Les essais systématiques de croisement ne peuvent être conduits que sur autorisation exceptionnelle, ils sont fastidieux et coûteux, et par conséquent rarement entrepris. Dans le présent travail, des produits de croisements entre cheval domestique, Przewalski et âne, sont étudiés sur les plans cytogénétique et histologique, et leurs particularités en reproduction y sont décrits. Tous les animaux possédaient un jeu de chromosomes normal, conformément aux combinaisons possibles selon les ségrégations. A l'aide d'un Genomscan partiel, les résultats cytogénétiques ont été confirmés sur les chromosomes sexuels et les EPR 23 et 24. Les répercussions sur le développement évolutif sont discutés.

étant établie selon Hsu *et al.* (1967), et Ford *et al.* (1980). Elle n'a pas révélé de différences par rapport aux références bibliographiques et a été publiée dans la thèse de Ahrens (2004). Les chromosomes sexuels X asiniens et équins se distinguent clairement par la position des centromères: le X du cheval est métacentrique, celui de l'âne est submétacentrique à acrocentrique. Il n'y a pas de différence entre les chromosomes X du cheval et du Przewalski, de sorte qu'il n'a pas été possible de déterminer leur ségrégation en génération Beta, et qu'on a renoncé à faire des études sur marqueurs. Par contre, on peut identifier le chromosome asinien chez les descendants Beta femelles. Cette situation se retrouve clairement dans le Genomscan, où seuls les X asiniens peuvent être identifiés, le reste se composant des chromosomes ECA et EPR ségrégatifs aléatoires (fig. 2). La fig. 2f représente une métaphase de Beta Jasmin, dans laquelle on peut distinguer clairement entre les chromosomes Przewalski EPR 23 et 24 d'une part, et les homologues EAS 23 et 24 d'autre part, puisque les EPR ne comportent pas d'éléments de translocation (parties représentées en rouge). Seul l'étalon Beta Lars a reçu l'ECA 5 (fig. 1f et fig. 2d), chez qui on trouve n chromosomes = 63 (ECA 5q = EAS16 métacentrique - ECA 5 p = EAS 25 acrocentrique); tous les autres descendants d'Alpha possèdent les EPR 23 et 24 (Beta Jojo, Beta Jasmin et Beta Trolle), d'où résulte le nombre chromosomique $2n = 64$.



Figure 1 | Famille issue de croisements entre cheval, Przewalski et âne a) Jument Haflinger et étalon Przewalski, b) Jument Haflinger avec poulain F1 Alpha, c) baudet Babalu, d) baudet Begase, e) Alpha avec Beta Jojo, f) Beta Lars, g) Beta Jasmin, h) Alpha avec Beta Trolle. Entre (): nombre de chromosomes 2n

Dosage de la testostérone

Le tableau 2 montre que chez tous les animaux, les valeurs de testostérone se situent dans le domaine normal, avec toutefois des valeurs très basses chez le baudet Begase (1,31 myg/l), et relativement élevées chez la femelle Alpha (0,19 myg/l).

Études histologiques et cytologiques de gonades et de placentas

Les préparations testiculaires de Beta Lars n'ont révélé aucune spermatogénèse, par contre des formes dégénératives des spermatogonies (fig. 3), ce qui dénote sa stérilité totale. Ce constat a été confirmé par des préparations cytologiques des stades méiotiques et des préparations synaptoménales complexes. Les préparations his-

tologiques de tissu utérin d'Alina (jument Haflinger, mère d'Alpha) et d'Alpha elle-même n'ont pas révélé de différences (fig. 3a).

Observations du comportement

Lors de différentes tentatives, le comportement d'Alpha à la saillie était étonnant, aucune saillie n'ayant été possible ni par des étalons équins ni par des baudets. Ces étalons étaient régulièrement utilisés en accouplement au Haras, de sorte que leurs comportements lors de la saillie étaient connus. Alpha a présenté un comportement tellement dominant que tous les étalons ont refusé la saillie, se sont écartés d'Alpha et n'ont plus montré aucun intérêt. Il a fallu recourir à l'insémination pour obtenir les gestations chez Alpha. Il faut mentionner

Tableau 1 | Résultats des analyses chromosomiques et particularités de tous les animaux étudiés

Animal	sexe	n analyses	nombre de chrom.	particularités
Haflinger	fem.	2	64	aucune
Przewalski	mâle	1	66	aucune
Alpha	fem.	plusieurs	65	insémination
Beta Jojo	fem.	plusieurs	64	chaleurs fortes
Beta Lars	mâle	plusieurs	63	cryptorchide
Beta Jasmin	fem.	plusieurs	64	aucune
Beta Trolle	mâle	1	64	aucune
Ane, 2 animaux	mâles	plusieurs	62	aucune

Alpha et Beta – désignent en même temps la suite des générations.

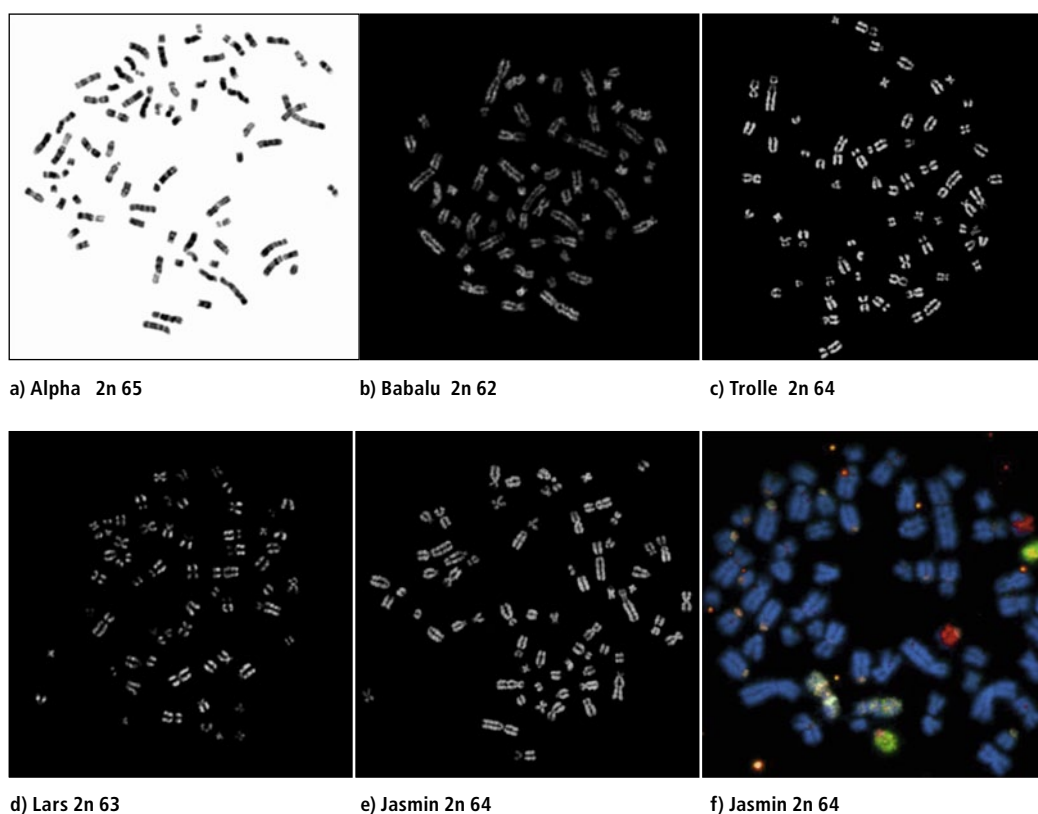


Figure 2 | Représentation des métaphases a) Jument croisée Alpha (bande G inversée); b) baudet (bande Q); c) mâle Beta Trolle (bande Q); d) mâle Beta Lars (bande Q); e) mâle Beta Jasmin (bande Q); f) mâle Beta Jasmin, Genom Scan; en bleu-blanc: chromosomes X, en vert: EPR 23; en rouge: EPR 24.

qu'Alpha a toujours été portante dès la première insémination, et a donné naissance à 4 poulains. Les mises-bas se sont toujours déroulées normalement et sans problèmes, pendant la nuit; l'élevage des poulains s'est toujours déroulé sans maladies ni accidents, avec de très bons accroissements journaliers. Le stade embryonnaire chez Alpha a été déterminé par ultrasons, les mises-bas enregistrées par caméra, et le développement ultérieur retenu en photographie. Alpha et les animaux Beta ont été soignés et conduits comme tout autre poulain. Le comportement des animaux Beta correspondait à celui de n'importe quel poulain mulassier.

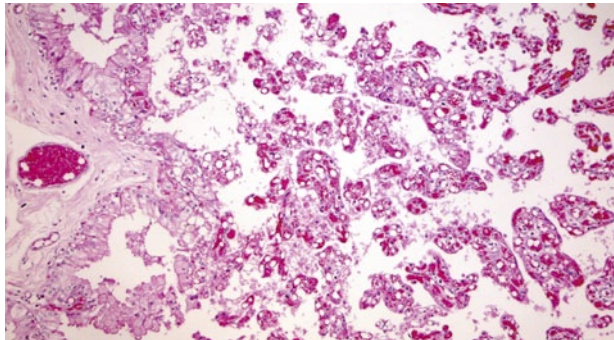
Discussion

Chez la totalité des animaux, les études cytogénétiques n'ont révélé aucune anomalie, ni structurelle ni numérique. La ségrégation chez les animaux Beta semble suivre les lois biologiques, puisque les deux formes ont été trouvées pour le ECA 5 et les homologues EPR 23 et 24. Dans plusieurs cas chez les animaux croisés Beta, on ne trouve pas d'homologies parmi les chromosomes asiniens (DiMeo *et al.* 2009). On a renoncé à établir des caryotypes, à cause de légères différences concernant la

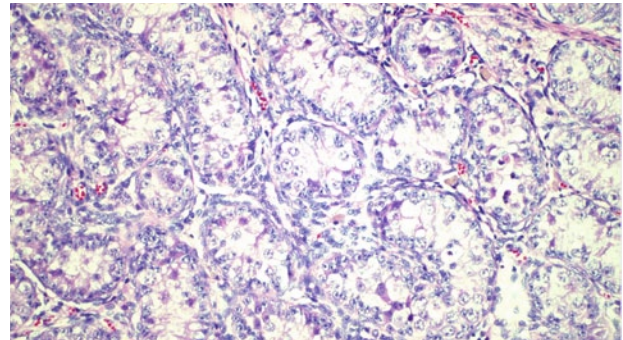
structure des bandes et la position des centromères, et qu'il n'a par conséquent pas été possible de les regrouper selon les standards de bandes équine ou asinien. La structure des chromosomes EAS diffère de celle des chromosomes ECA et EPR et se retrouve aussi chez les individus Beta, indiquant que leur état de fécondité pourrait correspondre à celui des mullets ou des bardots. Le comportement lors de l'accouplement diffère entre les deux espèces équine et asinienne, ce qui n'est pas le cas entre cheval et Przewalski. Seul l'accouplement entre l'étalon Przewalski et la jument Hafling a pu être observé, l'accouplement inverse n'ayant pas été possible pour des

Tableau 2 | Valeurs de testostérone chez les animaux de l'essai

animal	valeur mesurée	valeur de référence
baudet Babalu	5,31 myg/l	(0,5 - 4,0)
baudet Begase	1,31 myg/l	
Beta Lars (cryptorchyde)	< 0,02 myg/l	(0,1 - 0,3)
Alpha	0,19 myg/l	(0,02)
Beta Jasmin	<0,02 myg/l	



a) Placenta d'Alpha.



b) Testicules de Beta Lars.

Figure 3 | Coupes histologiques a) du placenta d'Alpha et b) des testicules de Beta Lars (préparations élaborées par le Prof. Dr. Pospischil, Faculté VetSuisse de l'Université de Zurich).

raisons techniques et juridiques. C'est le comportement de la jument Alpha, croisée F1, pendant ses chaleurs, qui était surprenant: les étalons mis en sa présence dans le paddock – mâles équins aussi bien que baudets – n'ont pas pu saillir cette jument en chaleurs et l'ont quittée après quelques tentatives pour ensuite se tenir à grande distance d'elle. Les gestations de la jument F1 n'ont pu être obtenues que par insémination. Malheureusement, il n'a pas été possible de faire l'essai avec un étalon Przewalski, suite à des accords par contrat. En transposant ces observations dans la nature, on peut supposer qu'une sélection a eu lieu contre l'ECA 5, les juments F1 n'étant alors saillies que par des étalons Przewalski. Puisque les études cytogénétiques sur animaux Przewalski citées jusqu'ici dans la littérature ne mentionnent aucun chromosome ECA 5, on peut admettre que les descendants d'animaux croisés dans la génération fondatrice ne sont issus que d'étalons Przewalski, de sorte que l'ECA 5 s'est perdu au fil des générations. Des phénomènes de crossing-over n'étant pas exclus, la présence du gène pour la robe alezan chez les Przewalski est possible, comme l'ont révélé nos études (non publiées). Par conséquent, les discussions au sujet de Przewalski «purs» et «autres» Przewalski ne sont donc qu'émotionnelles, ignorant les réalités biologiques. Les études présentées montrent que les différences de comportement des animaux F1 entre cheval et Przewalski jouent un rôle plus important dans la reproduction que les faits biologiques des différences entre chromosomes. Il serait intéressant de procéder à des études de crossing-over; ce phénomène semble plus probable entre les chromosomes ECA et EPR plutôt qu'entre les chromosomes EPR et EAS. L'étalon Beta Lars n'ayant pas présenté de spermatogenèse, les phénomènes méiotiques ne sont pas à prendre en considération dans ce cas. Suite à des expériences faites avec des mules femelles (Zong et Fun

1989), une oogénèse serait possible chez les femelles Beta, de sorte que l'étude des phénomènes méiotiques serait intéressante. L'ECA 5 du cheval représente un pur chromosome de fusion, constitué essentiellement des EPR 23 et 24; toutefois, des échanges de gènes par crossing-over peuvent se produire sur tous les chromosomes autosomes, touchant des allèles caractéristiques, qui peuvent alors s'exprimer lors d'accouplements particuliers. Dans cette optique, l'accouplement exclusif d'animaux Przewalski entre eux afin de sauvegarder «en race pure» ces chevaux sauvages est avantageux, sans qu'on puisse pourtant exclure totalement l'apparition d'allèles ECA dans la population. La femelle la plus âgée (Beta Jojo) a présenté en 2009 des chaleurs très violentes, de sorte qu'il a fallu la calmer à l'aide de préparations hormonales.

Lors de la mise en liberté des Przewalski en Mongolie, des croisements avec des juments équines sont possibles; au vu de nos observations, la combinaison inverse serait par contre plutôt rare. Il est possible que des juments croisées engendrent des descendants avec des étalons Przewalski dominants. Il est certain que les étalons équins et croisés ont un handicap de comportement par rapport aux étalons Przewalski. Dans la nature, et dans des territoires étendus, les accouplements forcés et l'insémination n'entrent pas en considération. ■

Riassunto**Studi cromosomici e altre indagini su incroci equini**

Incroci tra cavallo e asino si verificano in natura e il risultato di tale incrocio è utilizzato in agricoltura come muli o bardotti. Altri generi di incrocio sono rari e poco studiati. Esperimenti sistematici di incrocio sono autorizzati solo con permessi speciali, sono molto impegnativi in termini di costi e tempo e, pertanto, effettuati raramente. In questo lavoro incroci derivati dalla combinazione tra cavallo domestico, Przewalski e asino sono stati esaminati citogeneticamente e istologicamente, descrivendo pure il loro comportamento in specifiche caratteristiche riproduttive. Tutti gli animali hanno mostrato un normale numero di cromosomi dopo la segregazione delle possibili combinazioni. I risultati citogenetici sono stati confermati con un parziale scan del genoma, in particolare dei cromosomi sessuali e degli EPR 23 e 24. Le conseguenze nello sviluppo evolutivo sono discusse.

Summary**Chromosome studies and other investigations on equid crossings**

Crossings between horses and donkeys are in nature possible and are used as mules or hinnies in agriculture. Other types of crossings are rare and scarcely investigated. Systematic experiments are only allowed with special agreements and are very time consuming and costly and therefore rare. In this report crossings between horse, Przewalski and donkey are cytogenetically and histologically investigated and their behaviour in special reproductive traits described. All animals have shown a normal chromosome set following the segregation of possible combinations. The cytogenetic results have been confirmed by a genomescan for the sex chromosomes and the EPR 23 and 24. The consequences in the evolutionary development are discussed.

Key words: Equid, chromosome, histology, behaviour.

Bibliographie

- Ahrens E. J., 2004. Comparative chromosomal studies of *E. caballus* and *E. przewalskii* in a F1 hybrid. Vet. Diss. Zurich, 1–101.
- Allen W. R. & R. V. Short, 1997. Interspecific and Extraspecific Pregnancies in Equids: Anything Goes. *Journal of Heredity* **88**, 384–392.
- Ansari H. A., Hediger R, Fries R. & Stranzinger G., 1988. Chromosomal localisation of the major histocompatibility complex of horse (ELA) by in situ hybridisation. *Immunogenetics* **28**, 362–364.
- Bowling A. T., Breen M., Chowdhary B. P. et al. (Committee), 1997. International system for cytogenetic nomenclature of the domestic horse. *Chromosome Res.* **5**, 433–443.
- Feh C. & Munkhtuya B., 2008. Male infanticide and paternity analyses in a socially normal herd of Przewalski's horses: Sexual selection. *Behavioural Processes* **78**, 335–339.
- Di Meo G. P., Perucatti A., Peretti V., Incarnato D., Ciotola F., Liotta L., Raudsepp T., Di Bernardino D., Chowdhary B. & Ianuzzi L., 2009. The 450-Band Resolution G- and R- Banded Standard Karyotype of the Donkey (*Equus asinus*, 2n = 62). *Cytogenet Genome Res.* **125**, 266–271.
- Ford C. E., Pollock D. L. & Gustavsson I., 1980. Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of domestic Animals, Reding, UK, 1976. *Hereditas* **92**, 145–162.
- Graphodatsky A. S. & Yang F., 2008. Multidirectional cross-species painting illuminates the history of karyotypic evolution in Perissodactyla. *Chromosome Research* **16**, 89–107.
- Hsu T. C. & Benirschke K., 1967. An Atlas of Mammalian Chromosomes. Springer Verlag: Berlin-Heidelberg-New York.
- Koulischer L., & Fechkop S., 1966. Chromosome complement: A fertile hybrid between *Equus przewalskii* and *Equus caballus*. *Science* **151**, 93 – 95.
- Lyon M. F., 1961. Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**, 372–373.
- Oakenfull E. A., Lim H. N. & Ryder O. A., 2000. A survey of equid mitochondrial DNA: Implications for the evolution, genetic diversity and conservation of Equus. *Conservation Genet* **1**, 341–355.
- Ryder O. A., Epel N. C. & Benirschke K., 1978. Chromosome banding studies of the Equidae. *Cytogenet. Cell Genet* **20**, 323–350.
- Trifonov V. A., Stanyon R., Nesterenko A. I., Beiyuan F., Perelman P. L., O'Brien P. C. M., Stone G., Rubtsova N. V., Houck M. L., Robinson T. J., Ferguson-Smith M. A., Dobigny G., Graphodatsky A. S. & Yang F., 2008. Multidirectional cross-species painting illuminates the history of karyotypic evolution in Perissodactyla. *Chromosome Research* **16**, 89–107.
- Yang F., Beiyuan F., Patricia C. M., O'Brien, Wenhui N., Ryder O. A., Malcolm A. & Ferguson-Smith, 2003. Refined genome-wide comparative map of the domestic horse, donkey and human based on cross-species chromosome painting: insight into the occasional fertility of mules. *Chromosome Research* **5**, 433–443.
- Zong E. & Fan G., 1989. The variety of sterility and gradual progression to fertility in hybrids of the horse and donkey. *Heredity* **62**, 393–406.