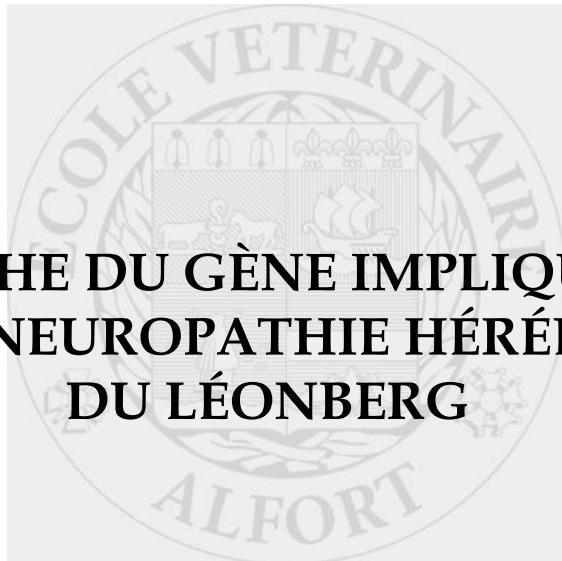


Année 2010



**RECHERCHE DU GÈNE IMPLIQUÉ DANS
LA POLYNEUROPATHIE HÉRÉDITAIRE
DU LÉONBERG**

THESE

Pour le

DOCTORAT VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

le
par

Claire, Marion VIALLET-LE BORGNE-GODENER

Née le 9 septembre 1984 au Chesnay (Yvelines)

JURY

**Président : M.
Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL**

Membres

**Directeur : Dr Marie Abitbol
Maître de Conférences à l'ENVA
Assesseur : Pr Stéphane Blot
Professeur à l'ENVA**

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. BRUGERE Henri, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, CRESPEAU François

LE BARS Henri, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henry, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE Mme COMBRISSON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur M. TISSIER Renaud, Maître de conférences* M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p>	<p>-UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences M. REYES GOMEZ Edouard, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences* M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p> <p>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE M. PHILIPS, Professeur certifié</p>
--	---

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

<p>- UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Professeur M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Professeur* Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier Mlle CHRISTMANN Undine, Maître de conférences Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel M. CARNICER David, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Professeur (rattachée au DPASP) M. NUDELmann Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences* M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)</p> <p>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS Mme Françoise ROUX, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MOISSONNIER Pierre, Professeur M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences M. JARDEL Nicolas, Praticien hospitalier</p> <p>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier</p> <p>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIGNAC Geneviève, Maître de conférences Mme HALOS Lénaïg, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier</p> <p>- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT M. GRANDJEAN Dominique, Professeur * Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel</p> <p>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur</p>
--	---

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

<p>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Professeur Mme DUFOUR Barbara, Professeur Melle PRAUD Anne, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences contractuel</p>	<p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Professeur*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences * M. BELBIS Guillaume, Maître de conférences contractuel</p>
--	--

* Responsable de l'Unité

REMERCIEMENTS

*Au Président du Jury,
Professeur de la Faculté de Médecine de Créteil,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommage respectueux.*

*À Mademoiselle le Docteur Marie Abitbol,
Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Pour m'avoir proposé ce sujet et guidée dans la réalisation des expériences et de la rédaction,
Pour son aide, sa patience, sa gentillesse,
Remerciements chaleureux.*

*À Monsieur le Professeur Stéphane Blot,
Professeur de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Qui a accepté de participer au jury de cette thèse,
Sincères remerciements.*

*À toute l'équipe de l'UMR 955 Génétique Fonctionnelle et Médicale
de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Aux membres de l'unité de Neurologie de l'ENVA,
À Monsieur le Docteur Nicolas Granger,
Au laboratoire Antagene,
Aux Docteurs Catherine André et Christophe Hitte, à Stéphane Dréano de l'UMR 6061
Génétique et Développement CNRS-Université de Rennes 1,
Aux éleveurs et propriétaires de Léonbergs,
En reconnaissance de leur contribution, leur aide et leurs connaissances,
Pour leur sympathie,
Remerciements.*

**À toi, Romain,
Mon Amour,**

Mon compagnon de route et mon port d'attache,
Merci pour ta tendresse, ton soutien, pour tout l'amour que tu me donnes,
Merci pour ta confiance, pour avoir tout misé, avec moi, sur notre avenir,
Merci pour ces années que nous allons traverser main dans la main,
Je t'aime !

À Quentin, mon tout-petit,

Merci pour ta patience lors de la rédaction de cette thèse,
Pour les pauses biberons bienvenues,
Pour tes sourires qui m'apportent tant de joie,
Pour toutes tes découvertes et bêtises à venir...

Trouve ici et dans tous mes gestes du quotidien, le témoignage de tout l'amour de ta Maman.

À ma Maman,

Sans qui tout cela n'aurait pas été possible,
Pour m'avoir supportée dans tous les sens du terme pendant toutes ces années,
Pour ton amour indéfectible,
Trouve ici l'expression de toute ma gratitude et ma reconnaissance.

À Pépé et à Mamie,

Pour votre présence, votre appui, votre gentillesse,
Pour y avoir cru sans doute plus que moi,
Merci beaucoup !

À mes ami(e)s,

Celles de toujours : Stéphanie W., Pauline, Clotilde,
Celles de prépa : Coralie (ARN), Nantenaina (PGA), Emmanuelle (LS), Émilie (GGO),
Stéphanie (LO) et Sandrine (SDL)

Mon groupe de clinique : Camille, Sabine, Laurie, Claire, Hannah, Caroline, Pérevel,
Emmeline, Coralie, Stéphanie et Alex,

À ma famille espagnole,

Et à tous ceux qui m'ont entourée,
Pour votre soutien et vos encouragements,
Mille mercis !

Aux médecins et sages-femmes

Qui nous ont permis à Quentin, Romain et moi d'aller au bout de ces 8 mois si précieux mais tellement éprouvants : merci !

À tous les vétérinaires qui m'ont accueillie en stage et embauchée,

Merci pour toutes ces connaissances que vous avez accepté de me faire partager !

À Dynamite,

Petite boule de poils installée sur mes genoux, derrière mon dos ou sur mes documents,
Merci pour tes câlins réconfortants !

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
LISTE DES FIGURES.....	3
LISTE DES TABLEAUX.....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	9
PREMIÈRE PARTIE :	11
La maladie de Charcot-Marie-Tooth	11
1. Une maladie, des neuropathies	13
2. Tableau clinique des CMT	16
a. Déficits moteurs	16
b. Déficits sensitifs	17
c. Autres signes cliniques	18
d. Variations phénotypiques en lien avec le type de CMT	18
e. Évolution	19
3. La recherche génétique sur les CMT	20
4. Les traitements et essais cliniques en cours.....	24
a. Accompagnement thérapeutique.....	24
b. Traitement pharmacologique	26
c. Essais thérapeutiques.....	27
• L'onapristone	29
• La vitamine C	29
• La curcumine.....	30
• La neurotrophine 3	31
• Thérapie génique	31
DEUXIÈME PARTIE :	35
La polyneuropathie héréditaire.....	35
du Léonberg	35
1. Les symptômes associés à la maladie	37
2. L'examen neurologique.....	39
3. Diagnostic différentiel	41
4. Les moyens d'exploration	42
5. Étiologie	50
6. Pronostic et traitement.....	52
7. Intérêt de l'étude de cette maladie	52

8.	Recherche génétique appliquée à la polyneuropathie héréditaire du Léonberg	56
a.	Le mode de transmission	56
b.	Les marqueurs génétiques	57
•	Les microsatellites	58
•	Les <i>Single Nucleotide Polymorphism (SNP)</i>	60
c.	La <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	60
d.	Les cartes génétiques	66
•	Les cartes génétiques ou de liaison.....	66
•	Le séquençage du génome du Chien.....	67
e.	Identification des gènes mutés	68
•	Le clonage positionnel	68
•	L'approche gène candidat.....	70
f.	L'utilisation chez l'Homme des résultats obtenus chez le Chien.....	71
	 TROISIÈME PARTIE :.....	73
	Recherche expérimentale du gène impliqué dans la polyneuropathie héréditaire du Léonberg	73
1.	Matériel et méthode	75
a.	Animaux	75
b.	De l'animal à son ADN	76
c.	Marqueurs utilisés.....	79
d.	Protocole de PCR.....	83
e.	Analyse des produits de PCR	84
f.	Analyses statistiques.....	84
2.	Résultats.....	84
3.	Discussion.....	127
	 CONCLUSION	133
	 BIBLIOGRAPHIE	135
•	Annexe 1 : Tableau récapitulatif des Léonbergs inclus dans notre étude	145
•	Annexe 2 : Protocole du kit « Genomi Phi V 2 Amplification kit » (GE Healthcare)	148
•	Annexe 3 : PATTERSON N. Leonberger's polyneuropathy update.....	155

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Dessin des différentes formes d'atteintes nerveuses lors de CMT.....	15
Figure 2 : Physiopathologie et pistes thérapeutiques.....	28
Figure 3 : Inhibition ciblée de l'expression d'un gène <i>in vivo</i>	32
Figure 4 : Dessin de César, Léonberg appartenant à Mr Bergmann, par H. Leutemann (1870).....	35
Figure 5 : Différents types de tracés rencontrés lors d'un examen électromyographique.....	44
Figure 6 : Schéma de la technique de détermination de la vitesse de conduction motrice du nerf ulnaire.....	45
Figure 7 : Lésions nerveuses élémentaires : dégénérescence axonale et demyélinisation segmentaire.....	47
Figure 8 : Photographie de biopsies du nerf fibulaire sur des Léonbergs atteints de polyneuropathie héréditaire.....	49
Figure 9 : Schéma de l'hérédité autosomique récessive.....	57
Figure 10 : Principe d'utilisation des microsatellites.....	59
Figure 11 : Le principe de la PCR.....	61
Figure 12 : Les étapes de la PCR au niveau moléculaire.....	62
Figure 13 : Relation entre le nombre de copies de séquence d'ADN obtenues et le nombre de cycles de PCR.....	63
Figure 14 : Photographie du gel d'agarose de contrôle de PCR obtenu pour le marqueur REN65A09.....	64
Figure 15 : Pics de fluorescence obtenus pour le marqueur REN146G17.....	65
Figure 16 : <i>Crossing-over</i> lors de la méiose.....	66
Figure 17 : Dessin de trois léonbergs, à partir d'une photographie personnelle.....	73
Figure 18 : Photographie d'un Léonberg en cours de prélèvement par frottis buccal.....	77
Figure 19 : Résultats de l'étude d'association effectuée sur les Léonbergs.....	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des CMT	14
Tableau 2 : Localisation des gènes impliqués lors de CMT.....	20
Tableau 3 : Présentation des protéines mutées lors de CMT.....	23
Tableau 4 : Liste des molécules contre-indiquées lors de CMT.....	27
Tableau 5 : Questionnement du propriétaire et symptômes associés.....	38
Tableau 6 : Différences entre neuropathie et myopathie.....	41
Tableau 7 : Électrodiagnostic des affections neuromusculaires.....	46
Tableau 8 : Principales modifications de l'électromyogramme et de la vitesse de conduction pour des lésions nerveuses élémentaires.....	48
Tableau 9 : Étiologie d'une polyneuropathie.....	51
Tableau 10 : Correspondance entre les gènes responsables de CMT chez l'Homme et les gènes orthologues canins.....	54
Tableau 11 : Liste des marqueurs du MSS-2 utilisés.....	80
Tableau 12 : Liste des marqueurs complémentaires utilisés.....	82
Tableau 13 : Correspondance des différents allèles de marqueurs avec le nombre de répétitions.....	86
Tableau 14 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3115 - 1 -	86
Tableau 15 : Résultats de l'amplification du marqueur REN298N18 - 1 -	87
Tableau 16 : Résultats de l'amplification du marqueur REN303C04 - 1 -	87
Tableau 17 : Résultats de l'amplification du marqueur REN195B08 - 1 -	88
Tableau 18 : Résultats de l'amplification du marqueur C11.873 - 1 -	88
Tableau 19 : Résultats de l'amplification du marqueur DGN13 - 1 -	89
Tableau 20 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3951 - 1 -	89
Tableau 21 : Résultats de l'amplification du marqueur REN214L11 - 1 -	90
Tableau 22 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3221 - 1 -	90
Tableau 23 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3924 - 1 -	91
Tableau 24 : Résultats de l'amplification du marqueur LEI002 - 1 -	91
Tableau 25 : Résultats de l'amplification du marqueur C28.176 - 1 -	92
Tableau 26 : Résultats de l'amplification du marqueur REN45F03 - 1 -	92
Tableau 27 : Résultats de l'amplification du marqueur CPH2 - 1 -	93
Tableau 28 : Résultats de l'amplification du marqueur FH2875 - 1 -	93
Tableau 29 : Résultats de l'amplification du marqueur REN94K23 - 1 -	94
Tableau 30 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3115 - 2 -	95
Tableau 31 : Résultats de l'amplification du marqueur REN298N18 - 2 -	96
Tableau 32 : Résultats de l'amplification du marqueur REN303C04 - 2 -	97
Tableau 33 : Résultats de l'amplification du marqueur REN195B08 - 2 -	98
Tableau 34 : Résultats de l'amplification du marqueur C11.873 - 2 -	99
Tableau 35 : Résultats de l'amplification du marqueur DGN13 - 2 -	100

Tableau 36 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3951 - 2 -	101
Tableau 37 : Résultats de l'amplification du marqueur REN214L11 - 2 -	102
Tableau 38 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3221 - 2 -	103
Tableau 39 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3924 - 2 -	104
Tableau 40 : Résultats de l'amplification du marqueur LEI002 - 2 -	105
Tableau 41 : Résultats de l'amplification du marqueur C28.176 - 2 -	106
Tableau 42 : Résultats de l'amplification du marqueur REN45F03 - 2 -	107
Tableau 43 : Résultats de l'amplification du marqueur CPH2 - 2 -	108
Tableau 44 : Résultats de l'amplification du marqueur FH2875 - 2 -	109
Tableau 45 : Résultats de l'amplification du marqueur REN94K23 - 2 -	110
Tableau 46 : Correspondance des différents allèles de marqueurs du chromosome canin 27 avec le nombre de répétitions	111
Tableau 47 : Résultats de l'amplification du marqueur FH2289.....	112
Tableau 48 : Résultats de l'amplification du marqueur PEZ16	113
Tableau 49 : Résultats de l'amplification du marqueur REN304E24	114
Tableau 50 : Résultats de l'amplification du marqueur REN173L15	115
Tableau 51 : Résultats de l'amplification du marqueur LEI002 - 3 -	116
Tableau 52 : Résultats de l'amplification du marqueur REN65A09	117
Tableau 53 : Résultats de l'amplification du marqueur C27.502	118
Tableau 54 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3221 - 3 -	119
Tableau 55 : Résultats de l'amplification du marqueur C27.671	120
Tableau 56 : Résultats de l'amplification du marqueur REN56C20	121
Tableau 57 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3924 - 3 -	122
Tableau 58 : Résultats de l'amplification du marqueur PEZ6	123
Tableau 59 : Résultats de l'amplification du marqueur REN100M16	124
Tableau 60 : Résultats de l'amplification du marqueur REN181L14	125
Tableau 61 : Résultats de l'amplification du marqueur REN72K15	126

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

BDNF : *brain-derived neurotrophic factor* : facteur dérivé de l'encéphale

BET : bromure d'éthidium

cM : centiMorgan

CMT : maladie de Charcot-Marie-Tooth

CNTF : *ciliary neurotrophic factor* : facteur neurotrophique ciliaire

cR : centiRay

Cx32 : connexin 32

dATP : désoxyadénosine triphosphate

dCTP : désoxycytidine triphosphate

dGTP : désoxyguanosine triphosphate

DNM2 : dynamin 2

dTTP : désoxythymidine triphosphate

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

EGR2 : *early growth response protein 2*

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMEA : *european medicines agency* : agence européenne du médicament

EMG : électromyogramme

ENVA : École Nationale Vétérinaire d'Alfort

ENVL : École Nationale Vétérinaire de Lyon

EST : *expressed sequence tag*

FGD4 : *FYVE, RhoGEF, and PH domain-containing protein 4*

GARS : *glycyl-tRNA synthetase*

GAS3 : *growth arrest-specific 3* : autre nom de PMP22

GDAP1 : *ganglioside induced differentiation associated protein 1*

HSPB : *heat shock protein beta*

KIF1B : *kinesin-like protein 1Bβ*
LITAF : *lipopolysaccharide induced tumor necrosis alpha factor*
LMNA : *lamin A/C*
Mb : mégabase
MFN2 : mitofusine 2
MgCl₂ : chlorure de magnésium
MNP : motoneurone périphérique
MSS-2 : *minimal screening set 2*
MTMR : *myotubularin-related protein*
NaCl : chlorure de sodium
NDRG1 : *N-myc downstream regulated gene 1 protein*
NEFL : *neurofilament light polypeptide*
NGF : *nerve growth factor* : facteur de croissance nerveux
P0 : *myelin protein zero*
pb : paire de bases
PCR : *polymerase chain reaction*
PMP22 : *peripheral myelin protein 22*
PRPS1 : *phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-1*
PRX : *periaxin*
RAB7 : *ras-related protein 7*
RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*
SDS : dodécylsulfate de sodium
SH3TC2 : *SH3 domain and tetratricopeptide repeat domain 2*
SLB : solution de lyse des globules blancs
SLR : solution de lyse des globules rouges
SNP : *single nucleotide polymorphism*
T4 : thyroxine (tétra-iodothyronine)
TAE : TRIS, Acétate et EDTA
TRIS : trishydroxyméthylaminométhane
TSH : *thyroïd stimulating hormone*
VNTR : *variable number of tandem repeat*
YARS : *tyrosyl-tRNA synthetase*

INTRODUCTION

La race Léonberg - ou lion des montagnes - est apparue au XIXème siècle. Selon la légende, elle serait le fruit du croisement d'un Saint-bernard, d'un Terreneuve et d'un Montagne des Pyrénées, et serait née dans l'élevage de Heinrich Essig (1808-1889), conseiller municipal de la ville de Léonberg. Les premiers Léonbergs ont très vite envahi les cours européennes, mais la race a peiné à se faire une place face aux Saint-bernards jusqu'à ce que le standard soit écrit en 1895. Ce n'est qu'au XXème siècle, malgré les ravages des deux guerres mondiales pour cette race, que la sélection et l'élevage se sont organisés.

Comme de nombreux chiens de grande taille, il arrive que parvenus à un âge avancé, certains Léonbergs présentent des difficultés locomotrices. Parmi les affections qui peuvent survenir, on trouve la polyneuropathie héréditaire qui fait l'objet de cette étude. La maladie semble être apparue récemment avec un pic de cas ces dix dernières années. Elle inquiète fortement en raison principalement de la gravité des symptômes, de leur apparition parfois tardive et de l'attachement très fort qui lie les chiens de cette race à leurs propriétaires. Le sujet reste tabou : la race n'est pas très développée et le monde du Léonberg est petit, parfois même secret. Assez peu d'informations circulent au sujet de la gravité et du nombre de cas, même si actuellement, dans le monde, 5 équipes de chercheurs travaillent sur les neuropathies du Léonberg.

La présente étude a été faite dans le but de mieux comprendre le mode de transmission de la maladie et sa physiopathologie, et dans l'espoir de trouver le gène impliqué et de le localiser, complétant ainsi la carte génétique du Chien. L'objectif final est, à terme, de pouvoir proposer un test génétique de dépistage pour cette affection, qui permettra de sélectionner les reproducteurs et de minimiser les risques de voir cette maladie perdurer.

Nous ferons tout d'abord une étude du syndrome de Charcot-Marie-Tooth, qui est un ensemble d'affections neurologiques humaines proches de la polyneuropathie du Léonberg, puis nous nous pencherons sur la polyneuropathie héréditaire du Léonberg et la recherche génétique dans ce domaine. Enfin, nous présenterons notre étude en génétique et ses résultats.

PREMIÈRE PARTIE :

La maladie de Charcot-Marie-Tooth

1. Une maladie, des neuropathies

La maladie de Charcot-Marie-Tooth ou CMT porte le nom des trois scientifiques qui ont décrit, indépendamment, en 1886, des neuropathies familiales. Jean Martin Charcot et Pierre Marie ont titré leur article dans la revue de médecine de Paris « Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains » (28). Howard H. Tooth a publié sa thèse de médecine à l'Université de Cambridge en Angleterre trois mois plus tard et l'a intitulée : « *The peroneal type of progressive muscular atrophy* » (110). C'est lui qui parle le premier d'atrophie musculaire péronière et qui suspecte une atteinte primitive du nerf. Actuellement, la maladie de Charcot-Marie-Tooth regroupe en fait des neuropathies périphériques héréditaires parmi les plus fréquentes en France, qui affectent les nerfs moteurs et sensitifs du système nerveux périphérique ou SNP. Elle concerne 1 naissance sur 2 500 en France et 30 000 personnes en sont actuellement atteintes sans distinction de sexe ni d'âge (77). On trouve incluses sous l'appellation CMT des neuropathies axonales (type 2), démyélinisantes (type 1) et intermédiaires associées à une parésie des cordes vocales.

Ce sont les points de convergence entre les anomalies observées sur des Léonbergs atteints de polyneuropathie distale et les patients humains atteints du syndrome de Charcot-Marie-Tooth, tant sur le plan clinique qu'électrophysiologique qui nous intéressent :

- faiblesse,
- amyotrophie distale des membres postérieurs,
- diminution voire absence de réflexes tendineux,
- démarche de cheval : pseudohypermétrie, parfois avec des troubles sensitifs distaux.

Il faut noter que ce syndrome n'entraîne chez l'Homme ni diminution de l'espérance de vie, ni retard mental.

Sous le nom de Charcot-Marie-Tooth sont regroupées plusieurs affections qui bien qu'elles engendrent le même tableau clinique, donnent lieu à autant de possibilités de mode de transmission et de gènes mis en cause. Cette diversité est apparue au fur et à mesure de la découverte de nouvelles familles atteintes au sein desquelles les données cliniques, électrophysiologiques, histologiques et génétiques ne concordaient pas avec les connaissances médicales de l'époque. Il a donc fallu réorganiser la classification des CMT. Nous ne présenterons ici que la classification la plus récente, utilisée depuis les avancées de la biologie moléculaire. On trouve d'autres noms pour la maladie de Charcot-Marie-Tooth tels que neuropathie héréditaire sensitive et motrice ou HMSN en anglais, et atrophie musculaire péronière. (16, 17, 27, 43, 46, 90, 113)

Les CMT sont classées selon le mode de transmission de la maladie et les résultats de l'examen électroneuromyographique comme le montre le tableau 1 ci-dessous (40). Chaque type est ensuite divisé en sous-types (A, B). À l'origine, la dénomination CMT4 désignait toutes les formes récessives. Aujourd'hui on utilise le terme CMT4 pour les formes récessives démyélinisantes et AR-CMT2 pour les formes récessives axonales.

Tableau 1 : classification des CMT (40)

CMT	Répartition	Forme	Transmission	Vitesse de conduction
CMT1	50%	demyélinisante	autosomique dominante	- baisse caractéristique de la vitesse de transmission de l'influx nerveux généralement inférieure à 20m/sec
CMT2	30%	axonale	autosomique dominante	- vitesse de conduction normale (40 m/sec) - diminution de l'intensité du signal électrique
CMT4		demyélinisante	autosomique récessive	- baisse caractéristique de la vitesse de transmission de l'influx nerveux généralement inférieure à 20m/sec
CMTX	10%	intermédiaire	dominante liée à l'X	- léger ralentissement de la vitesse de conduction
AR-CMT2		axonale	autosomique récessive	- vitesse de conduction normale (40 m/sec)

Légende :

CMT : maladie de Charcot-Marie-Tooth

CMTX : CMT liée à l'X

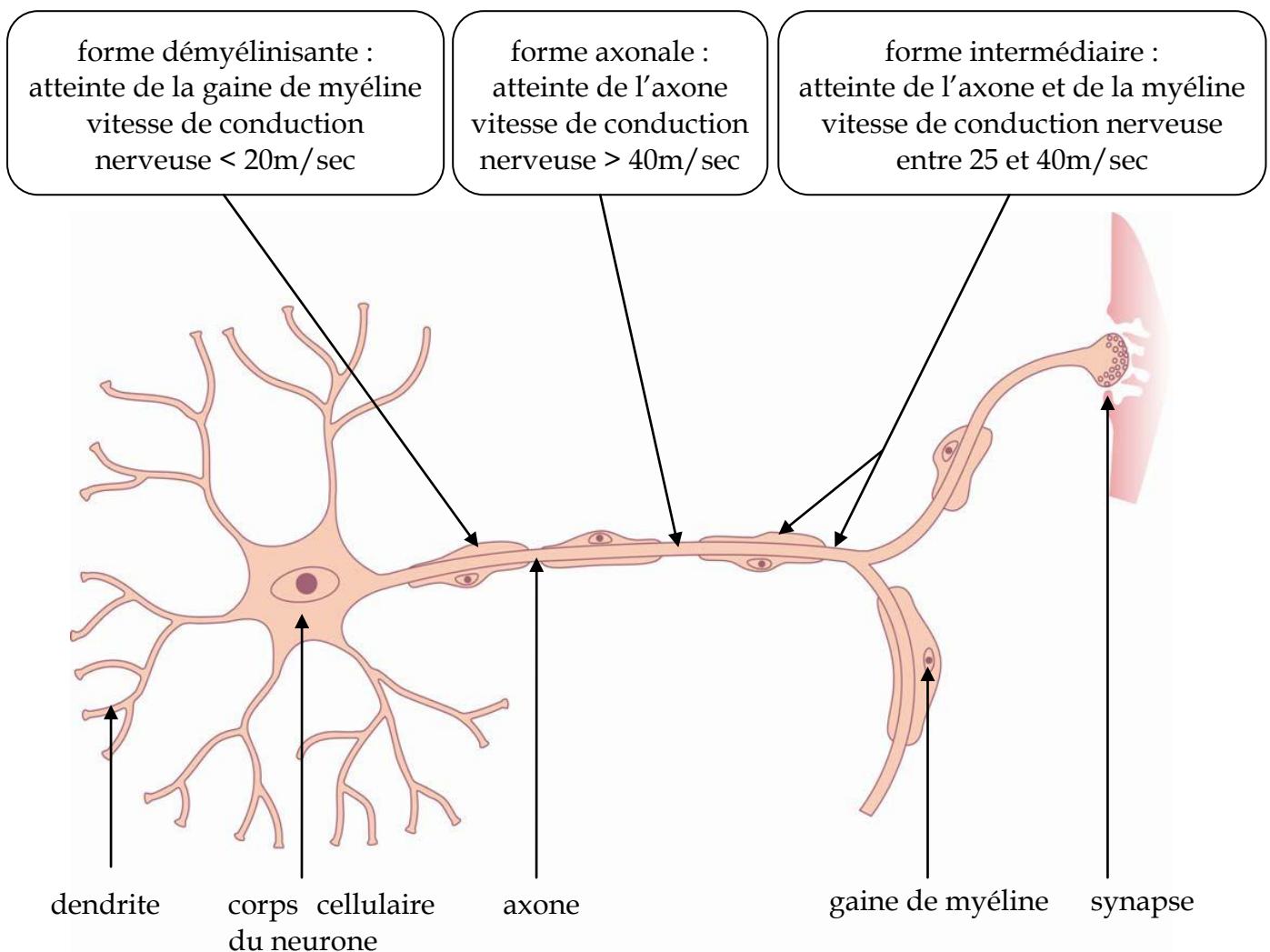
AR-CMT : CMT autosomique récessive

Il faut préciser que les CMT dominantes liées à l'X sont caractérisées cliniquement par un phénotype de CMT plus marqué chez l'homme, tandis que la femme porteuse de l'anomalie est asymptomatique ou pauci-asymptomatique. Ceci peut entraîner une confusion avec un mode de transmission récessif lié à l'X quand la maladie est asymptomatique chez les femmes d'une même famille.

L'examen électromyographique a mis en évidence trois grands types de CMT, qui sont, comme le montre la figure 1, les formes axonales, démyélinisantes et intermédiaires. L'axone, ou fibre nerveuse, est le prolongement du corps cellulaire d'un neurone qui conduit l'influx nerveux sous forme de potentiels d'action, de

manière centrifuge, vers les synapses. Il est recouvert d'une gaine de myéline, qui est une enveloppe isolante, riche en lipides, synthétisée par les cellules de Schwann. La myéline permet une vitesse de conduction élevée (jusqu'à 120m/sec sur un sujet sain). (49)

Figure 1 : Dessin des différentes formes d'atteintes nerveuses lors de CMT



Légende :

Le neurone représenté sur ce dessin est composé de trois parties : un corps cellulaire, des dendrites et un axone. Une synapse est représentée sur le bord droit du dessin, à l'extrémité de l'axone. L'axone est entouré de manchons de myéline.

Grâce à une biopsie nerveuse, une perte des fibres myélinisées peut être observée tandis que les fibres amyéliniques sont relativement conservées, dans le cas des CMT démyélinisantes. Le processus de démyélinisation segmentaire se traduit alors par la présence de « bulbes d'oignons », inconstants en début d'évolution de la maladie. L'épaisseur de la myéline est diminuée. L'hypertrophie des racines, des

plexus et des troncs nerveux est liée à la prolifération des cellules de Schwann. Dans le cas de CMT axonales, on constate une perte des fibres myéliniques et amyéliniques, ainsi que de nombreux groupements de régénération. La biopsie nerveuse n'est aujourd'hui utilisée qu'à titre exceptionnel, pour des formes très précoces et graves de CMT. En effet, elle a été remplacée par l'électrophysiologie qui apporte les mêmes éléments d'informations tout en ayant l'avantage d'être une méthode moins invasive. (9, 97)

2. Tableau clinique des CMT

Bien que les CMT recouvrent une formidable variété de présentations cliniques, on peut néanmoins dégager quelques caractéristiques communes. Les symptômes apparaissent généralement lors de la première ou deuxième décennie de la vie. La majorité des individus atteints manifestent des symptômes vers 27 ans. Mais dans les familles déjà touchées par des formes de CMT, on peut toutefois effectuer un dépistage dans l'enfance grâce à l'électrophysiologie. (27, 40, 43)

a. Déficits moteurs

Les CMT sont caractérisées par un déficit moteur, qui débute en général par les membres inférieurs : pieds et orteils. L'amyotrophie résultant de ce déficit moteur est symétrique. Elle touche d'abord les muscles intrinsèques des pieds, puis les extenseurs des orteils, des péroniers ou du jambier intérieur. La forme du pied se modifie, de façon asymétrique chez 80% des individus. Ils deviennent creux, plus rarement plats et exceptionnellement, cela entraîne des pieds bots. Les orteils se rétractent et prennent une forme de griffe ou de marteau. Le premier signe est généralement le creusement du pied. Il s'accompagne peu à peu d'une instabilité de la posture, ce qui provoque des chutes, des entorses et une difficulté à courir. Quand la maladie se révèle précocement dans l'enfance, des signes peuvent apparaître dès l'âge de la marche. Toutefois, ce dernier est rarement retardé.

Avec l'évolution de la maladie, le compartiment tibial antérieur et externe de la jambe est atteint préférentiellement, d'où une instabilité, des risques d'entorses à répétition et de chutes. La faiblesse des muscles péroniers entraîne une flexion dorsale du pied au cours de la marche. Le patient fléchit la cheville et le genou à chaque pas. On appelle cette démarche *steppage* ou démarche de cheval. Plus tardivement, les mollets prennent un aspect en « mollets de coq ». Quand le déficit atteint la cuisse et devient proximal, cela peut provoquer une démarche dandinante. De façon générale, la gêne fonctionnelle est très variable d'un individu à l'autre. Il s'agit d'une impossibilité de courir ou de sauter, d'une limitation du périmètre de

marche, d'une difficulté à monter ou descendre des escaliers, de troubles de l'équilibre, ou encore d'une impossibilité à maintenir la station debout sans appui. Dans de rares cas, le patient perd l'autonomie de la marche. Son état nécessite alors le recours à un fauteuil roulant.

Un déficit au niveau des membres supérieurs n'est observé que plus tardivement, essentiellement par l'apparition d'une difficulté manuelle pour certains gestes de la vie quotidienne. Le plus souvent les patients décrivent une fatigabilité à l'écriture. L'examen clinique révèle la présence de mains atrophiques. Les doigts sont déformés en arcade et sont difficile à étendre. L'atrophie de tous les muscles intrinsèques de la main entraîne une déformation appelée « main de singe ». Le contrôle de la force des doigts et de la main est diminué et le patient décrit une perte d'habileté. Parfois, les avant-bras sont également touchés. Les rétractions tendineuses des fléchisseurs des doigts rendent les mouvements fins difficiles et se révèlent inconfortables et handicapantes. De manière générale, le déficit moteur des membres supérieurs évolue pendant 5 à 10 ans avant d'atteindre une phase de stabilisation. Ceci reste bien sûr à nuancer tant la variabilité phénotypique de ces affections est grande.

Chez certains individus, d'autres déficits moteurs ont été notés : atteinte des muscles du dos créant une déformation en cyphoscoliose, parfois luxation rotulienne récidivante et exceptionnellement, atteinte du diaphragme (via le nerf phrénique). (46, 53, 67, 95)

b. Déficits sensitifs

Le déficit sensitif est toujours présent, d'installation généralement très lente. Il est symétrique et globalement peu invalidant. Toutefois les individus atteints se plaignent de crampes dues à la suractivité des muscles tentant de compenser leur défaillance, mais aussi de fatigue et de douleurs musculaires. L'inégale atteinte des muscles agonistes et antagonistes entraîne un dysfonctionnement articulaire également à l'origine de douleurs articulaires. Ce sont souvent les rétractions tendineuses, notamment au niveau du tendon d'Achille, qui, plus que les déformations elles-mêmes, génèrent des douleurs.

Il faut noter que l'on trouve parfois un déficit des sensibilités profonde et superficielle des quatre membres. Ce sont les troubles de la sensibilité profonde qui sont à l'origine de déficits importants de la posture et de l'équilibre. Ceux-ci s'aggravent avec l'évolution de la maladie et constituent un élément majeur de la plainte des patients. (31)

c. Autres signes cliniques

Les réflexes ostéo-tendineux sont souvent diminués voire abolis. Quatre-vingt sept pourcents des individus atteints de CMT n'ont pas de réflexe achilléen. Dans 20% des cas, la palpation des trajets nerveux permet la mise en évidence d'une hypertrophie nerveuse chez l'adulte. Celle-ci ne peut pas être retrouvée chez l'enfant. Enfin, quelques troubles végétatifs ont été rapportés, avec essentiellement des extrémités froides, voire cyanosées. Nous rappelons que des malformations peuvent apparaître. Les pieds creux en sont le plus fréquent exemple. Nous citerons aussi les fléchissements du pied. (113)

d. Variations phénotypiques en lien avec le type de CMT

Nous avons décrit précédemment les principaux symptômes des CMT. Ils concernent notamment les types 1 et 2, qui sont les plus répandus. Il faut cependant signaler que certains symptômes sont préférentiellement liés à une forme de CMT. C'est le cas de l'hypersensibilité à la pression qui est majoritairement rencontrée lors de CMT1A. Comme nous l'avons déjà expliqué, il existe une hétérogénéité des symptômes à l'intérieur d'un même type de CMT. En parallèle de cela, on peut distinguer certaines particularités liées aux formes récessives. C'est ce que nous allons décrire. Les CMT dominantes liées à l'X ont quant à elles, un phénotype dit intermédiaire, à mi-chemin entre les CMT1 et 2.

Les formes récessives de CMT, et notamment les AR-CMT2, donnent lieu à des formes plus graves de la maladie que les types démyélinisants dominants. Certains symptômes sont en outre beaucoup plus fréquents : déformations osseuses graves telles que les scolioses, ataxie proprioceptive, abolition des réflexes ostéotendineux, ou encore présence d'un déficit moteur majeur. La CMT4A est un bon exemple de forme très grave de la maladie. Après un âge d'apparition précoce, vers 2 ans en moyenne, le déficit moteur rend rapidement l'usage du fauteuil roulant indispensable, généralement à l'adolescence. Les patients souffrent de déformations orthopédiques telles que des pieds creux avec orteils en griffe, de scoliose, mais aussi d'une paralysie des cordes vocales d'apparition tardive, se traduisant par une voix rauque. La CMT4B1 quant à elle se caractérise par la fréquente présence d'une diplégie faciale associée au déficit moteur distal, qui gagne rapidement les parties proximales. Les pieds sont souvent en varus équin. Les lèvres sont souvent épaisses et proéminentes. L'évolution, nécessite l'usage du fauteuil roulant et peut conduire au décès à l'âge adulte. La neuropathie héréditaire sensitive motrice démyélinisante avec surdité de type Lom, appelée plus souvent CMT de type Lom a pour particularité clinique l'apparition progressive d'une surdité de perception. (41)

e. Évolution

Débutant généralement avant 20 ans, l'évolution est chronique, la progression lente. Elle se fait par paliers, avec parfois des périodes de stabilisation. De brusques agravations sont signalées à l'occasion d'épisodes infectieux, de traumatismes, de poussées de croissance, de prise de poids et tout particulièrement au moment de la puberté. (16, 46)

L'extrême variabilité phénotypique allie des formes très précoces, avec un retard des acquisitions motrices important et un handicap tel que le fauteuil roulant est indispensable dès l'enfance, à des formes cliniquement asymptomatiques que seul l'examen électrophysiologique peut déceler. (13)

Les formes bénignes ou peu graves sont cependant les plus fréquentes, mais il n'est pas possible de s'engager sur le pronostic individuel d'un patient. Bien qu'un antécédent familial soit retrouvé dans 60% des cas, il existe, outre la variabilité interfamiliale, une variabilité intra-familiale. Aussi, bien que les cas d'une même famille soient tous modérés, il n'y a aucune garantie qu'un nouveau membre atteint ne développe pas une forme grave de la maladie. En outre, en l'état actuel des connaissances, aucune forme génétique n'est caractéristique d'une forme clinique. D'où la difficulté du conseil génétique dans ce contexte. (113)

Il n'y a pas de réduction de l'espérance de vie, mais, dans les formes les plus graves, les complications liées à l'importance du handicap fonctionnel peuvent entraîner des décès prématurés. Il s'agit de certaines formes de CMT autosomiques récessives ou de syndrome de Déjerine-Sottas. Ce dernier est l'objet de nombreuses discussions afin de déterminer s'il s'agit d'une entité à part entière ou d'une forme de CMT. Dans ce cas, il s'apparenterait à une HSNM III selon la classification de Dyck aujourd'hui inusitée (42). Cette maladie présente un tableau clinique similaire aux CMT, mais avec un phénotype particulièrement grave. La biologie moléculaire a permis de replacer certains cas de patients supposés atteints de maladie de Déjerine-Sottas dans d'autres entités, comme les CMT1A, CMT1B ou encore CMT4A. Il est donc intéressant de conserver cette maladie pour la classification clinique des patients, bien qu'il ne soit pas démontré qu'il s'agisse d'une maladie distincte sur le plan fondamental (113).

Comme nous le montrerons dans la sous-partie 3 suivante, un phénotype peut correspondre à plusieurs génotypes. De la même façon, un génotype peut s'exprimer en différents phénotypes. C'est pourquoi, au sein d'une famille, les symptômes peuvent être différents, mais aussi d'intensité variable. De plus, il semble qu'une même mutation dans un même gène puisse s'exprimer différemment selon les individus, cautionnant ainsi l'hypothèse d'une influence environnementale. Ceci explique que les CMT ne fassent pas l'objet d'un diagnostic prénatal, à l'exception des très rares formes familiales extrêmement graves. Cela pose aussi la question du

diagnostic moléculaire lors de la phase présymptomatique de la vie des membres de familles à risque. (74)

3. La recherche génétique sur les CMT

Le plus souvent, la transmission des CMT se fait sur un mode autosomique dominant (CMT1 et CMT2), parfois sur un mode dominant lié à l'X (CMTX), et plus rarement sur un mode autosomique récessif (CMT4 et AR-CMT2). La clinique ne permet pas de différencier les différents types de CMT présentés plus tôt dans le tableau 1. C'est la biologie moléculaire qui permet d'aller plus loin dans la classification, une fois le mode de transmission et le caractère axonal ou démyélinisant déterminés.

Il faut noter une répartition géographique des formes de CMT : les formes dominantes sont plus fréquentes en Europe, tandis que les formes autosomiques récessives se retrouvent plus souvent dans les pays du Maghreb, du Proche et au Moyen Orient, régions dans lesquelles le pourcentage de mariages consanguins est également plus important. En France, les formes dominantes, autosomiques ou liées à l'X représentent 53% des familles atteintes de CMT. Les formes récessives démontrées correspondent à 4% des familles. Le reste de la population, soit 43% sont des cas isolés pour lesquels il n'a pas été possible de mettre en évidence une histoire familiale. (40)

Le tableau 2 présente les localisations génétiques qui ont été identifiées à l'heure actuelle :

Tableau 2 : Localisation des gènes impliqués lors de CMT. (41, 45, 58, 78, 82, 89, 90, 120)

CMT	Sous-type	Protéine	Gène	Localisation	Référence
CMT1	CMT1A	Peripheral myelin protein 22	PMP22	17p11.2	52, 71, 73, 79, 88
	CMT1B	Myelin protein zero	P0	1q22	37, 55, 56, 72, 79
	CMT1C	Lipopolysaccharide induced tumor necrosis alpha factor	LITAF	16p13.3-p12	77
	CMT1D	Early growth response protein 2	EGR2	10q21.1-q22.1	41
	CMT1E	Peripheral myelin protein 22	PMP22	17p11.2	52
	CMT1F	Neurofilament light polypeptide	NEFL	8p21	

CMT	Sous-type	Protéine	Gène	Localisation	Référence
CMT2	CMT2A1	Kinesin-like protein 1B β	<i>KIF1B</i>	1p36.2	119
	CMT2A2	Mitofusine 2	<i>MFN2</i>	1p36.2	77
	CMT2B1 ou AR-CMT2A	LMNA : lamin A/C	<i>LMNA</i>	1q21	15
	CMT2B	Ras-related Protein 7	<i>RAB7</i>	3q13-q22	66
	CMT2B2 ou AR-CMT2B	Mediator of RNA polymerase II transcription	<i>MED25</i>	19q13.3	14
	CMT2C			12q23-q24	104
	CMT2D	Glycyl-tRNA Synthetase	<i>GARS</i>	7p15	104
	CMT2E	Neurofilament light chain protein	<i>NEFL</i>	8p21	75, 104
	CMT2F	Heat shock protein beta 1	<i>HSPB1</i>	7q11.23	78
	CMT2G			12q12-q13.3	81
	CMT2J	Myelin protein zero	<i>P0</i>	1q22	77
	CMT2K	Ganglioside induced differentiation associated protein 1	<i>GDAP1</i>	8q13-q21.1	8, 15, 38
	CMT2L	Heat shock protein beta 8	<i>HSPB8</i>	12q24	108
CMT4	CMT4A	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	<i>GDAP1</i>	8q13-q21.1	8, 10, 11, 15, 20, 35, 38, 80
	CMT4B1	Myotubularin-related protein 2	<i>MTMR2</i>	11q22	21, 22, 104
	CMT4B2	Myotubularin-related protein 13	<i>MTMR13</i>	11p15	7, 12, 104
	CMT4C	SH3 domain and tetratricopeptide repeat domain 2	<i>SH3TC2</i>	5q32	100, 104
	CMT4C2			8q21.3	78
	CMT4D	N-myc downstream regulated gene 1 protein	<i>NDRG1</i>	8q24.3	60, 61, 104
	CMT4E	Early Growth Response Protein 2	<i>EGR2</i>	10q21.1-q22.1	41
	CMT4F	Periaxin	<i>PRX</i>	19q13.1-13.2	51
	CMT4H	FYVE, RhoGEF, and PH domain-containing protein 4	<i>FGD4</i>	12p11.2	39
	CMT4J	KIAA0274	<i>KIAA0274</i>	6q21	77

CMT	Sous-type	Protéine	Gène	Localisation	Référence
CMTX	CMTX1	Connexin 32	Cx32	Xq13.1	77
	CMTX2			Xp22.2	78
	CMTX3			Xq26	78
	CMTX5	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-1	PRPS1	Xq22-q24	78
DI-CMT	DI-CMTA			10q24.1-q25.1	78
	DI-CMTB	Dynamin 2	DNM2	19p13.2	77
	DI-CMTC	Tyrosyl-tRNA synthetase	YARS	1p35	78

Légende :

CMT : maladie de Charcot-Marie-Tooth

CMT1 : CMT démyélinisant autosomique dominant

CMT2 : CMT axonal autosomique dominant

CMT4 : CMT autosomique récessif

CMTX : CMT lié à l'X

DI-CMT : forme intermédiaire de CMT

Pour les formes de CMT dont le gène est connu, il est possible de réaliser un diagnostic moléculaire. Pour cela, on recueille du sang sur anticoagulant puis on extrait l'ADN contenu dans les leucocytes et on recherche une mutation sur l'un des gènes mis en cause lors de CMT. Le recueil du sang et l'extraction de l'ADN sont présentés dans la partie III de notre thèse. Il est apparu ces dernières années, avec l'essor de la biologie moléculaire, que non seulement un même phénotype peut correspondre à plusieurs génotypes, mais aussi qu'un même génotype peut s'exprimer sous différents phénotypes. Aujourd'hui le diagnostic d'une CMT comporte une composante moléculaire capitale. Les progrès de la biologie moléculaire ont en effet révolutionné l'approche traditionnelle de la classification des CMT. Actuellement il est possible d'effectuer un diagnostic moléculaire de la forme de CMT d'un patient dans 50% des cas rencontrés. (86)

Dans le cadre du conseil génétique, les gènes PMP22 (CMT1A), P0 (CMT1B) et Cx32 (CMTX) sont étudiés dans les cas de formes démyélinisantes, après examen électrophysiologique des membres à risque de la famille et du mode de transmission de la maladie. Ce sont les 3 gènes les plus souvent incriminés. On peut ensuite se tourner vers les autres gènes identifiés.

Les mutations des gènes présentés dans le tableau 2 entraînent des anomalies des protéines synthétisées. Le tableau 3 regroupe ces protéines par fonction.

Tableau 3 : Présentation des protéines mutées lors de maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT)

Protéine	Fonction	CMT associée
protéine 22 de la myéline périphérique ou PMP22	Composants de la myéline	CMT1A
protéine zéro ou P0		CMT1B
connexine 32		CMT2J
périaxine		CMTX1
EGR2 : <i>early growth response protein 2</i>	Facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes de la myéline	CMT1D CMT4E
chaîne légère des neurofilaments	Transport axonal	CMT2E
HSPB1 : <i>heat shock protein beta 1</i>		CMT2F
HSPB8 : <i>heat shock protein beta 8</i>		CMT2L
KIF1B β : <i>kinesin-like protein 1Bβ</i>		CMT2A
MTMR2 : <i>myotubularin-related protein 2</i>	Transport intracellulaire	CMT4B1
MTMR13 : <i>myotubularin-related protein 13</i>		CMT4B2
dynamine 2		DICMTB
Rab7 : <i>ras-related protein 7</i>		CMT2B
NDRG1 : <i>N-myc downstream regulated gene 1 protein</i>		CMT4D
LITAF : <i>lipopolysaccharide induced tumor necrosis alpha factor</i>		CMT1C
GARS : <i>glycyl-tRNA synthetase</i>		CMT2D
KIAA0274		CMT4J
FGD4 : <i>FYVE, RhoGEF, and PH domain-containing protein 4</i>		CMT4H
LMNA : <i>lamin A/C</i>		CMT2B1
PRPS1 : <i>phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-1</i>	Fonctionnement cellulaire (enzymes)	CMTX5
YARS : <i>tyrosyl-tRNA synthetase</i>		DI-CMTC
mitofusine 2	Régulation du fonctionnement mitochondrial	CMT2A
GDAP1 : <i>ganglioside induced differentiation associated protein 1</i>		CMT4A
		CMT2K

Pour les références : voir tableau 2.

On remarque que la plupart des protéines sont impliquées dans des fonctions essentielles pour les nerfs périphériques, notamment par leur rôle au sein des cellules de Schwann et dans la synthèse de la gaine de myéline. La protéine 22 de la myéline périphérique, la protéine zéro, la connexine 32 et la périaxine sont des composants de

la myéline, EGR2 en est un des régulateurs de la transcription. Toute anomalie sur les gènes mis en cause a des répercussions sur la qualité de la myéline. La chaîne légère des neurofilaments, HSPB1, HSPB8 et KIF1B β sont impliqués dans le transport axonal. Des mutations génétiques altèrent les propriétés des ces protéines et peuvent diminuer les capacités de conduction de l'influx nerveux, d'où une modification, généralement une diminution, de la vitesse de conduction. Les autres protéines interviennent au niveau cellulaire, essentiellement au niveau du cytosquelette.

La recherche sur les gènes impliqués et les protéines altérées lors de CMT permet de compléter les connaissances sur le système nerveux périphérique. Il s'agit aussi de tenter d'apporter des réponses aux familles de patients atteints qui se demandent à quoi leur maladie est due et de pouvoir proposer des tests de diagnostic. Enfin, grâce aux progrès de la thérapie conventionnelle et de la thérapie génique, chaque découverte de protéine ou de gène incriminés constitue une piste thérapeutique qui reste à explorer. (31)

4. Les traitements et essais cliniques en cours

Bien que ces dernières années de plus en plus de gènes sujets à des mutations responsables de CMT aient été découverts, les travaux concernant d'éventuels traitements n'en sont qu'aux balbutiements. A l'exception sans doute des CMT1A. (48, 98)

a. Accompagnement thérapeutique

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement étiologique des CMT. L'essentiel de la thérapeutique de ces maladies repose donc sur la symptomatologie : kinésithérapie, chirurgie orthopédique, port d'attelle, et dépend de la gravité du handicap fonctionnel et des déformations observées. Si cet aspect de la prise en charge des patients semble essentiel pour leur qualité de vie, les données scientifiques sur cet aspect de la maladie ne sont pas très nombreuses. (4, 29, 64, 114)

Tant que les muscles sont fonctionnels, la rééducation permet d'augmenter leur mobilité et augmente la force musculaire. Elle prévient ainsi la déformation des articulations, les chutes et ralentit la diminution des facultés de mouvements de la main. Une étude a montré qu'un programme d'exercice modéré, suivi pendant 12 semaines permet une augmentation de la force musculaire mais surtout une amélioration des activités quotidiennes, sans effets indésirables. Le même groupe de patients soumis à un programme d'exercice intense pendant 12 semaines souffre de surmenage, sans qu'un bénéfice supplémentaire ait pu être démontré. (64) Les

différents travaux s'accordent sur les bienfaits d'un exercice modéré, utilisant des sports qui améliorent les performances cardiovasculaires, augmentent l'efficacité musculaire et participent au contrôle du poids musculaire, comme la natation ou la marche. Il est en effet capital de travailler la marche et l'équilibre afin de maintenir un maximum d'autonomie et de prévenir les chutes. La kinésithérapie joue un rôle de prévention des déformations osseuses et des rétractions tendineuses, notamment grâce aux mobilisations passives. Les techniques de massages utilisées dans ce contexte permettent une meilleure décontraction musculaire et de lutter contre la douleur. Selon les équipes qui prennent en charge ces patients, différentes solutions peuvent être utilisées, comme les ultrasons, les lampes à infrarouges, l'électrothérapie, mais aussi la balnéothérapie.

En l'absence de traitement étiologique, les traitements préventifs et symptomatiques prennent toute leur importance. L'hygiène de vie, par le biais d'une alimentation équilibrée et d'un contrôle du poids permet de minimiser les symptômes, ou du moins de ne pas les aggraver en y ajoutant une obésité. L'efficacité des suppléments alimentaires comme les vitamines, la créatine et le coenzyme Q n'a pas été démontrée. (30) Plus que l'hygiène de vie, la rééducation et les exercices physiques modérés quotidiens améliorent le confort de vie des individus atteints de CMT.

Les patients atteints de CMT ont très souvent recours à des prothèses orthopédiques pour compenser le fléchissement du pied ou son aspect plat. Il existe en effet de nombreuses orthèses que l'on peut utiliser selon les déformations. Il est nécessaire d'ajuster régulièrement ces prothèses orthopédiques tout au long de la vie du patient. C'est seulement quand les anomalies physiques sont devenues très invalidantes que des interventions chirurgicales orthopédiques sont proposées. La chirurgie intervient dans deux situations :

- pour lutter contre les déformations articulaires. Par exemple pour corriger une griffe des orteils ou stabiliser la voûte plantaire.
- pour effectuer des transferts tendineux qui permettent de retrouver la fonction motrice.

Ces interventions chirurgicales sont effectuées par des chirurgiens orthopédistes habitués à cette maladie, au sein d'équipes pluridisciplinaires spécialisées. Contrairement aux idées reçues, l'utilisation du fauteuil roulant n'est pas très répandue dans le cas des CMT. Elle n'est envisagée que dans les formes très graves, heureusement assez rares, notamment dans les CMT-AR.

En parallèle de cette prise en charge des symptômes physiques de la maladie, il est important de ne pas négliger l'aspect psychologique. En effet, les difficultés psychologiques sont difficiles à gérer tant au niveau personnel qu'au niveau familial. C'est donc souvent la famille (parents et fratrie) qui doit faire l'objet d'un accompagnement adapté. (113)

b. Traitemet pharmacologique

S'il n'existe pas de molécule susceptible à l'heure actuelle de guérir les patients atteints de CMT ou de supprimer les symptômes de la maladie, il y a néanmoins des outils thérapeutiques pour diminuer certains aspects de cette affection.

Comme on l'a vu, les CMT entraînent des crampes et des douleurs. La douleur peut être d'origine neurologique ou articulaire. La douleur neurologique est caractérisée par la sensation de brûlure. Des médicaments sont couramment utilisés pour diminuer les douleurs ressenties par les patients. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou AINS constituent, avec le paracétamol, la première arme contre la douleur. Ils sont efficaces dans la lutte contre les crampes et pour une partie des douleurs ressenties. Pourtant, bien souvent, ils ne suffisent pas, et ce notamment dans le cas des douleurs d'origine nerveuse pour lesquelles on a recours à des molécules anti-épileptiques telles que la gabapentine ou le topiramate, voire même à des antidépresseurs tricycliques comme l'amitriptyline. Dans certains cas, des infiltrations à visée antalgique peuvent s'avérer nécessaires. (107)

Dans la lutte contre les tremblements, on utilise des β -bloquants et la primidone. Quelques mesures simples peuvent être prises pour limiter les tremblements ; il faut éviter la consommation de caféine et de nicotine, qui les augmentent, ainsi que la consommation excessive d'alcool. (107)

En 1986, une étude menée sur 20 patients atteints de CMT1 a montré qu'une supplémentation en vitamine E entraînait une amélioration des examens neuropsychologiques et neurologiques. L'effet stabilisateur des membranes de la vitamine E était supposé être à l'origine de ces résultats. Il semble pourtant que cette piste n'ait pas été poursuivie depuis. (116)

Enfin, certaines molécules ne doivent pas être administrées aux patients atteints de CMT. La liste des molécules contre-indiquées est présentée dans le tableau 4 ci-dessous. C'est le cas des médicaments à effets neurotoxiques comme la vincristine ou la cysplatine. En effet, certains patients, atteints de CMT et traités avec de la vincristine, dans le cas d'une chimiothérapie par exemple, ont développé un syndrome de Guillain-Barré ou une polyradiculonévrite inflammatoire aiguë. Ces molécules peuvent toutefois être utilisées quand le rapport bénéfice-risque se révèle en faveur. Dans ce cas, leur usage devra être raisonnable et la prescription fait l'objet d'une réunion entre les différentes spécialités médicales concernées. (116) Les observations documentées sur les effets liés à la prise de ces molécules par des patients atteints de CMT sont encore rares, ce qui explique l'absence de publications.

Tableau 4 : Liste des molécules contre-indiquées lors de CMT (113)

Molécule	Indication
adriamycine	chimiothérapie
alcool	
amiodarone	antiarythmique
chloramphénicol	antibiotique
cisplatine	chimiothérapie
dapsone	antibiotique
diphénylhydantoïne	antiépileptique
disulfirame	lutte contre la dépendance à l'alcool
éthionamide	antibiotique
glutethimide	hypnogène, parasympatholytique
hydralazine	antihypertensif, vasodilatateur
isoniazide	antibiotique
lithium	anti-allergique, chimiothérapie
métronidazole	antibiotique
misomidazole	chimiothérapie
monoxyde d'azote	anesthésie
nitrofuratoïne	antibiotique
penicillamine	antibiotique
perhexiline	anti-angineux
pyridoxine (vitamine B6)	
suramine	chimiothérapie
vitamines A, B6, D à doses importantes	
tabac	
taxol	chimiothérapie
vincristine	chimiothérapie
zoloft	chimiothérapie

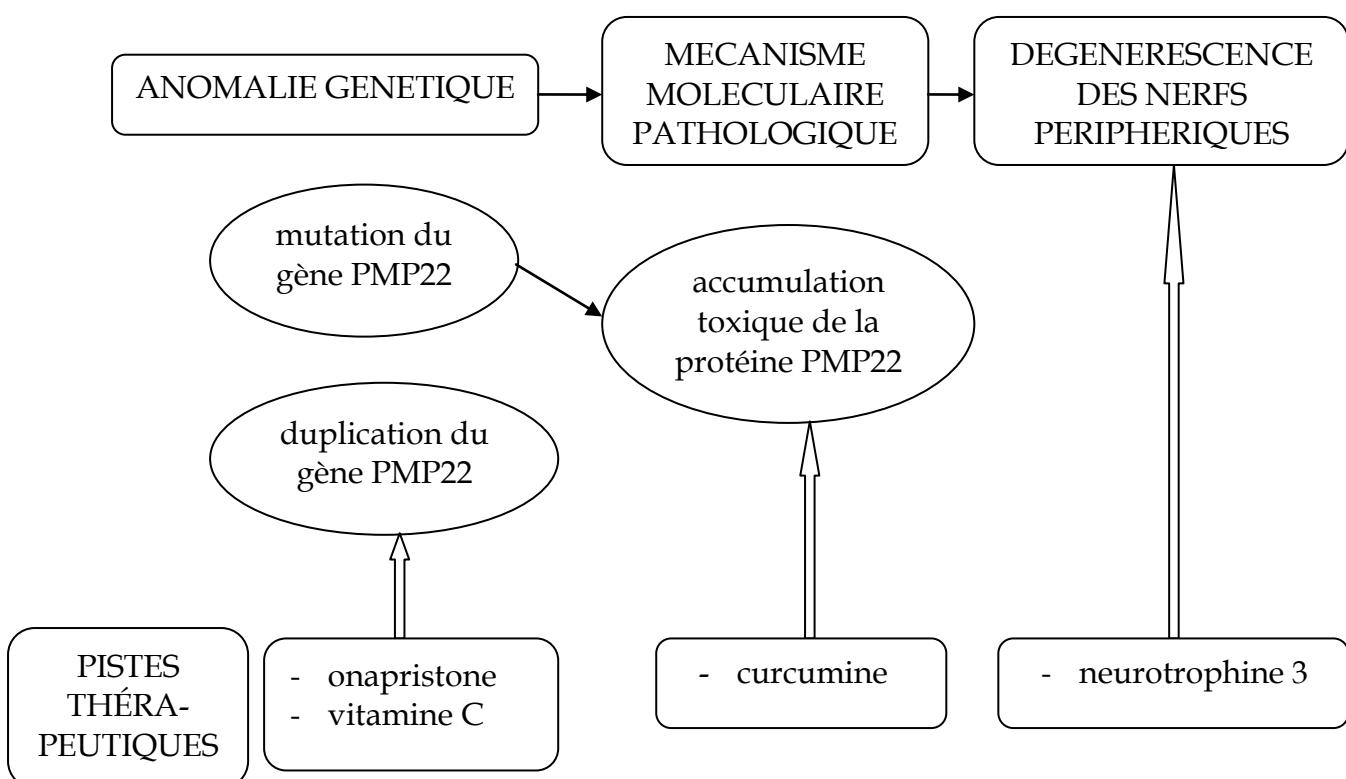
c. Essais thérapeutiques

Comme le montre la figure 2, la recherche du gène impliqué dans la CMT1A a permis d'expliquer la physiopathologie de cette forme de la maladie. Le tableau 2 présenté ci-dessus montre que la CMT1A est due à des mutations du gène *PMP22* codant la protéine de la myéline périphérique de 22 kDa. Cette protéine porte différents noms dans la littérature, tels que CD25, PASII (*PAS positive glycoprotein*, principalement utilisé pour désigner PMP22 chez le Taureau), GAS3 (*growth arrest-specific 3*, principalement utilisé chez la Souris), ou encore SR13 chez le Rat. C'est une protéine de 160 acides aminés, très hydrophobe, formée de 4 domaines transmembranaires. Elle représente 5% environ des protéines de la myéline périphérique compacte. Bien que sa fonction exacte soit encore à l'étude, la PMP22

pourrait intervenir dans le développement et la différenciation des cellules de Schwann tout en jouant un rôle structural. Elle est exprimée dans de nombreux tissus, notamment dans les motoneurones du système nerveux central. Elle est majoritaire dans les zones compactes de la myéline du nerf périphérique où elle est régulée par le contact entre l'axone et la cellule de Schwann. Il a été démontré que la forme CMT1A était liée, dans une grande partie des familles atteintes, à la duplication d'une région du chromosome 17 contenant le gène *PMP22*, ce qui entraînait la surexpression de cette protéine. Dans de plus rares cas, des mutations du gène *PMP22* provoquent l'accumulation toxique de la protéine *PMP22* anormale dans les cellules de Schwann. La surexpression ou les anomalies de la protéine *PMP22* entraînent la dégénérescence de la gaine de myéline. Ce phénomène se répercute sur les nerfs périphériques et occasionne ainsi la neuropathie. À partir de ces connaissances sur la genèse de la maladie, trois grandes pistes thérapeutiques se sont dégagées : (105)

- limiter l'expression du gène *PMP22*,
- limiter l'accumulation toxique de la protéine *PMP22* mutée au sein des cellules de Schwann,
- limiter la dégénérescence des nerfs périphériques.

Figure 2 : Physiopathologie et pistes thérapeutiques (105)



Légende :

PMP22 : *peripheral myelin protein 22*

• L'onapristone

Une étude effectuée chez le Rat a démontré que l'onapristone, un antagoniste de la progestérone, diminuait le taux de protéine PMP22 dans l'organisme. L'étude d'une lignée modèle de CMT1A surexprimant la PMP22 a montré que la progestérone augmentait le taux d'ARNm de PMP22 dans les cellules de Schwann. L'administration quotidienne de progestérone à ces rats a élevé le taux de PMP22 dans le nerf sciatique, entraînant des anomalies au niveau des cellules de Schwann, avec pour conséquence une aggravation de la neuropathie clinique. L'équipe a alors utilisé l'onapristone, qui est un antagoniste spécifique des récepteurs de la progestérone. Son administration a réduit l'expression de la protéine PMP22, augmentée par la duplication du gène PMP22. Pourtant, bien que les symptômes de CMT aient été améliorés et qu'il n'y ait pas eu d'effets secondaires chez les rats traités, cette molécule ne peut être testée chez l'Homme sans que de nombreuses objections soient soulevées. Tout d'abord, aucune étude chez l'Homme n'a montré une aggravation de la CMT lors d'une grossesse, période au cours de laquelle il y a pourtant une augmentation du taux de progestérone. D'autre part, les femmes ne sont pas atteintes par des formes plus graves que les hommes. Enfin, un traitement antagoniste des récepteurs de la progestérone pourrait causer chez l'homme comme chez la femme des effets secondaires très importants. Ceci explique que l'onapristone n'a jamais été testée chez l'Homme. (65, 101)

• La vitamine C

La vitamine C, ou acide ascorbique, a montré des résultats encourageants sur des lignées de souris modèles de CMT1A surexprimant la PMP22. Ces travaux ont montré une amélioration des fonctions motrices ainsi qu'un allongement de la durée de vie des souris après l'absorption d'une forte dose d'acide ascorbique. Il semble que la vitamine C entraînait la diminution de l'expression de la protéine PMP22 qui aurait eu pour conséquence une réparation de la gaine de myéline entourant les nerfs. (84) Des essais ont été tentés chez l'Homme, notamment en France, lors d'une étude rassemblant, entre 2005 et 2008, 180 patients atteints de CMT1A. Malheureusement, les résultats de cet essai clinique se sont révélés décevants puisqu'aucune différence significative entre le placebo, la faible (1g/jour) et la forte (3g/jour) dose de vitamine C n'a été démontrée sur les critères principaux de l'étude tels que les symptômes moteurs et sensitifs, la vitesse de conduction nerveuse, les capacités musculaires, le temps de marche ou l'échelle de qualité de vie. Toutefois, à 12 mois, il semblait que la dose de 3g/jour d'acide ascorbique améliorait les symptômes moteurs et sensitifs des malades. (77) Ces données doivent être confirmées dans les années à venir par la mise en place d'un nouvel essai thérapeutique, sur une durée minimale de 2 ans cette fois. En attendant les résultats des autres travaux de recherche sur la vitamine C, l'Agence Européenne du Médicament (EMEA) a déjà rendu, en mars 2008, un avis positif sur l'attribution du statut de médicament orphelin pour la CMT1A au traitement à base d'acide ascorbique. (1, 77) Ceci représente, pour les malades, une première reconnaissance de

la validité de l'hypothèse testée dans les nombreux travaux concernant actuellement la CMT1A et la vitamine C. Depuis ces premiers espoirs, plusieurs résultats très attendus, se sont révélés bien décevants. Une équipe australienne a publié en juin 2009 les résultats d'une étude réalisée en double aveugle sur 81 enfants âgés de 2 à 16 ans pendant un an. Aucune différence significative entre le placebo et la dose de 30mg/kg/jour de vitamine C n'a été démontrée tant sur le principal critère dévaluation qu'était la vitesse de conduction nerveuse, que sur les critères secondaires qu'étaient la force musculaire, le périmètre de marche ou encore la qualité de vie. (26) En octobre 2009 c'est l'équipe marseillaise (76) qui prouvait à son tour l'inefficacité du traitement aux doses utilisées (1 et 3g/jour) après une étude d'un an sur 179 patients atteints de CMT1A génétiquement confirmée. Enfin, l'essai néerlandais publié en novembre 2009 (112) a démontré l'inefficacité d'une dose de 2g/jour de vitamine C dans le traitement de la CMT1A. L'équipe a même été plus loin en mettant en cause la validité du modèle souris utilisé lors des études précliniques sur lequel l'acide ascorbique avait donné des résultats encourageants. En effet, le métabolisme de la vitamine C n'est pas le même chez la Souris et chez l'Homme. La vitamine C est partiellement synthétisée chez la Souris tandis qu'elle n'est apportée que par l'alimentation dans l'organisme humain. Cet aspect pose donc le problème de la posologie à tester chez l'Homme étant donné qu'une unique prise quotidienne n'aura pas les mêmes effets que chez la Souris.

• La curcumine

Une étude, publiée en 2007 a montré qu'au sein des cellules de Schwann, la curcumine diminuait le stockage de la protéine PMP22 dans le réticulum endoplasmique. Or c'est cette agrégation dans le réticulum endoplasmique qui est responsable de l'apoptose des cellules de Schwann et donc de la neuropathie. L'administration orale de curcumine a réduit les symptômes de souris *Trembler-J*, qui servent de modèle pour la CMT1A. Cette étude a permis de démontrer, dans un premier temps, que la curcumine était bien retrouvée deux heures après son administration orale dans le sang et dans le nerf sciatique, autant sur les très jeunes souris que sur les adultes, cautionnant ainsi l'hypothèse de son action au niveau local, c'est-à-dire directement sur les cellules de Schwann. Elle a montré, sous traitement, une diminution significative du nombre de cellules de Schwann entrées en apoptose, ainsi qu'une amélioration des symptômes affectant les souris, et un regain de force musculaire et une meilleure coordination motrice des animaux traités. L'analyse histologique des nerfs sciatiques des souris mutées traitées avec la curcumine s'est même révélée encourageante puisqu'une amélioration phénotypique a été constatée. Aussi cette molécule pourrait constituer un nouvel espoir thérapeutique dans les formes très graves de neuropathies périphériques, notamment lorsqu'elles sont dues à une accumulation de protéines dans le réticulum endoplasmique des cellules de Schwann. (63)

• La neurotrophine 3

La neurotrophine 3 est un facteur neurotrophique c'est-à-dire un facteur de croissance neuronale. La famille des facteurs neurotrophiques comprend le facteur de croissance nerveux ou NGF, les neurotrophines 3, 4 et 5, le facteur dérivé de l'encéphale ou BDNF et le facteur neurotrophique ciliaire ou CNTF. Ils sont essentiellement produits lors de l'embryogenèse et permettent le développement des terminaisons nerveuses. Leur production est nettement diminuée à l'âge adulte, bien qu'ils gardent un rôle important auprès des neurones et des fibres nerveuses.

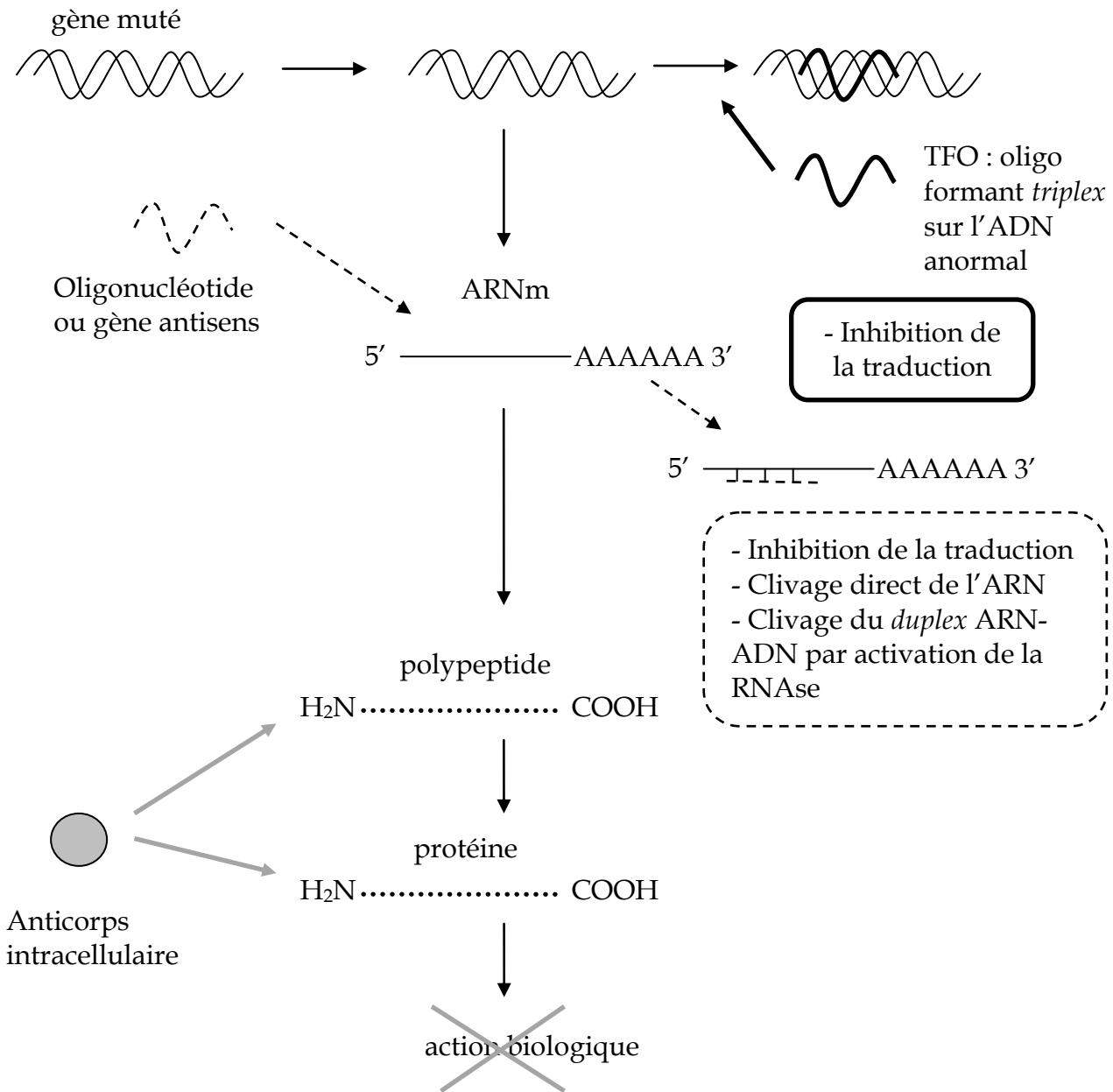
Sur des lignées de souris modélisant la CMT1A, la neurotrophine 3, administrée à raison de 150µg/g, trois fois par semaine pendant six mois, a augmenté la régénération axonale des souris malades. Chez l'Homme, une étude pilote réalisée avec seulement 8 patients a montré des résultats encourageants. Pourtant, il semble que l'utilisation de cette molécule, dont les caractéristiques pharmacologiques sont encore méconnues, ne puisse pas être réalisée à plus grande échelle pour le moment compte tenu d'effets secondaires très importants. En effet, la neurotrophine 3 semble impliquée dans des processus tumoraux, tels que le neuroblastome ou encore le cancer du sein. Sans connaître encore son rôle exact, si elle en a bien un, il est d'usage d'avancer prudemment sur cette piste de recherche (96, 99, 118).

• Thérapie génique

La thérapie génique est, du moins sur le plan conceptuel, la plus belle approche thérapeutique de ces affections qui sont dues à des mutations ou à des duplications au niveau de l'ADN des patients. La CMT1A pour laquelle les individus atteints font l'objet d'une duplication ou d'une mutation du gène PMP22 semble un excellent candidat pour la thérapie génique. En effet, une approche envisagée en thérapie génique serait l'utilisation d'un oligo-nucléotide anti-sens bloquant la copie surnuméraire ou la copie mutée du gène PMP22. Ainsi l'expression du gène serait diminuée, et peut-être les symptômes de la maladie atténuerés. Dans le cas de mutations entraînant une perte de fonction de la protéine, le même procédé pourrait être utilisé pour apporter une copie fonctionnelle du gène incriminé. Le principal obstacle à cette technique reste les conditions d'introduction de la séquence nucléotidique dans le génome des cellules nerveuses. La faisabilité technique d'un tel procédé a déjà été démontrée, mais l'introduction au moyen d'un adénovirus reste à envisager avec prudence en raison des effets secondaires possibles essentiellement dus aux réactions inflammatoires (118). L'inhibition ciblée de l'expression d'un gène surexprimant une protéine telle que la PMP22, *in vivo* est illustrée par la figure 3. Cette figure montre trois façons d'obtenir l'inhibition de l'expression d'un gène muté sans provoquer la lyse cellulaire. Il n'y a pas d'études à l'heure actuelle qui s'intéressent à cet aspect. Les travaux, tels qu'ils ont été décrits à partir de la figure 2, sont orientés sur le traitement des cellules où PMP22 est surexprimée ou sur la

modulation de son expression. Nous n'avons eu connaissance d'aucune publication sur la thérapie génique ou sur l'inhibition ciblée de l'expression de PMP22, tant sur les Souris *in vivo* que sur des cellules *in vitro*.

Figure 3 : Inhibition ciblée de l'expression d'un gène *in vivo* (3)



Légende :

Sur ce schéma, le gène muté peut être inhibé de trois façons. La première, représentée par les traits pleins noirs, consiste à utiliser un TFO (oligo formant *triplex*) qui se fixe sur l'ADN anormal et inhibe sa transcription. La deuxième consiste à utiliser un oligonucléotide ou gène antisens. Ce fragment d'ADN se fixe sur l'ARNm (ARN messager) et peut soit inhiber directement la traduction, soit induire le clivage de l'ARN, soit induire le clivage du *duplex* ARN-ADN par la RNase suite au déclenchement de la transcription de la RNase par l'oligonucléotide. La troisième

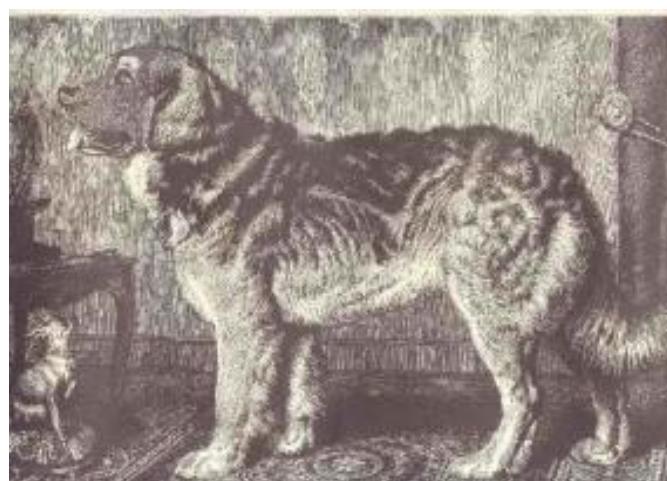
voie réside en l'apport d'un anticorps intracellulaire dirigé contre le polypeptide ou la protéine codée par le gène muté. Les trois voies aboutissent à une inhibition de l'action biologique dirigée par le gène muté.

La recherche sur les CMT a beaucoup progressé au cours des dix dernières années. Bien que le phénotype de ces maladies ait été connu depuis longtemps, ce n'est que récemment que les études ont fourni des données sur la physiopathologie et la génétique. Il reste bien sûr encore du travail avant que toutes les mutations familiales soient identifiées, mais une nouvelle étape dans la connaissance de ces affections a déjà été franchie avec les espoirs thérapeutiques que nous avons présentés. Cependant, le modèle souris, utilisé le plus souvent dans la première phase des essais thérapeutiques, commence à montrer ses limites. En effet, plusieurs molécules apportant de bons résultats chez la Souris ou le Rat se sont révélées décevantes chez l'Homme soit parce qu'elles présentent trop d'effets secondaires soit parce qu'on ne retrouvait pas les effets bénéfiques escomptés. Le recours à des modèles animaux de plus grande taille, vivant plus longtemps que les rongeurs, et dont la physiologie se rapproche de celle de l'Homme, devient nécessaire afin de poursuivre les essais thérapeutiques et de tester de nouvelles approches. Dans ce contexte, la caractérisation clinique et génétique de la polyneuropathie héréditaire du chien de race Léonberg, modèle de Charcot-Marie-Tooth, se révèle particulièrement intéressante.

DEUXIÈME PARTIE :

La polyneuropathie héréditaire du Léonberg

Figure 4 : dessin de César, Léonberg appartenant à Mr Bergmann,
par H. Leutemann (1870) (Source : <http://www.leonberg-fr.com>)



1. Les symptômes associés à la maladie

Bien que la polyneuropathie héréditaire du Léonberg n'ait été décrite que très récemment, certains éleveurs disent avoir déjà été confrontés aux premiers cas de chiens atteints dans le milieu des années 1960. Peu d'articles concernent cette maladie chez le Chien tandis que la littérature sur la maladie de Charcot-Marie-Tooth en médecine humaine s'étoffe régulièrement. De même, la Souris fait l'objet de nombreuses publications. Nous allons néanmoins nous attacher à décrire les spécificités de cette affection qui touche une race de chiens par ailleurs méconnue. (106)

Les symptômes de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg sont des symptômes non spécifiques de polyneuropathie périphérique :

- troubles moteurs,
- troubles sensitifs,
- douleur à la palpation des masses musculaires, hypersensibilité,
- auxquels s'ajoutent des troubles respiratoires en raison de l'atteinte du nerf laryngé.

La polyneuropathie est distale et symétrique. Elle entraîne une diminution voire une absence de coordination motrice, essentiellement sur les postérieurs, une faiblesse de ces membres dont les extrémités traînent et frottent sur le sol, ainsi qu'une diminution de la masse musculaire. Contrairement à la maladie de Charcot-Marie-Tooth, la polyneuropathie héréditaire entraîne des troubles respiratoires chez les Léonbergs, généralement sous la forme d'une paralysie laryngée.

Il semble qu'il puisse y avoir différents niveaux d'expression de cette maladie, avec des cas très sévères et précoces mais aussi des cas intermédiaires moins graves. L'affection atteint les nerfs périphériques qui se trouvent à l'extérieur de la boîte crânienne et du rachis. Il s'agit d'une atteinte diffuse pour laquelle des symptômes se manifestent dans l'ensemble du corps en raison des nombreux nerfs touchés.

Cette maladie apparaît parfois tardivement : entre 1 et 5 ans pour une espérance de vie des chiens de cette race de 8 ans en moyenne et se développe jusqu'au décès de l'animal 34 mois plus tard en moyenne. (33, 91, 102) Les chiens sont présentés en consultation pour une faiblesse d'apparition progressive, une ataxie ou une perte de masse musculaire. Ces troubles locomoteurs sont dus à l'amyotrophie d'intensité croissante qui touche préférentiellement les membres postérieurs et de façon distale. Ils sont parfois associés à des troubles de la proprioception. D'autre part, les troubles respiratoires observés sont principalement de la dyspnée, un essoufflement à l'effort et une paralysie laryngée. Dans ce dernier cas, la laryngoplastie par latéralisation des cartilages arytenoïdes peut permettre une

amélioration de l'état de l'animal, mais surtout cette chirurgie a l'avantage de lui apporter un confort non négligeable.

Des vétérinaires, généticiens et membres de clubs nationaux de Léonbergs véhiculent les informations par le biais des sites internet. Voici dans le tableau 5 certaines questions que doivent se poser, selon eux, les propriétaires de Léonbergs quand ils perçoivent un changement de leur animal et s'interrogent sur la polyneuropathie ou la paralysie laryngée. À ces questions nous avons fait correspondre les symptômes recherchés ainsi que les grandes affections auxquelles le vétérinaire se devra de se soucier avant d'évoquer une polyneuropathie, en raison de leur fréquence. (93)

Tableau 5 : Questionnement du propriétaire et symptômes associés (93)

Question à se poser	Symptôme ou maladie sous-jacente
Est-ce que mon chien se fatigue vite après un petit effort physique ?	intolérance à l'effort : maladie cardiaque, respiratoire, articulaire, obésité... à écarter
Est-ce que son aboiement s'est modifié au fil du temps ? Le son est t'il plus enroué, voilé ou atténué ?	affections du larynx transitoires (laryngite, angine) ou de longue durée (parésie, paralysie laryngée)
Est-ce qu'il halète plus qu'avant, surtout après une émotion ou s'il fait chaud ?	dyspnée : maladies cardiaques ou respiratoires, obésité... à écarter
Est-ce que sa respiration est devenue plus bruyante, au point que nous devions parler plus fort si quelqu'un doit nous comprendre ?	paralysie laryngée
Est-ce qu'il tousse après avoir mangé ou bu ?	fausse déglutition : méga œsophage paralysie laryngée
Est t'il parfois maladroit, est-ce qu'il trébuche sur ses propres pieds ?	ataxie
Est-ce qu'en marchant il lève la patte arrière haut, comme si il marchait dans l'herbe haute ?	hypermétrie

2. L'examen neurologique

Évidemment, un examen neurologique est indispensable pour caractériser cette affection. Il précède les prélèvements biopsiques de muscles (muscle tibial crânial) et de nerfs (nerf fibulaire) et l'électrodiagnostic. Cet examen, associé à un examen clinique général complet de l'animal oriente le praticien vers l'hypothèse diagnostique de polyneuropathie.

Il succède au recueil des commémoratifs et de l'anamnèse de l'animal. Cette étape donne un aperçu de la vitesse et des circonstances d'apparition, puis d'évolution de la maladie. Elle recense les affections antérieures de l'animal, qu'il faudra parfois classer comme des signes précurseurs de la maladie ou des affections clairement distinctes. L'appétit, la soif, les mictions et défécations sont des informations importantes à ne pas négliger pour exclure d'autres affections (obésité, hypothyroïdie, diabète, incontinence) au même titre que les traumatismes, l'exposition possible à des toxiques et les phénomènes néoplasiques. L'âge d'apparition des premiers symptômes est considéré comme une information primordiale lors de suspicion de polyneuropathie chez un Léonberg.

L'examen neurologique débute par un examen visuel à distance de l'animal :

- niveau de vigilance,
- comportement,
- posture,
- démarche,
- parésie,

et par l'observation de ses réactions posturales :

- proprioception,
- brouette,
- sautillage,
- hémilocomotion,
- placé visuel,
- placé tactile,
- tonus cervical,
- redressement et
- extension posturale.

Il se poursuit avec l'exploration de :

- la proprioception consciente,
- des réflexes spinaux,
- du tonus et de la masse musculaire,
- et de la sensibilité par le biais de quatre points : hyperesthésie, toucher, réflexe cutané et douleur.

Il s'achève avec l'évaluation du système nerveux crânien.

A l'occasion de cet examen, la perte partielle (parésie) ou totale (paralysie) d'une fonction motrice est confirmée par le clinicien. Ce déficit se traduit par une faiblesse locomotrice, une fatigabilité accrue, une amyotrophie rapide et importante, et une hypotonie. L'ataxie peut être mise en évidence par une démarche plus ou moins déséquilibrée, ébrieuse, avec «fauchage » ou chute quand l'animal change de direction. Certains degrés d'hypermétrie ou de dysmétrie sont aussi possibles. Ces signes s'intensifient lorsque l'animal se déplace sur une surface glissante ou lorsqu'il recule ou tourne.

Le signe clinique d'appel d'une polyneuropathie est la mise en évidence d'une lésion de type « motoneurone périphérique » ou MNP. C'est-à-dire une lésion des centres médullaires ou des nerfs périphériques, qui dans le cas de la polyneuropathie, atteint exclusivement les nerfs périphériques, et qui se traduit cliniquement par une diminution ou une absence de réflexes tendineux et /ou de flexion. En général, les membres pelviens sont atteints plus précocement et plus gravement que les membres thoraciques, en raison de la longueur importante des nerfs des membres pelviens. L'évolution est le plus souvent insidieuse et chronique. L'atteinte motrice progresse avec le développement d'une tétraparésie et d'une tétraplégie à terme.

Les nerfs crâniens sont peu fréquemment affectés à l'exception des nerfs : facial (VII) pour lequel on observe rarement une parésie ; vague (X) pour lequel on observe occasionnellement une dénervation des muscles de l'œsophage avec une dysphagie et un méga œsophage, et dont l'un des rameaux : le nerf laryngé récurrent gauche qui est quant à lui fréquemment touché. Ce sont des atteintes de ce nerf laryngé récurrent gauche qui provoquent les importants troubles respiratoires (dyspnée d'origine laryngée) ou les modifications de la voix (dysphonie ou perte d'aboiement) qui signent la parésie ou paralysie laryngée.

C'est à l'issue de l'examen neurologique de l'animal que le praticien est amené à différencier une neuropathie d'une myopathie, comme le montre le tableau 6. (115)

Tableau 6 : Différences entre neuropathie et myopathie (115)

	Neuropathie	Myopathie
Parésie	Oui	Oui
Ataxie	Oui (déficit proprioceptif)	Non
Nociception	Peut être perdue dans les neuropathies sensorielles	Normale
Voix	Souvent altérée ou perdue	Normale
Masse musculaire	Atrophie (sauf maladies démyélinisantes)	Atrophie fréquente, parfois hypertrophie
Tonus musculaire	Réduit	Peu réduit
Réflexes	Réduits à absents	Parfois réduits
Douleur musculaire	Aucune	Variable
Système nerveux autonome	Atteint	Normal

Cependant, il n'est pas toujours évident, à ce stade de la consultation, d'établir le diagnostic. Il faut souvent prendre du recul par rapport aux symptômes que présente l'animal et explorer d'autres hypothèses que la seule neuropathie.

3. Diagnostic différentiel

Face aux symptômes variés de la polyneuropathie, nous avons choisi de présenter un diagnostic différentiel à partir du symptôme le plus généraliste à savoir la faiblesse musculaire. Ceci permet de ne pas omettre de possibilités et parmi les étiologies variées on retrouve toutes les affections appartenant au diagnostic différentiel de l'ataxie, de l'hypermétrie et des autres symptômes moteurs de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg. Voici la liste des affections auxquelles un praticien confronté à un chien atteint de faiblesse musculaire devra penser lors de l'élaboration de son diagnostic :

- affections sanguines : anémies, parasites sanguins,
- affections cardio-vasculaires,
- affections respiratoires,

- troubles électrolytiques : hypokaliémie, hyperkaliémie, hyponatrémie, hypernatrémie, hypocalcémie, hypercalcémie,
- affections hormonales : hypothyroïdie, diabète, hypocorticisme, hypercorticisme,
- insuffisance organique : rénale, hépatique,
- néoplasie : insulinome, myélome multiple...
- hyperthermie, inflammation (polyradiculonévrite), infection chronique,
- botulisme,
- affections ostéo-articulaires,
- affections nerveuses centrales (encéphale et moelle),
- affections neuromusculaires : nerf, muscle, plaque motrice.

Il semblerait bien que l'ensemble de la médecine vétérinaire figure dans ce diagnostic différentiel tant le symptôme est vague. Mais sur des chiens adultes, qui ont encore de belles années à vivre, il est important de ne pas restreindre volontairement les possibilités. L'interrogatoire du propriétaire se chargera de réduire la liste des hypothèses dans un premier temps. Et dans un second temps, ce sont les examens complémentaires que nous allons décrire qui orienteront le vétérinaire dans son diagnostic.

4. Les moyens d'exploration

On rappelle que la polyneuropathie est le terme utilisé pour une maladie atteignant plusieurs nerfs, ce qui explique que les nerfs soient au centre des méthodes de diagnostic et d'exploration dans cette affection. Mais avant de procéder à une exploration neuromusculaire complète, on veille à éliminer toutes les hypothèses les plus courantes du diagnostic différentiel présenté ci-dessus. Pour cela, certaines analyses sanguines sont nécessaires :

- T4,
- test de stimulation TSH,
- cholestérol,
- glycémie,
- fructosamines,
- insulinémie,
- protéinémie,
- numération et formule sanguine,

- biochimie notamment hépatique et rénale.

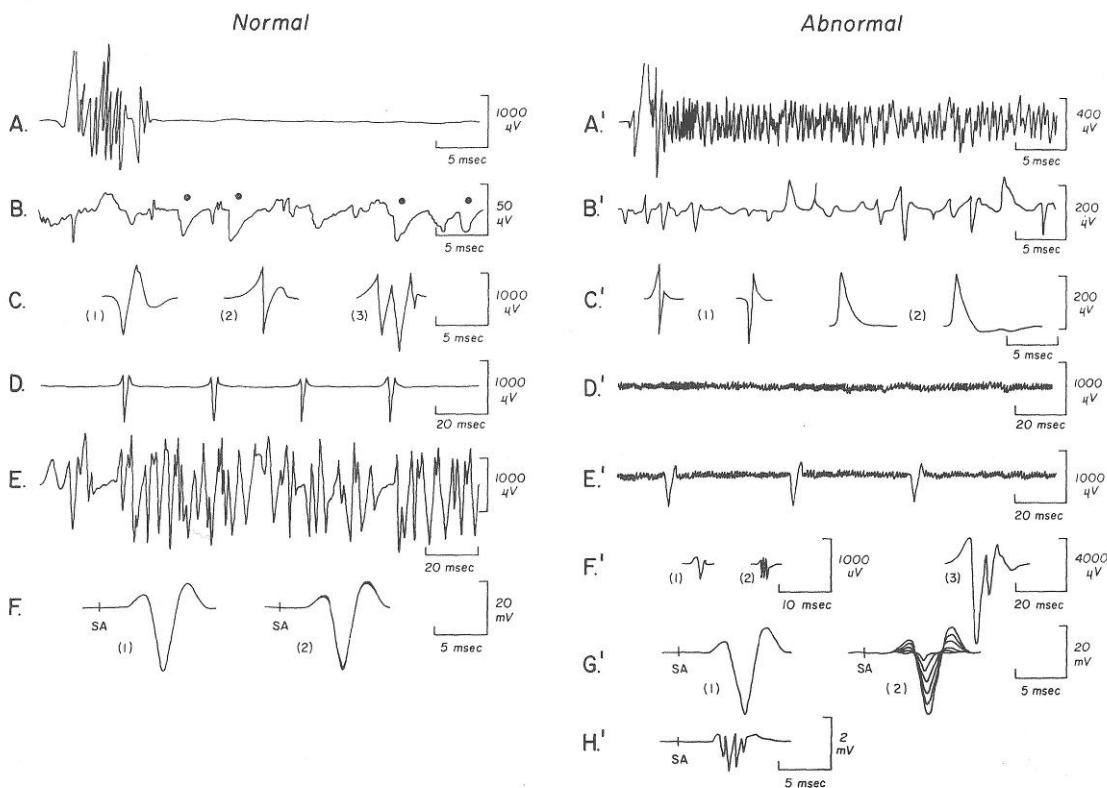
On peut les compléter par des sérologies notamment pour les facteurs antinucléaires (recherche de lupus érythémateux systémique), et par des examens d'imagerie médicale : radiographies thoraciques et échographies abdominales pour explorer l'hypothèse d'un processus néoplasique. (34)

C'est l'examen clinique, associé à l'examen neurologique de l'animal qui peut amener à différencier une neuropathie d'une myopathie, comme l'a montré le tableau 6 présenté ci-dessus. (115)

L'exploration fonctionnelle de l'activité neuromusculaire se fait par le biais de l'électromyographie et de l'électronurographie. L'électromyographie est une technique d'exploration de l'activité électrique musculaire qui se pratique sous anesthésie générale. On supprime ainsi toute stimulation externe (activité spontanée) due à un stimulus douloureux ou à la patience limitée de l'animal. (47) Il y a encore quelques années, la prémedication était obtenue avec de l'acépromazine (VETRANQUIL ND ou CALMIVET ND) à 0.1mg/kg, l'induction de l'anesthésie était effectuée avec du thiopental sodique (NESDONAL ND) à 20mg/kg ou du pentobarbital (PENTOBARBITAL ND) à 30mg/kg, puis avec un relai en anesthésie gazeuse utilisait l'halothane. (50) Le site d'introduction des électrodes était rasé puis nettoyé avec de la chlorhexidine ou de la povidone iodée (VETEDINE ND), puis l'électrode aiguille était insérée dans le corps charnu du muscle à étudier, ici le muscle tibial crânial en 5 à 10 points différents. Aujourd'hui, les anesthésistes préfèrent une prémedication à l'aide du diazépam (VALIUM ND), puis une induction à l'aide d'un mélange de thiopental sodique et propofol. L'examen est ensuite réalisé sous anesthésie gazeuse avec de l'isoflurane. Les sites d'introduction des électrodes ne sont, en outre, plus rasés.

L'électromyographie peut révéler des potentiels de fibrillation dans les neuropathies axonales. Dans ce cas, l'activité est prolongée après l'insertion de l'électrode dans le muscle. La présence d'activités spontanées lors d'un électromyogramme ou EMG signent la présence d'une lésion du muscle ou du nerf périphérique qui l'innervent, mais cela ne permet pas de caractériser l'affection. Des décharges répétitives complexes s'observent dans les neuropathies chroniques, mais aussi dans les myopathies, comme on le voit dans le tableau 6. Le potentiel de fibrillation et les ondes positives lentes indiquent des lésions de dénervation. Il arrive en outre que l'EMG soit négatif malgré la présence d'une affection neuromusculaire. (18, 47) Pour caractériser l'affection, il faut pousser plus loin les investigations et utiliser notamment l'électronurogramme afin d'étudier les vitesses de conduction musculaire et nerveuse. La figure 5 montre les tracés obtenus lors de l'examen électromyographique d'un individu sain et de patients atteints de différentes affections nerveuses.

Figure 5 : Différents types de tracés rencontrés lors d'un examen électromyographique (24, 91)



Légende :

L'activité normale est représentée sur les tracés de la colonne de gauche :

A : potentiel d'insertion suivis de silence électrique

B : potentiel de plaque

C : potentiels d'unité motrices (1) région de plaque, (2) région éloignée d'une plaque, (3) potentiel polyphasique

D : décharges répétitives

E : décharge de haute fréquence sur plusieurs unités motrices lors d'effort volontaire

F : potentiels évoqués

L'activité anormale est représentée sur les tracés de la colonne de droite :

A' : activité prolongée après insertion

B' : activité de dénervation

C' : (1) potentiels de fibrillation, (2) onde positive lente avec et sans phase terminale négative

D' : activité de dénervation

E' : décharge répétitive et activité de dénervation sur un muscle partiellement dénervé

F' : (1) et (2) potentiels d'unités motrices lors de réinnervation, (3) potentiel d'unité géante

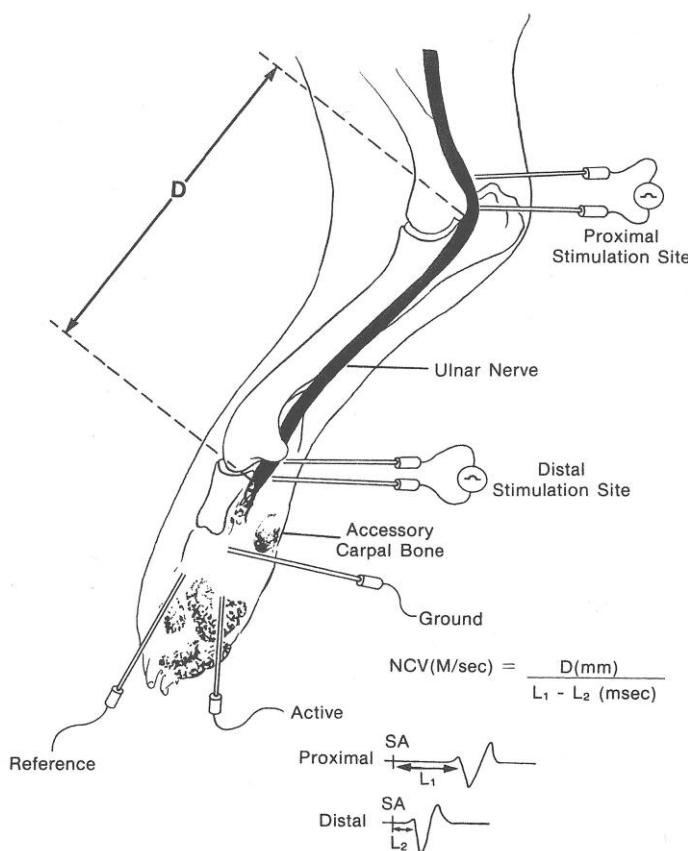
G' : potentiels évoqués lors de myasthénia gravis (2)

H' : potentiel évoqué polyphasique, polyradiculonévrite.

Les tracés B', C' (1) et (2), D' et E' sont des exemples de ce que l'on peut rencontrer sur un Léonberg atteint de polyneuropathie héréditaire.

L'électroneurographie est une technique d'exploration de l'activité électrique du nerf : la stimulation du nerf provoque l'apparition d'un potentiel puis, lorsqu'il s'agit d'un nerf moteur, d'un potentiel musculaire. Le dispositif est illustré par la figure 6. En pratique, l'électroneurographie débouche surtout sur la mesure des vitesses de conduction nerveuse. L'étude de la transmission neuromusculaire est réalisée par la stimulation répétitive d'un nerf moteur. Cet examen détermine si c'est l'axone ou la gaine de myéline qui est en cause.

Figure 6 : Schéma de la technique de détermination de la vitesse de conduction motrice du nerf ulnaire (24)



Légende :

La vitesse de conduction nerveuse, notée NCV sur ce dessin est calculée selon la formule indiquée.

D est la distance en mm entre le site de stimulation distal et le site de stimulation proximal.

L₁ est la durée entre la stimulation et le début du potentiel d'action déterminée à partir du tracé effectué lors de la stimulation sur le site proximal.

L₂ est la durée entre la stimulation et le début du potentiel d'action déterminée à partir du tracé effectué lors de la stimulation sur le site distal.

L'électrodiagnostic est utilisé pour dépister ou confirmer une affection neuromusculaire, avec pour objectif de différentier si l'origine est nerveuse, musculaire ou au niveau de la jonction neuromusculaire. Il localise la lésion nerveuse : atteinte proximale ou distale et en précise la gravité. Il distingue une atteinte nerveuse motrice d'une atteinte sensitive et caractérise la nature de lésion : dégénérescence axonale ou démyélinisation. Il permet la détermination de l'étendue des anomalies : membres antérieurs, postérieurs, larynx, sphincter anal, face. (47)

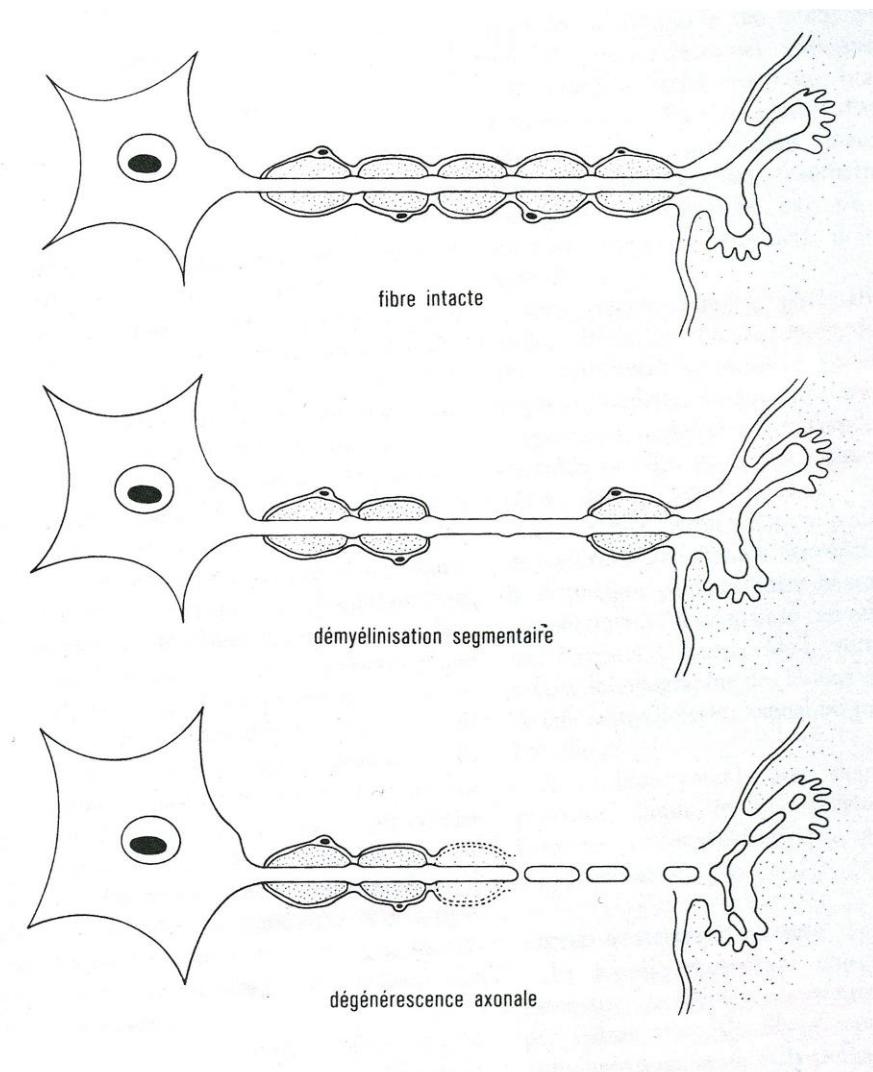
En pratique, une électromyographie est prescrite en cas de suspicion de polyneuropathie héréditaire chez un Léonberg pour distinguer la neuropathie d'une myopathie si ce n'est pas possible cliniquement et pour caractériser la polyneuropathie périphérique. Elle met habituellement en évidence des lésions de dénervation musculaires caractéristiques de la perte d'unités motrices, donc de fibres nerveuses. Le tableau 7 montre comment l'électrodiagnostic permet de différencier myopathie, myotonie, myasthénie et neuropathie. (19)

Tableau 7 : Électrodiagnostic des affections neuromusculaires (19)

		Myopathie	Myotonie	Myasthénie	Neuropathie
Activité spontanée	Potentiel de fibrillation	++	0	0	+++
	Ondes positives lentes	++	0	0	+++
	Décharge complexe répétitive	+++	0	0	++
	Salves myotoniques	0	+++	0	0
Potentiel d'action musculaire	Conduction	normale	normale	normale	ralentie
	Amplitude	réduite	normale	normale	réduite
	Décrément	0/+	0	++	0/+

Dans le cadre de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg, on observe l'association de deux lésions nerveuses élémentaires : une dégénérescence axonale et une démyélinisation segmentaire. Ces deux lésions élémentaires sont illustrées par la figure 7.

Figure 7 : Lésions nerveuses élémentaires : dégénérescence axonale et démyélinisation segmentaire (18)



Sous l'unique aspect de dégénérescence axonale, il existe plusieurs types processus, tels que la dégénérescence Wallérienne ou la dégénérescence axonale rétrograde. La dégénérescence Wallérienne est due à la dégénérescence de l'élément distal de l'axone, suite à sa section, ou à son altération, quelques heures après la lésion. C'est la plus fréquente des dégénérescences axonales. La dégénérescence axonale rétrograde, aussi appelée *Dying back* est secondaire à un dysfonctionnement du corps cellulaire nerveux ou de l'axone lui-même. Elle débute distalement et progresse de façon centripète et rétrograde vers le corps cellulaire. D'autres lésions axonales se présentent sous la forme de dégénérescence axonale : l'atrophie axonale, les lésions dystrophiques dues à l'accumulation d'éléments du cytosquelette, comme les microtubules ou les neurofilaments, les axones géants et les inclusions anormales.

Les maladies affectant la production de l'enveloppe de myéline ou les cellules de Schwann, entraînent une perte de l'épaisseur de la couche de myéline entourant les axones ; ces derniers restant intacts. La perte de myéline est habituellement

segmentaire et débute au niveau d'un nœud de Ranvier. Elle peut atteindre l'internœud en entier ou seulement la région qui l'entoure. Le plus souvent, ce processus est aléatoire, affectant quelques cellules de Schwann et en épargnant d'autres. Une seule fibre nerveuse peut parfois être atteinte en de nombreux endroits. Cette lésion évolue en dévoilant de plus en plus de longueur d'axone. L'axone démyélinisé perd alors sa conduction saltatoire et la vitesse de conduction nerveuse chute. La démyélinisation sur plus d'un espace internodal entraîne un arrêt de la conduction nerveuse.

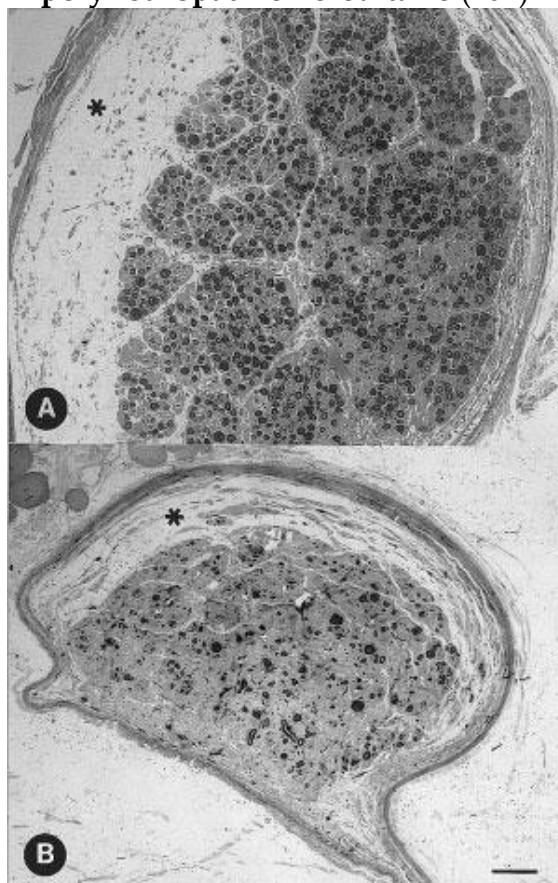
Les principales modifications de l'électromyogramme et de la vitesse de conduction sont décrites dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 : Principales modifications de l'électromyogramme et de la vitesse de conduction pour des lésions nerveuses élémentaires (91)

	Dégénérescence axonale	Demyélinisation secondaire
Potentiels d'action musculaire à l'EMG	<ul style="list-style-type: none"> - plus la perte d'unités motrices est importante, plus l'amplitude des potentiels évoqués musculaires est réduite - proportionnellement à la perte des fibres sensitives, l'amplitude des potentiels évoqués sensitifs est réduite - potentiels d'action évoqués moteurs polyphasiques - décrément possible 	<ul style="list-style-type: none"> - dispersion temporelle des réponses évoquées motrices et sensitives - bloc
Activité spontanée à l'EMG	<ul style="list-style-type: none"> - activités à l'insertion de l'électrode aiguille - potentiels de fibrillation au repos - ondes positives lentes - décharges complexes répétitives 	<ul style="list-style-type: none"> - absence de fibrillation au repos
Caractéristiques des vitesses de conduction	<ul style="list-style-type: none"> - vitesses de conduction nerveuse motrice et sensitive normales ou peu réduites, proportionnellement au degré de dénervation et de la perte en fibres nerveuses de gros calibre 	<ul style="list-style-type: none"> - vitesses de conduction nerveuse très ralenties - latences distales allongées

Enfin, des biopsies de muscles (muscle tibial crânial) et de nerfs (nerf fibulaire) constituent les examens complémentaires spécifiques des neuropathies périphériques. La biopsie musculaire du muscle tibial crânial, après cryofixation et marquage histoenzymologique montre une atrophie des fibres correspondant au nerf dénervé et le regroupement topographique des fibres résultant de la compensation par les axones encore fonctionnels. Elle permet de confirmer l'atteinte nerveuse périphérique. La figure 8 montre des photographies de biopsies de nerf fibulaire effectuées sur des Léonbergs atteints de polyneuropathie héréditaire, peu (chien A) ou très (chien B) grave. On visualise la perte des fibres myélinisées, les deux photographies ayant été effectuées avec la même échelle, ainsi que l'œdème qui s'est installé à la périphérie du neurone.

Figure 8 : Photographie de biopsies du nerf fibulaire sur des Léonbergs atteints de polyneuropathie héréditaire (102)



Légende :

Le chien A est un Léonberg dont les symptômes de polyneuropathie héréditaire sont peu sévères. On remarque sur sa biopsie une réduction modérée des fibres nerveuses myélinisées et un œdème à la périphérie du neurone, signalé par l'astérisque.

Le chien B est un Léonberg atteint d'une neuropathie chronique. On visualise sur cette image la perte des fibres nerveuses myélinisées, une fibrose endoneurale et un œdème. Les deux photographies sont à la même échelle : le repère correspond à 250 µm.

Les modifications de l'EMG montrent l'axonopathie, tandis que la diminution de la vitesse de conduction est le signe principal d'une affection de la couche de myéline. Électromyographie, électroneurographie et biopsies nerveuses et musculaires sont réalisées au cours de la même anesthésie générale. Tous ces examens permettent de caractériser la polyneuropathie qui affecte les Léonbergs de manière héréditaire : il s'agit d'une dégénérescence axonale à prédominance distale et rétrograde, accompagnée d'une démyélinisation secondaire. (91)

5. Étiologie

Bien que les symptômes des polyneuropathies ne soient pas spécifiques d'une affection donnée, il existe de nombreuses causes connues à l'atteinte nerveuse, qu'elle soit dégénérative ou inflammatoire. Le tableau 9 présente les causes possibles d'une polyneuropathie chez le Chien. (57)

Tableau 9 : Étiologie d'une polyneuropathie chez le Chien (57)

Dégénérative	Congénitale	Polyneuropathies héréditaires	Axonopathies Demyélinisation Neuropathies lysosomiales
		Maladies de surcharge	Céroïde lipofuscinose Fucosidose Glycogénose Gangliosidose Leucodystrophie à cellules globoïdes
	Acquise	Métabolique	Hypothyroïdie Diabète sucré
		Toxiques/ Médicaments	Vincristine, vinblastine, cisplatine Organophosphorés, carbamates, lindane Métaux lourds Plantes, mycotoxines
		Paranéoplasique	Insulinome Adénocarcinome Mélanome Mastocytome Ostéosarcome Lymphome Myélome multiple
		Parasitaire	Néosporose Toxoplasmose Borréliose
Inflammatoire		A médiation immunitaire	Lupus érythémateux systémique Polyradiculonévrite Polynévrite Paranéoplasie

Les polyneuropathies héréditaires sont très nombreuses dans l'espèce canine. Le taux élevé de consanguinité dans certaines races fait d'autant plus ressortir ce type d'affections. Il ne faut néanmoins pas oublier d'exclure les autres causes de polyneuropathies qui, pour certaines d'entre elles, ont un traitement spécifique. (57)

6. Pronostic et traitement

En raison essentiellement de la gravité des symptômes, les animaux ont une espérance de vie moyenne de 34 mois après l'apparition des premiers symptômes. La faiblesse générale, l'intolérance à l'effort, l'ataxie des membres postérieurs, la dyspnée, la tétraparésie ou tétraplégie progressive entraînent le plus souvent une euthanasie de l'animal quand les propriétaires ne supportent plus de le voir diminuer de jour en jour. Le pronostic est en effet très mauvais. L'état de l'animal peut parfois se stabiliser pendant quelques mois mais ne s'améliore pas. Au contraire, la détérioration de ses facultés locomotrices est inexorable.

Généralement, les animaux malades ne se reproduisent pas, bien que cela soit possible. En effet, les premiers symptômes apparaissent entre 1 et 5 ans. Or l'âge moyen de la première mise à la reproduction dans la race Léonberg est de 3 ans. La plupart des animaux développent des symptômes à ce moment-là et les éleveurs les écartent de la reproduction. (25) C'est la production d'animaux malades par des parents cliniquement sains qui a suggéré une maladie héréditaire récessive.

La polyneuropathie du Léonberg est une affection héréditaire qui évolue inexorablement. À ce jour, il n'existe aucun traitement qui permettrait de freiner si ce n'est stopper la progression de la maladie. Seule la chirurgie de la parésie ou paralysie laryngée est utilisée pour améliorer le confort de vie de l'animal lors de déficits respiratoires.

D'autre part la mise en place d'une physiothérapie ou rééducation physique permet de limiter l'amyotrophie en faisant travailler l'animal sur des exercices fréquents et d'intensité modérée. Pour les animaux qui ne peuvent plus se déplacer, le nursing est le seul moyen d'accompagnement. Il faut changer régulièrement l'animal de décubitus afin d'éviter les escarres, mobiliser les membres pour retarder l'amyotrophie et envisager une oxygénotherapie et une alimentation entérale assistée en cas de besoin. Il faut néanmoins garder à l'esprit qu'il ne s'agit que de mesures palliatives. (91)

7. Intérêt de l'étude de cette maladie

L'intérêt premier de l'étude génétique d'une maladie chez le Chien réside bien sûr dans la progression de la connaissance de ces maladies dans cette espèce. Il s'agit de comprendre le mode de transmission de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg et sa physiopathologie. Cela passe par l'étape de localisation du gène responsable de cette affection. Le but est de compléter la carte génétique de l'espèce canine et de pouvoir proposer, à terme, un test génétique de diagnostic et de dépistage pour cette affection. Pour être utile, ce test de dépistage doit pouvoir

déTECTer les individus homozygotes mutés et sains et les individus hétérozygotes afin de permettre la diminution de la fréquence des chiens atteints au sein de la race.

Si nous avons choisi cette maladie pour notre étude, c'est qu'elle présente un autre intérêt. En effet, la polyneuropathie héréditaire du Léonberg pourrait constituer un modèle pour une maladie génétique humaine : le syndrome de Charcot-Marie-Tooth. Cet ensemble de maladies dont les symptômes sont similaires, que nous avons présenté dans la première partie de cette thèse, regroupe des neuropathies périphériques héréditaires. Il existe des similitudes entre les anomalies observées sur les Léonbergs atteints de polyneuropathie héréditaire et les patients humains atteints de maladies de Charcot-Marie-Tooth, tant sur le plan clinique qu'électrophysiologique.

Le Chien est un excellent outil dans la progression de la connaissance des maladies humaines complexes. D'une part par le spectre de maladies que cette espèce partage avec l'Homme et d'une part par la prolificité de ces animaux. Ce dernier aspect est toutefois à nuancer dans le cas des Léonbergs puisque leur prolificité est moindre que la moyenne des races de chiens. Plusieurs études ont déjà démontré que des maladies similaires dans deux espèces peuvent être dues à des mutations dans des gènes homologues d'une espèce à l'autre. C'est sur cette hypothèse que sont fondés des protocoles de recherche de modèles animaux, que ce soit avec la Souris ou avec le Chien comme ici.

Le Chien présente un avantage certain par rapport à la Souris : son génome diverge moins de celui de l'Homme. En effet, la divergence nucléotidique moyenne entre le Chien et l'Homme est de 0,35 substitutions par site quand elle est de 0,51 entre la Souris et l'Homme. Enfin, le Chien possède à peu près le même nombre de gènes que l'Homme dont la plupart sont des orthologues. Les gènes orthologues sont des paires de gènes qui, bien qu'appartenant à deux espèces différentes, proviennent d'un même gène ancestral. (70) Le Chien présente en outre l'avantage indiscutable qu'il fait partie des modèles expérimentaux de grande taille. La physiologie de l'espèce canine est très proche de celle de l'Homme. Mais au sein des modèles de Mammifères communément utilisés, la taille même des organes peut s'avérer importante, notamment lorsqu'il s'agit de maladies neuronales. En effet, les nerfs les plus longs de la Souris ne mesureront guère plus de quelques dizaines de millimètres, tandis que chez le Chien, ils peuvent atteindre facilement plusieurs dizaines de centimètres, dépassant même le mètre selon les races et les nerfs mesurés. Plus qu'un intérêt anecdotique, cette caractéristique rapproche le modèle utilisé de l'Homme. Les effets d'une molécule sont potentiellement plus facilement visualisables, avec des mesures plus fiables. À ces nombreux avantages, il faut ajouter que la longévité du Chien est plus importante que celle du Rat ou de la Souris, ce qui autorise des études de toxicité à plus long terme. Il apparaît donc que le Chien constitue un modèle idéal de transition entre les petits animaux de laboratoire tels que la Souris ou le Rat et les patients humains visés par la recherche.

Le tableau 10 ci-dessous présente les chromosomes canins orthologues des régions dans lesquelles on trouve les gènes à l'origine de CMT chez l'Homme. Parfois, il existe un gène orthologue dont la séquence est presque identique dans les deux espèces. Le principe consiste à rechercher la mutation responsable de la maladie sur le modèle animal, puis à transposer cette donnée dans l'espèce humaine quand cela est possible. (70, 83)

Tableau 10 : Correspondance entre les gènes responsables de CMT chez l'Homme et les gènes orthologues canins (45, 78, 82)

CMT	Sous-type	Gène	Localisation	Gène orthologue chez le Chien	Chromosome syntétique chez le Chien
CMT1	CMT1A	<i>PMP22</i>	17p11.2	ENSCAFG00000017913	5
	CMT1B	<i>P0</i>	1q22	ENSCAFG00000012964	38
	CMT1C	<i>LITAF</i>	16p13.3-p12	ENSCAFG00000018907	6
	CMT1D	<i>EGR2</i>	10q21.1-q22.1	ENSCAFG00000013049	4
	CMT1E	<i>PMP22</i>	17p11.2	ENSCAFG00000017913	5
	CMT1F	<i>NEFL</i>	8p21	ENSCAFG00000009014	25
CMT2	CMT2A1	<i>KIF1B</i>	1p36.2	ENSCAFG00000019785	5
	CMT2A2	<i>MFN2</i>	1p36.2	ENSCAFG00000016472	2
	CMT2B1 ou AR-CMT2A	<i>LMNA</i>	1q21	ENSCAFG00000016863	7
	CMT2B	<i>RAB7</i>	3q13-q22	ENSCAFG00000004157	20
	CMT2B2 ou AR-CMT2B	<i>MED25</i>	19q13.3	ENSCAFG00000003398	1
	CMT2C		12q23-q24		15 ; 26
	CMT2D	<i>GARS</i>	7p15	ENSCAFG00000003086	14
	CMT2E	<i>NEFL</i>	8p21	ENSCAFG00000009014	25
	CMT2F	<i>HSPB1</i>	7q11.23	ENSCAFG00000013544	6
	CMT2G		12q12-q13.3		27
	CMT2J	<i>P0</i>	1q22	ENSCAFG00000012964	38
	CMT2K	<i>GDAP1</i>	8q13-q21.1	ENSCAFG00000008178	29
	CMT2L	<i>HSPB8</i>	12q24	ENSCAFG00000009959	26

CMT	Sous-type	Gène	Localisation	Gène orthologue chez le Chien	Chromosome syntétique chez le Chien
CMT4	CMT4A	<i>GDAP1</i>	8q13-q21.1	ENSCAFG00000008178	29
	CMT4B1	<i>MTMR2</i>	11q22	ENSCAFG00000004092	21
	CMT4B2	<i>MTMR13</i>	11p15	ENSCAFG00000007500	21
	CMT4C	<i>SH3TC2</i>	5q32	ENSCAFG00000018334	4
	CMT4C2		8q21.3		
	CMT4D	<i>NDRG1</i>	8q24.3	ENSCAFG0000001141	13
	CMT4E	<i>EGR2</i>	10q21.1-q22.1	ENSCAFG00000013049	4
	CMT4F	<i>PRX</i>	19q13.1-13.2	ENSCAFG00000005350	1
	CMT4H	<i>FGD4</i>	12p11.2		27
	CMT4J	<i>KIAA0274</i>	6q21	ENSCAFG00000003842	12
CMTX	CMTX1	<i>Cx32</i>	Xq13.1	ENSCAFG00000017023	X
	CMTX2		Xp22.2		X
	CMTX3		Xq26		X
	CMTX5	<i>PRPS1</i>	Xq22-q24		
DI-CMT	DI-CMTA		10q24.1-q25.1		28
	DI-CMTB	<i>DNM2</i>	19p13.2	ENSCAFG00000017651	20
	DI-CMTC	<i>YARS</i>	1p35	ENSCAFG00000010481	2

La recherche génétique sur le syndrome de Charcot-Marie-Tooth et celle sur la polyneuropathie héréditaire du Léonberg avancent donc en parallèle dans l'espoir qu'elles se croisent ou se complètent. Le fruit de cette comparaison ne peut que servir la compréhension de ces deux affections, toutes deux complexes.

Un autre intérêt de l'étude génétique de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg réside dans la compréhension de la physiopathologie de ce type de maladies. Ceci permet le développement de nouvelles pistes thérapeutiques. En effet, la découverte d'une mutation sur un gène occasionne une recherche de la protéine codée. Cette protéine peut se révéler une cible d'agents pharmacologiques connus, si c'est un récepteur par exemple. La recherche peut aussi s'orienter vers les moyens de lutte contre les effets de la présence d'une protéine altérée dans les cellules. Enfin, cela peut générer un travail sur les gènes modulateurs du gène muté, afin de modifier l'expression de la mutation. (102)

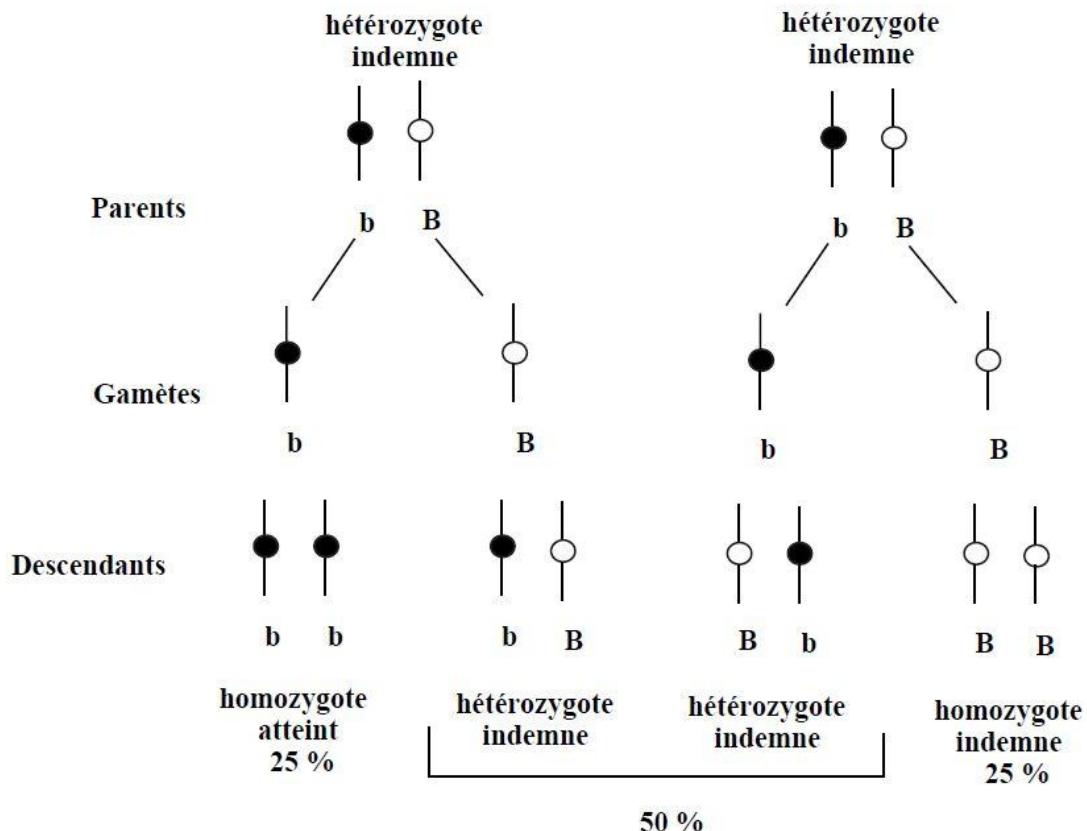
8. Recherche génétique appliquée à la polyneuropathie héréditaire du Léonberg

Pour exploiter le modèle génétique du Chien dans la recherche de gènes, il est nécessaire de pouvoir se repérer dans le génome canin, en disposant de cartes du génome. Pour être efficaces, celles-ci doivent être denses en marqueurs régulièrement espacés et couvrant l'ensemble du génome.

a. Le mode de transmission

Dans certaines études portant sur le mode de transmission de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg, seuls les mâles semblaient touchés, ce qui sous-entendait une transmission liée au chromosome X. Pourtant il est apparu dans des études plus récentes que des femelles étaient aussi touchées. Une thèse de doctorat vétérinaire soutenue à l'ENVA en 2006 a démontré que le mode de transmission était de type autosomique récessif chez les Léonbergs français (91). Dans ce cas, le gène incriminé dans la polyneuropathie héréditaire du Léonberg serait situé sur l'une des 38 paires de chromosomes autosomes canins. Les chiens affectés sont homozygotes pour l'allèle muté, c'est-à-dire qu'ils possèdent les 2 copies du gène sous leur forme mutée. Leurs deux parents sont cliniquement sains mais génétiquement porteurs de la mutation ; ils sont hétérozygotes pour l'allèle muté. Ils peuvent engendrer des individus malades, qu'ils soient mâles ou femelles. La maladie donne parfois l'illusion d'avoir disparu, mais elle se révèle lorsque deux individus porteurs hétérozygotes produisent des animaux atteints. Deux individus hétérozygotes produisent statistiquement : 25% d'individus homozygotes atteints, 50% d'individus hétérozygotes porteurs sains, et 25% d'individus homozygotes sains. Le sexe des chiots n'intervient pas dans cette répartition. (91, 103) La figure 9 illustre, dans le cas d'un mode de transmission autosomique récessif, cette répartition en fonction du génotype des parents, des gamètes disponibles et des accouplements. On obtient, à partir de deux parents hétérozygotes sains, 50% d'homozygotes et 50% d'hétérozygotes. Parmi les 50% d'homozygotes, la moitié des individus sont sains, l'autre moitié atteints, ce qui donne 50% d'hétérozygotes, 25% d'homozygotes sains et 25% d'homozygotes atteints. Dans le cas d'un gène à transmission autosomique récessive, les 50% d'hétérozygotes sont phénotypiquement sains (2).

Figure 9 : Schéma de l'hérédité autosomique récessive (2)



Légende :

b, signalé en noir est l'allèle morbide.

B, signalé en blanc est l'allèle sain.

Chaque parent donne l'un de ses gamètes (b ou B) à chacun de ses enfants. Seuls les descendants ayant reçu deux fois l'allèle b sont atteints. Ils sont homozygotes. Ceux qui ont reçu deux fois l'allèle B sont homozygotes sains.

Les descendants hétérozygotes ont reçu un allèle b et un allèle B. Ils sont phénotypiquement indemnes car ici le gène *I* se transmet selon un mode récessif. Comme l'origine de l'allèle b (paternelle ou maternelle) n'a pas d'incidence sur le génotype ou le phénotype dans ce cas, on peut regrouper tous les individus hétérozygotes b/B et B/b. Ils forment donc 50% des descendants, contre 25% pour chaque type d'homozygotes (sains et atteints)

b. Les marqueurs génétiques

Un marqueur génétique est une séquence nucléotidique dérivant d'un site chromosomique unique, connu de manière absolue ou par rapport à d'autres locus. Il est utilisé pour la cartographie génétique. Nous nous intéresserons qu'aux marqueurs polymorphes, donnant lieu aux cartographies génétique ou de liaison.

À un locus donné, le marqueur génétique présente plusieurs formes appelées allèles. C'est ce polymorphisme qui permet au marqueur d'être utilisé dans l'élaboration des cartes génétiques. En effet, la variabilité des allèles reflète la variabilité interindividuelle. Un marqueur est en fait toute différence entre deux génomes, détectable génotypiquement ou phénotypiquement et permettant d'étudier la transmission d'un caractère. C'est ainsi qu'il permet d'identifier l'origine d'un chromosome : paternelle ou maternelle.

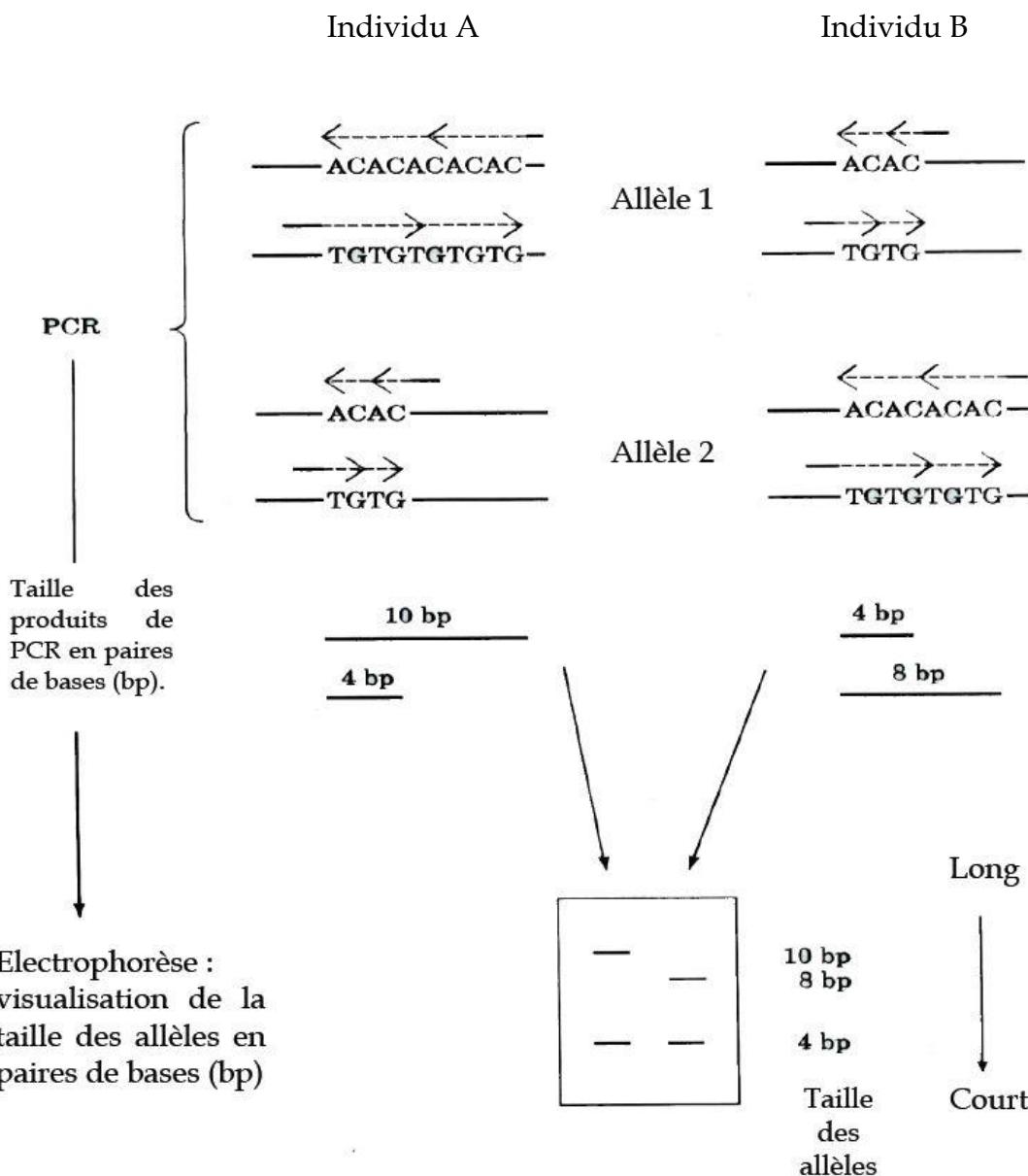
Il existe plusieurs types de marqueurs polymorphes : les *Restriction Fragment Length Polymorphism*, les minisatellites, les microsatellites et les SNP (2, 3, 36, 54, 62). Nous nous intéresserons qu'aux marqueurs microsatellites et aux SNP, qui sont les deux seules catégories de marqueurs à être utilisés actuellement chez le Chien.

- **Les microsatellites**

Un microsatellite est un segment d'ADN contenant des répétitions en tandem de motifs courts di, tri ou tétra nucléotidiques. Si la fonction des microsatellites *in vivo* est inconnue, ils sont aujourd'hui utilisés pour la cartographie de liaison, la cartographie physique et la cartographie intégrée. En effet, ils sont très polymorphes, très nombreux et régulièrement répartis dans l'ensemble du génome des Mammifères.

Les régions du génome de part et d'autre d'un microsatellite sont spécifiques. Cela permet l'amplification de la séquence par *Polymerase Chain Reaction* (PCR). L'analyse des produits de PCR permet l'identification des différents allèles du microsatellite en fonction du nombre de répétitions en tandem. On peut donc faire un classement de ces produits par taille. (62) La figure 10 montre le principe d'utilisation des microsatellites dans le cas d'un croisement de deux individus hétérozygotes sains pour un gène qui se transmet selon un mode autosomique récessif.

Figure 10 : Principe d'utilisation des microsatellites (2)



Légende :

La partie haute du schéma représente le génome des deux individus A et B dans la zone d'intérêt. Le microsatellite est ici une répétition AC.

L'individu A possède un allèle 1 à 5 répétitions et un allèle 2 à 2 répétitions.

L'individu B possède un allèle 1 à 2 répétitions et un allèle 2 à 4 répétitions.

Une PCR (*polymerase chain reaction*, voir après) permet d'amplifier sélectivement le locus répété et une électrophorèse dans un gel d'agarose (voir après) permet de visualiser la taille des allèles de chaque individu.

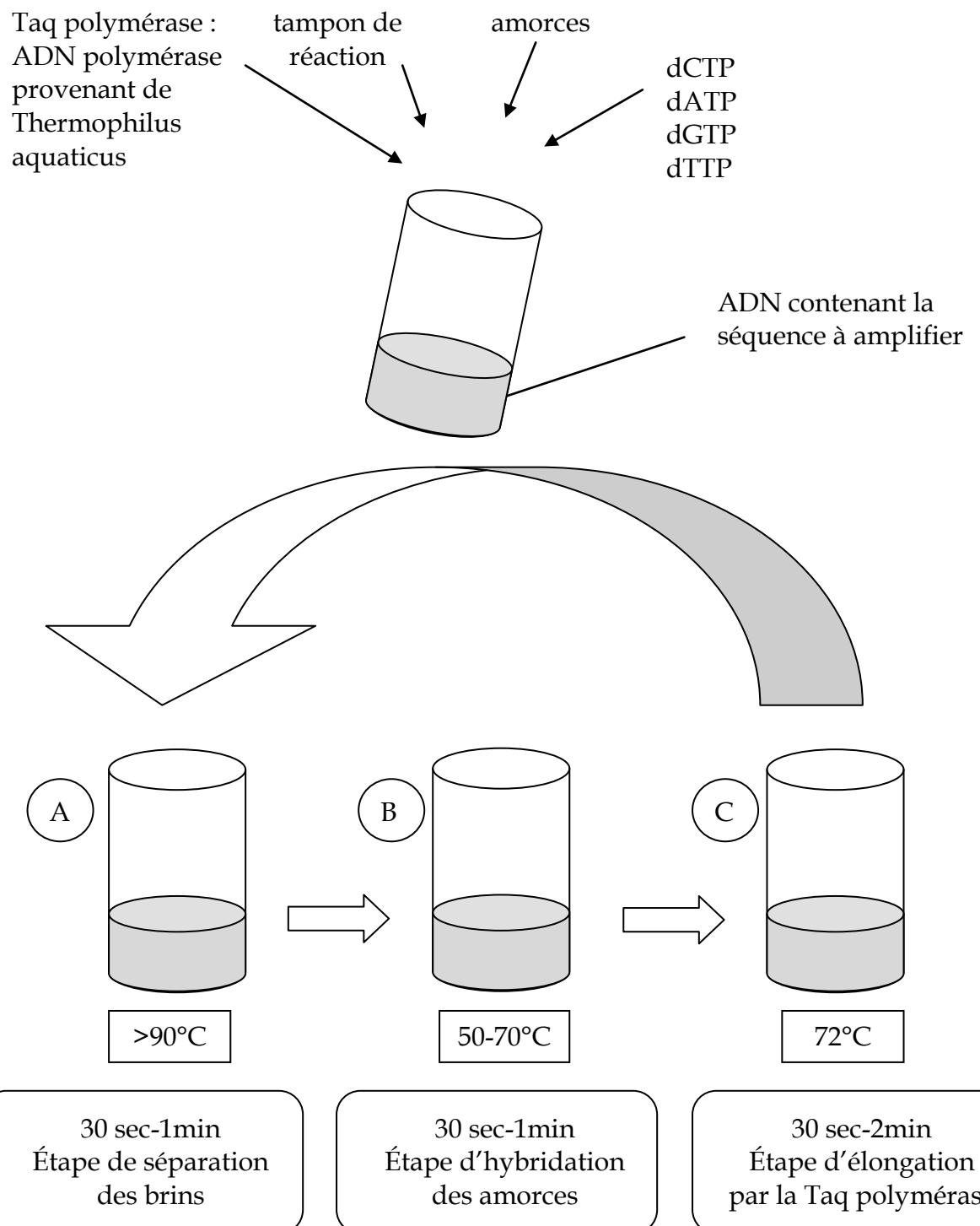
- **Les Single Nucleotide Polymorphism (SNP)**

Un SNP est une mutation ponctuelle isolée, c'est-à-dire que seule une base est différente, en un seul locus. Il s'agit donc d'un polymorphisme nucléotidique. Le SNP correspond à une variation stable de la séquence génomique portant sur une base, toutes les 100 à 300 bases environ. Les SNP sont une nouvelle génération de marqueurs qui n'ont en général pas d'implications fonctionnelles, mais ils définissent un locus unique dans le génome et ils sont polymorphes. Les SNP situés dans les régions codantes et dans les régions régulatrices des gènes sont utilisés pour construire la cartographie des maladies multifactorielles qui consiste en l'étude d'association des gènes candidats impliqués dans ces maladies. Ces SNP ont tendance à remplacer les microsatellites dans l'élaboration des cartes. Actuellement, ce sont les outils privilégiés dans l'exploration du génome canin. (87, 92)

- c. **La Polymerase Chain Reaction (PCR)**

La technique de PCR a été découverte en 1983 et mise au point en 1985 par K. Mullis. Elle utilise les ADN polymérasées qui ont la particularité de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'une séquence qu'à partir d'une amorce. La technique de PCR consiste à enchaîner plusieurs cycles. Chaque cycle est composé de trois étapes décrites sur les figures 11 et 12. Le nombre de copies d'ADN double à chaque cycle. Il s'agit en fait d'une technique d'amplification *in vitro*, permise par l'utilisation de Taq polymérasées, qui sont des enzymes thermostables (62).

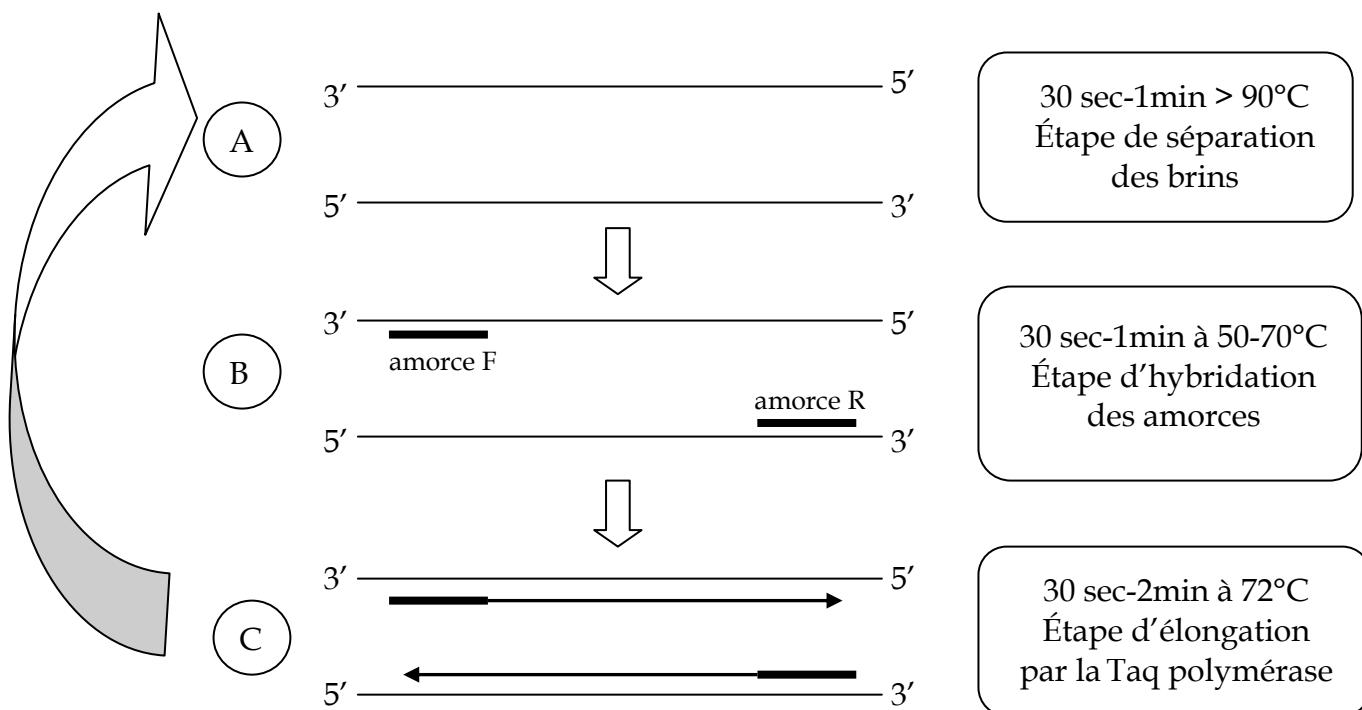
Figure 11 : Le principe de la PCR (2, 62)



Légende :

La PCR permet la multiplication exponentielle d'une séquence d'ADN déterminée par les amorces. En phase A, l'augmentation de la température permet la séparation des brins d'ADN. Les amorces s'hybrident lors de la phase B. Au cours de la phase C a lieu l'elongation par la Taq polymérase, qui permet d'obtenir deux molécules d'ADN double brin qui vont subir un nouveau cycle. Une trentaine de cycles environ s'enchaînent.

Figure 12 : Les étapes de la PCR au niveau moléculaire (2, 62)

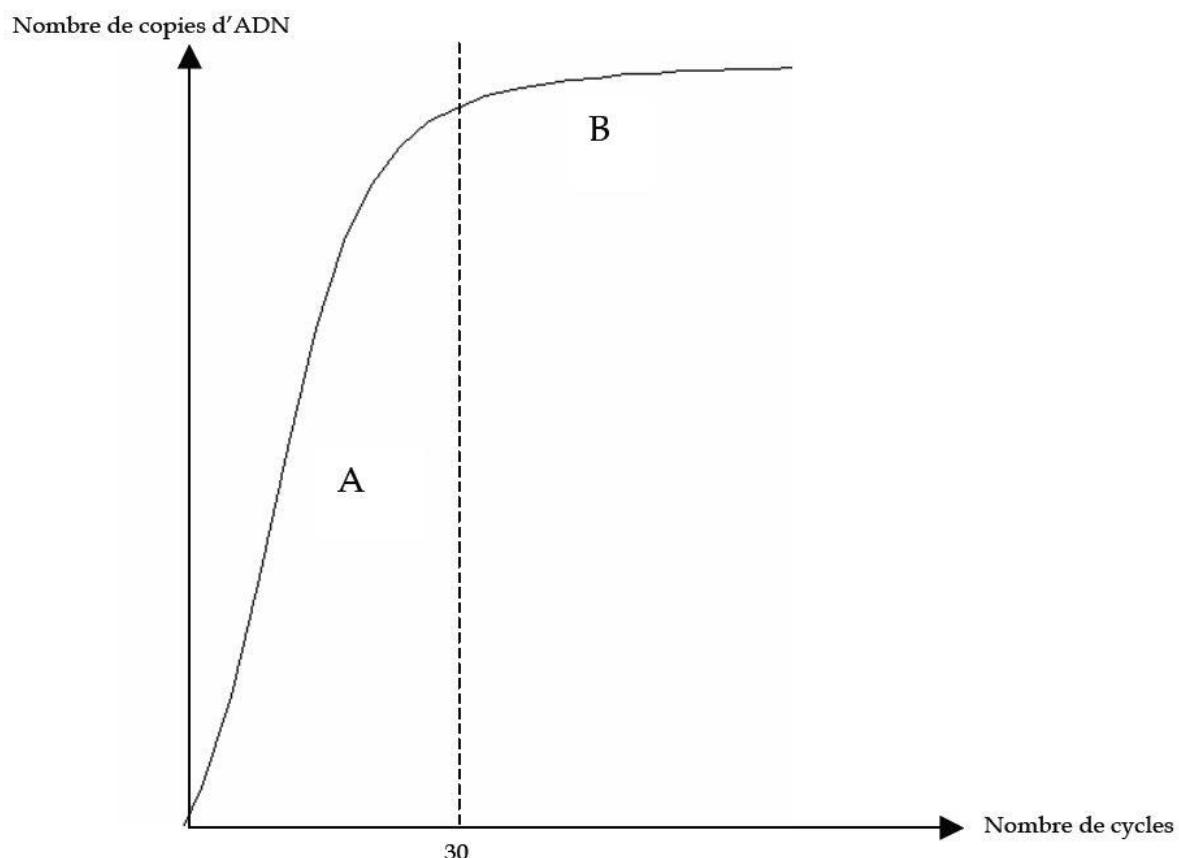


Légende :

La PCR permet la multiplication exponentielle d'une séquence d'ADN déterminée par les amores. En phase A, l'augmentation de la température permet la séparation des brins d'ADN. Les amores F et R s'hybrident lors de la phase B, respectivement en 3' et en 5'. Au cours de la phase C a lieu l'elongation par la Taq polymérase, qui permet d'obtenir deux molécules d'ADN double brin qui vont subir un nouveau cycle. Une trentaine de cycles environ s'enchaînent.

L'objectif de la PCR est de multiplier de façon exponentielle une séquence d'ADN choisie. En effet, chaque cycle permet de doubler la quantité de séquence synthétisée. Cette séquence est déterminée par le choix des amores utilisées. En phase de séparation des brins d'ADN, appelée phase A sur les figures 11 et 12, la température du bain-marie à sec augmente jusqu'à une température supérieure à 90°C, le plus souvent 94°C. C'est l'augmentation de la température qui est à l'origine de la séparation des brins d'ADN. On parle aussi de dénaturation de l'ADN. La température de la phase d'hybridation des amores, ou phase B, dépend des amores utilisées. En général elle est comprise entre 50 et 70°C. Les amores sont les éléments essentiels de la PCR car ce sont elles qui déterminent le fragment d'ADN qui va être amplifié. Une amore est une molécule d'ADN simple brin de 20 nucléotides environ qui encadre le morceau d'ADN que l'on souhaite amplifier. La phase C de la PCR correspond à l'elongation par la Taq polymérase. C'est cette étape, qui se déroule en général à 72°C qui permet d'obtenir deux molécules d'ADN double brin qui vont subir un nouveau cycle. La PCR est composée de 30 à 35 cycles environ. Il n'est pas utile d'augmenter davantage le nombre de cycles car au-delà d'une trentaine de cycles, le nombre de copies n'augmente plus, comme le montre la figure 13.

Figure 13 : Relation entre le nombre de copies de séquence d'ADN obtenues et le nombre de cycles de PCR (62)



Légende :

Le nombre de cycles est en abscisse.

Le nombre de copies d'ADN est en ordonnée.

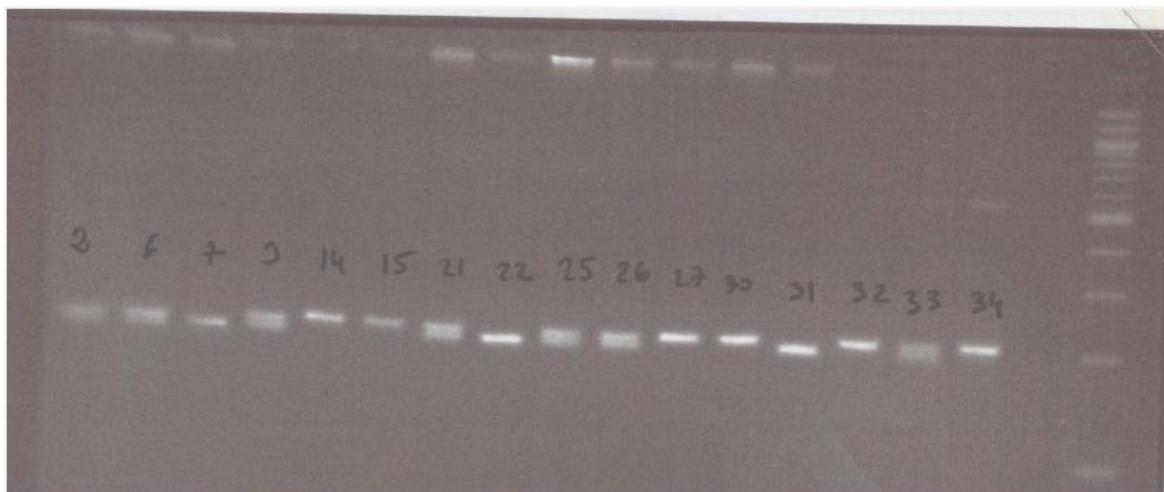
La partie A de la courbe représente la zone de la cinétique exponentielle et mesurable sans biais.

La partie B de la courbe désigne le plateau.

Quelles que soient les quantités de réactifs utilisés, le plateau est atteint pour 30 à 35 cycles environ.

Pour visualiser les produits de PCR, on utilise généralement une électrophorèse en gel d'agarose. Les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille, par l'action d'un champ électrique. Un agent intercalant, le bromure d'éthidium (BET), est utilisé pour visualiser les différents fragments d'ADN sous lumière ultraviolette. On peut alors photographier le résultat, comme le montre la figure 14 sur laquelle figure une photographie du gel d'agarose obtenu pour le marqueur REN65A09. On peut aussi utiliser d'autres systèmes de visualisation des produits de PCR, comme l'utilisation d'amorces fluorescentes, ou de nucléotides fluorescents, permettant de détecter des pics de fluorescence à l'aide du laser d'un séquenceur automatique (62), comme le montre la figure 15.

Figure 14 : Photographie du gel d'agarose de contrôle de PCR obtenu pour le marqueur REN65A09
(Source : UMR955 Génétique, ENVA)



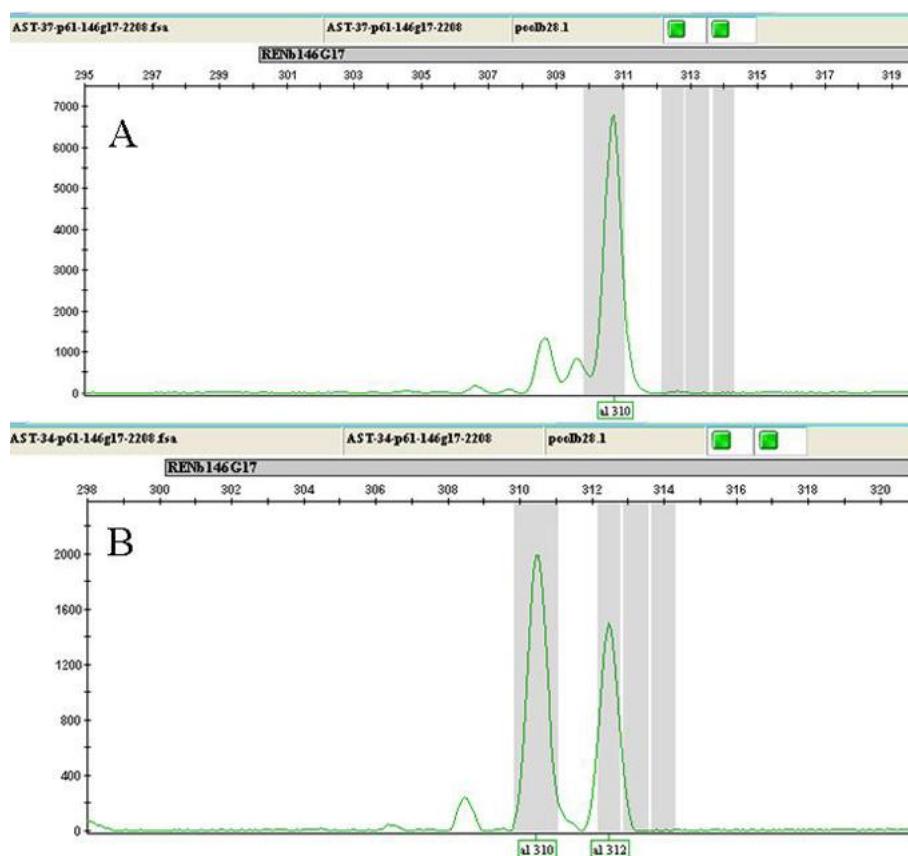
Légende :

Les numéros indiqués au-dessus des bandes correspondent aux Léonbergs soumis à la PCR pour le marqueur REN65A09.

Sur le côté droit, on voit le marqueur de taille, qui permet d'estimer la taille des amplicons.

Sur cette photographie, on remarque aisément que les chiens 2, 6, 9, 21, 25, 26 et 33 sont hétérozygotes pour le marqueur REN65A09.

Figure 15 : Pics de fluorescence obtenus pour le marqueur REN146G17
 (Source : UMR955 Génétique, ENVA)



Légende :

Le chien A est homozygote pour le marqueur REN146G17. Le graphique montre un unique pic de fluorescence à 310.

Le chien B est hétérozygote pour ce marqueur. Le graphique montre deux pics de fluorescence à 310 et 312.

La PCR est utilisée pour détecter toutes sortes de mutations ponctuelles, délétions, insertions. Son utilisation est freinée par deux limites. La première est due au manque de fidélité des Taq polymérasées conventionnelles. Pour y remédier, on peut utiliser une Taq polymérase de haute fidélité. L'autre limite vient des multiples sources possibles de contaminations de l'ADN à amplifier. Pour diminuer l'impact de ces contaminations, il est important de manipuler dans de bonnes conditions et de limiter au maximum les possibilités de transfert d'ADN en suspension dans l'air ou transmis par le manipulateur. (2, 5, 36, 62)

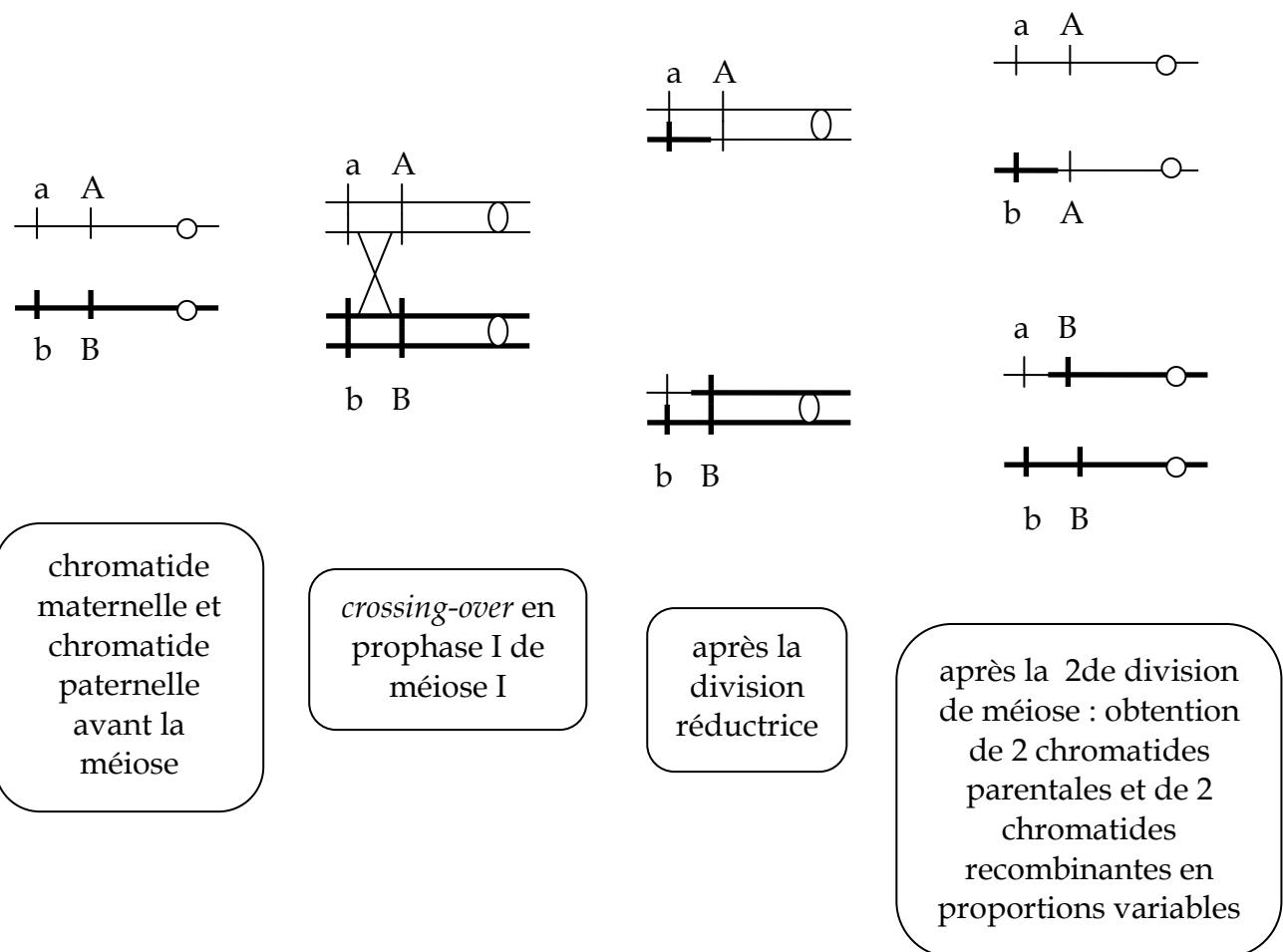
Pour notre étude, la PCR fut utilisée pour génotyper des chiens à l'aide de marqueurs microsatellites. Le locus de chaque marqueur est amplifié de façon spécifique, grâce à un couple d'amorces dont l'une est fluorescente. Les produits de PCR sont alors visualisés sur un séquenceur.

d. Les cartes génétiques

• Les cartes génétiques ou de liaison

La localisation des marqueurs génétiques d'une espèce les uns par rapport aux autres permet d'établir une carte génétique ou carte de liaison. Pour cela on utilise la capacité des marqueurs à se réassocier à la suite du brassage des chromosomes (*crossing-over*) qui se produit pendant la méiose. Ce phénomène est représenté sur la figure 16. La cartographie génétique est basée sur le principe que deux marqueurs situés sur le même chromosome maintiennent d'autant plus fréquemment leur association après la méiose que la distance physique les séparant est faible. Ainsi la distance génétique sur une carte de liaison est déterminée par la fréquence des *crossing-over*. Plus les locus sont proches, plus les chances de recombinaisons méiotiques sont faibles, et inversement : plus les locus sont éloignés et plus les chances de *crossing-over* sont élevées. Lorsque les deux locus sont proches, les locus sont dits liés. Comme on le visualise sur la figure 16, plus deux locus sont proches, moins il y a de chance qu'un *crossing-over* se produise et plus le nombre de gamètes recombinants est faible. (3, 36)

Figure 16 : Crossing-over lors de la méiose



Légende :

a/b : allèles du gène *i*

A/B : allèles du gène *I*

a et A appartiennent au chromosome maternel.

b et B appartiennent au chromosome paternel.

Sur cette figure, un seul chromosome est représenté. Son centromère est représenté par un cercle.

Lors de la première division de méiose, les chromosomes homologues s'apparent. À cette occasion, se produisent les *crossing-over*. Un échange de segments de chromatides a alors lieu. À la fin de la seconde division de méiose, on obtient 4 chromatides que l'on peut classer en 2 catégories : deux chromatides parentales, l'une paternelle portant b et B, l'autre maternelle portant a et A, et deux chromatides recombinantes portant les allèles b et A pour l'une, a et B pour la seconde.

Lors de la méiose, les individus parents donnent naissance à des individus enfants parmi lesquels on trouve des recombinants et des non recombinants. Cette nouvelle génération voit l'apparition de nouvelles combinaisons d'allèles présents sur une même chromatide. C'est le rapport du nombre de gamètes recombinés sur le nombre de gamètes total qui définit la fréquence des recombinaisons θ dans la descendance. On définit ensuite une distance génétique en centiMorgans (cM). Un cM équivaut à un segment de chromatide sur lequel la probabilité qu'un *crossing-over* se produise est de 1%.

La carte génétique est établie grâce à la position relative des gènes et des marqueurs sur les chromosomes, mais elle ne permet pas de connaître la distance physique exacte séparant deux locus. En effet, malgré une fréquence de recombinaison nulle ou très proche de zéro, il est possible que plusieurs milliers de bases séparent deux locus. (62, 94)

• Le séquençage du génome du Chien

La connaissance de l'organisation du génome est nécessaire pour effectuer des analyses génétiques plus poussées en vue de l'identification de gènes responsables de maladies héréditaires, d'études génomiques comparatives entre le Chien et l'Homme et par la suite pour la mise en place d'essais thérapeutiques, notamment en matière de thérapie génique. Depuis quelques années, des progrès fulgurants ont été réalisés en cartographie du génome canin, en grande partie grâce à l'espoir que représente le Chien en tant que modèle en génétique médicale. (70, 111)

Le génome du Chien est composé de 38 paires de chromosomes autosomes et d'une paire de chromosomes sexuels X et Y. Le séquençage du génome a été finalisé en 2005 (70). Le génome du Chien (2,4 Giga bases, Gb) s'est révélé plus petit que celui de l'Homme (2,9 Gb). Cette différence est probablement due au plus faible pourcentage de séquences répétées (31% sur le génome canin, 46% chez l'Homme, et

38% chez la Souris). On a estimé qu'au moins 650 Mb de séquences d'ADN du génome canin coïncidaient de façon unique avec des séquences du génome humain, avec notamment des fragments de probables gènes orthologues pour 18 473 des 24 467 gènes humains, ce qui confirme l'intérêt que suscite l'espèce canine comme modèle en génétique. (70, 111)

e. Identification des gènes mutés

• Le clonage positionnel

Il existe plusieurs méthodes pour identifier un gène dont la mutation est responsable d'une maladie génétique. Parmi ces méthodes, on trouve la technique du clonage fonctionnel fondée sur la biochimie : des indications sur la nature ou la fonction de la protéine défective permettent de remonter au gène présentant une anomalie. On peut aussi utiliser la cytogénétique. En effet, les observations des chromosomes peuvent révéler des anomalies de type délétion ou translocation qui sont susceptibles d'orienter vers une région précise du génome. Cependant, les deux approches les plus utilisées chez le Chien sont l'approche gène candidat et le clonage positionnel.

Nous avons choisi de développer la technique du clonage positionnel que nous avons utilisé dans notre partie expérimentale, présentée en partie III.

Le clonage positionnel est une méthode d'identification de gènes fondée uniquement sur la localisation du gène sur les chromosomes. Il est fondé sur les techniques de cartographie et de séquençage. Il s'agit d'un travail de focalisation progressive. Grâce aux cartes du génome, il permet d'identifier et de réduire progressivement un intervalle contenant le gène recherché. On définit tout d'abord une région, puis quand celle-ci a été limitée le plus possible, on recherche les gènes qui y sont localisés. Enfin, on détermine le gène responsable du caractère étudié parmi ceux-ci.

La première étape du clonage positionnel consiste à recenser les familles dans lesquelles des individus sont atteints par la maladie ou le caractère étudiés. On recueille alors des cellules du maximum de membres de ces familles, qu'ils soient sains ou atteints. En général, on prélève du sang que l'on conserve avec des anticoagulants tels que l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) ou des cellules de la muqueuse buccale recueillies à l'aide d'une cytobrosse. Puis on extrait l'ADN génomique à partir de ces prélèvements.

La deuxième étape est celle de la carte génétique. Elle vise à effectuer le génotypage de plusieurs centaines de marqueurs répartis à intervalles réguliers sur l'ensemble des chromosomes de tous les animaux informatifs des familles recensées ;

on parle de criblage du génome dans la littérature francophone et de *genome scan* dans la littérature anglo-saxonne. Le principe consiste à utiliser des marqueurs de l'ADN suffisamment proches du gène que l'on cherche pour que la probabilité de recombinaison entre eux soit faible. On peut ainsi identifier les marqueurs dont les allèles ségrègent spécifiquement avec l'allèle responsable de la maladie. Les marqueurs définissent un intervalle dans lequel se trouve le gène d'intérêt. Ils définissent une région sur l'un des chromosomes du génome, appelée intervalle candidat. L'objectif est alors de multiplier les marqueurs dans cette région afin d'affiner l'intervalle et d'approcher au plus près le gène incriminé. Lors de cette étape, on tente d'isoler le gène le plus précisément possible, uniquement en s'aidant de sa localisation chromosomique, sans avoir d'information sur sa fonction.

Afin de déterminer la région qui statistiquement a le plus de possibilité de contenir le gène recherché, deux types d'analyse des données de génotypage sont possibles : l'étude de liaison et l'étude d'association.

L'étude de liaison consiste à utiliser les liens de parentés qui existent entre les individus recrutés dans une étude. Pour cela, il faut commencer par recenser les familles atteintes, puis les malades au sein de ces familles, grâce à un processus sûr de discrimination des individus malades et sains. Tous les individus sont ensuite génotypés pour les différents marqueurs. Les résultats sont alors analysés statistiquement avec la méthode des *LOD-scores*. Les *LOD-scores* permettent de cumuler l'information présente dans différentes familles de petite taille. On teste statistiquement l'hypothèse de liaison génétique entre le locus recherché et le locus de chaque marqueur. Cette méthode est très souvent employée en génétique humaine, puisque souvent, les familles sont restreintes, l'information parcellaire, et il est bien évidemment exclus d'entreprendre des croisements selon les besoins de l'expérience, comme on pourrait le faire chez la Souris. De plus, l'analyse est fiable et aisée pour peu que l'on ait accès à un programme informatique. Il faut toutefois reconnaître que cette méthode paramétrique, rencontre quelques limites, telles que la nécessité de connaître le mode de transmission de la maladie ou encore sa pénétrance. (2, 3, 109)

L'étude d'association, qui est le modèle que nous avons choisi pour notre étude, s'apparente à une étude cas-témoin. En effet, elle consiste à comparer les fréquences des allèles d'un marqueur chez des sujets témoins et des sujets atteints. Elle utilise le déséquilibre de liaison entre deux locus, le marqueur et le locus de la maladie, qui se définit par l'existence d'une combinaison d'allèles à ces locus plus fréquente que celle attendue sous l'hypothèse d'indépendance des locus. En effet, deux locus en déséquilibre de liaison sont en général très proches sur un même chromosome. L'existence d'une association entre le phénotype lié à la maladie et le marqueur peut être due non seulement à l'existence d'un déséquilibre de liaison entre le marqueur et l'allèle morbide dont le locus est situé à proximité du marqueur, mais aussi à une répartition allélique particulière au sein d'une population. En effet, au cours de ces études, des malades non apparentés qui présentent un même haplotype, c'est-à-dire une même combinaison d'allèles présents sur une chromatide

et transmis en bloc au cours des générations, peuvent être soupçonnés de dériver d'un ancêtre commun. On parle alors d'un effet fondateur, en supposant qu'une mutation responsable de la maladie observée s'est produite chez un ancêtre commun à tous les malades. Les résultats des génotypages effectués dans le cas d'une étude d'association sont analysés avec le test du χ^2 . (2, 3)

À partir de l'étape de la carte génétique, on définissait il y a encore quelques années une étape au cours de laquelle on établissait la carte physique de la région, sous la forme d'un assemblage de contigs de clones d'ADN. Quand le génome de l'espèce a été séquencé, comme c'est le cas pour le Chien, cette étape n'est pas nécessaire. Nous ne la détaillerons pas davantage.

Quand un intervalle a été défini grâce à l'étape du génotypage, on dresse l'inventaire de tous les gènes connus présents dans cette région. Parmi ces gènes, on recherche ceux dont les mutations ségrègent spécifiquement chez les individus malades. Pour cela on analyse l'expression et les rôles potentiels de chaque gène de l'intervalle candidat, puis on séquence les gènes retenus chez des chiens malades et des chiens sains pour identifier la mutation.

Le clonage positionnel consiste donc à compléter la carte génétique de la région, en définissant la localisation sur le chromosome, puis en identifiant les gènes de cette région pour mettre en évidence un gène candidat. Il s'agit d'une méthode longue et difficile. C'est pour cela qu'elle est souvent complétée par la méthode gène candidat. En général, le clonage positionnel permet la définition d'un intervalle candidat, puis à partir de l'étude des gènes connus que cet intervalle contient, on utilise la méthode gène candidat que nous allons détailler.

• L'approche gène candidat

La méthode gène candidat est fondée sur l'hypothèse qu'un gène donné est responsable de la maladie étudiée. L'objectif est de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Il existe plusieurs types de candidats possibles. Tout d'abord, le gène peut être un candidat positionnel : c'est sa position dans le génome qui le rend intéressant. En effet, dans ce cas, la maladie a été cartographiée à cet endroit du génome dans d'autres espèces, et particulièrement chez l'Homme. Le gène candidat peut aussi être un candidat métabolique. Ce choix est alors fondé sur la physiopathologie ; une protéine ou une famille de protéines sont soupçonnées d'être impliquées dans le déterminisme de la maladie. Le gène candidat subit alors une analyse fonctionnelle et son séquençage est effectué chez des individus sains et atteints.

Dans le cas de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg, on peut commencer les recherches en séquençant le génome canin dans les régions qui sont synténiques des gènes humains impliqués dans les CMT, qui ne sont pas encore tous

connus. Pour cela, il faut postuler que les deux maladies : CMT chez l'Homme et polyneuropathie chez le Léonberg sont similaires.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, ces deux techniques sont complémentaires. Elles appartiennent à la génétique dite « inverse » : le gène impliqué dans la maladie héréditaire est identifié directement, sans que la protéine défective soit connue. En effet, en détaillant la méthodologie du clonage positionnel et la méthode gène candidat, il n'y a pas d'étape concernant l'anomalie de la protéine codée par le gène défectueux. Seule l'anomalie génétique est étudiée, et seule la liaison entre le gène incriminé et la maladie génétique étudiée est démontrée. C'est seulement quand la séquence nucléotidique du gène est connue que l'on peut déduire la séquence d'acides aminés qui compose la protéine correspondante. À partir de cette séquence, on peut atteindre la structure de la protéine normale et de la protéine mutée. Les travaux se poursuivent alors par l'étude du niveau d'expression du gène responsable de la maladie, de ses variations, et des tissus et organes dans lesquels ce gène est exprimé ou non, chez les chiens sains et atteints. Dans le cas de maladies progressives comme la polyneuropathie du Léonberg dont les premiers signes cliniques apparaissent tardivement, il est intéressant d'étudier les variations d'expression du gène tout au long de la vie de l'individu. Dans certains cas, le niveau d'expression est constant, mais le phénotype ne s'exprime que tardivement, tandis que dans d'autres cas, l'expression du gène peut être inconstante.

L'étude se prolonge, si les circonstances sont favorables, par l'étude d'une piste thérapeutique suggérée par la fonction du gène ou le type de mutation qui l'atteint. Dans certains cas, une mutation empêche totalement la synthèse de la protéine, et cette absence est à l'origine de la maladie. Un traitement apportant la protéine *in situ* pourrait dès lors être envisagé. On a aussi vu dans la première partie de notre étude que la compréhension d'une accumulation de protéines défectueuses dans le cas de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A chez l'Homme a permis la suggestion d'une nouvelle voie thérapeutique et l'exploration des propriétés de la curcumine.

Enfin, lorsque le gène responsable de la maladie est connu, on peut développer un test génétique afin de distinguer les individus homozygotes sains, les individus hétérozygotes et les individus homozygotes mutés. L'objectif final de la partie expérimentale que nous allons présenter est l'obtention d'un tel test. Celui-ci permettrait en effet de connaître le statut génétique d'un Léonberg avant que son statut phénotypique soit connu. (3, 44, 62, 91)

f. L'utilisation chez l'Homme des résultats obtenus chez le Chien

Pour appliquer les résultats obtenus chez le Chien à l'Homme, il faut que le gène identifié appartienne à une zone d'homologie entre les deux espèces. Ceci est

possible grâce à la conservation de synténies : un groupe de gènes localisé sur un chromosome unique dans une espèce, ici le Chien, est lié de façon similaire dans une autre espèce, l'Homme en l'occurrence. C'est sur cette propriété qu'est basée la cartographie comparée.

La cartographie comparée consiste à déterminer les régions chromosomiques homologues conservées entre plusieurs espèces et à en déterminer les bordures. Pour établir ces cartes, on peut tout d'abord utiliser un gène connu et déterminer la localisation de ses homologues dans d'autres espèces. En mettant différents résultats bout à bout, on définit des segments homologues. Une autre approche mène aussi à la construction de cartes comparées : il s'agit de la cytogénétique comparée. Cette méthode est plus globale. Elle permet l'identification de grandes régions d'homologies.

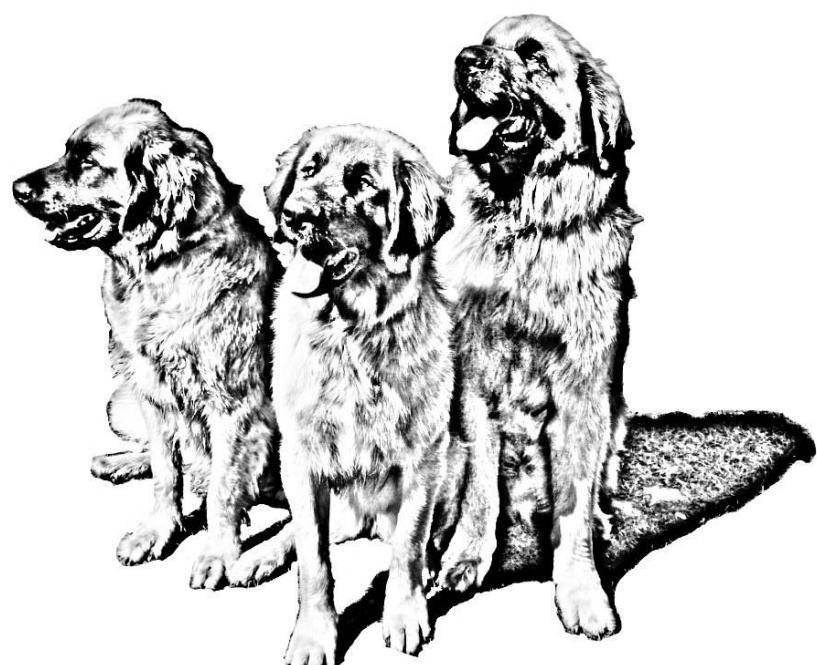
Quand des segments homologues ont été définis, on peut utiliser cette donnée pour transposer des connaissances acquises dans une espèce à une autre espèce. Ceci est particulièrement vrai pour les maladies, communes à plusieurs espèces, et causées par des mutations d'un même gène. À défaut de fournir une donnée sûre dans l'espèce de destination, la cartographie comparée fournit au moins une nouvelle piste de réflexion. Ainsi, un gène dont la mutation cause une forme de CMT chez l'Homme, s'il appartient à une zone homologue, peut être soupçonné d'être impliqué dans la polyneuropathie du Léonberg.

Les résultats des travaux sur la polyneuropathie héréditaire du Léonberg peuvent être utilisés de deux façons chez l'Homme. La première utilise la cartographie comparée que nous venons de décrire. Pour utiliser cette méthode, il faut postuler que les maladies humaine et canine sont similaires. La seconde façon d'appliquer le résultat de ces travaux consiste à utiliser la localisation du gène responsable de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg pour étudier la protéine formée. On peut alors connaître la fonction de cette protéine, et à partir de cela rechercher toutes les protéines ayant chez l'Homme le même type de fonction. On pourra alors retrouver, dans l'espèce humaine, des gènes dont la mutation est susceptible de générer des formes de CMT. (3)

TROISIÈME PARTIE :

Recherche expérimentale du gène impliqué dans la polyneuropathie héritaire du Léonberg

Figure 17 : Dessin de trois Léonbergs, à partir d'une photographie personnelle



La recherche du gène impliqué dans la polyneuropathie héréditaire du Léonberg comporte plusieurs étapes. La physiopathologie de cette maladie a fait l'objet d'un premier travail en 2006. C'est dans cette thèse de doctorat vétérinaire que le mode de transmission autosomique récessif a été démontré. Notre travail s'inscrit dans la continuité de celui-ci. (91)

Notre étude vise à rechercher la localisation du gène responsable de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg, dans l'espoir de compléter la carte génétique du Chien et de pouvoir proposer aux éleveurs un test génétique pour cette affection. (85, 91)

1. Matériel et méthode

a. Animaux

Nous avons travaillé sur des prélèvements d'ADN appartenant à 84 chiens de race Léonberg. Trente-deux d'entre eux ont fait l'objet d'une première étude en 2006 sur la caractérisation clinique, électromyographique et génétique de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg. Depuis cette première étude, 52 chiens ont été ajouté. Des confrères ont adressé les prélèvements de 25 d'entre eux au service de Génétique Moléculaire et Cellulaire de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA). Le matériel génétique des 13 derniers Léonbergs a été fourni par le laboratoire Antagene, qui participe au programme de recherche sur la polyneuropathie héréditaire du Léonberg en partenariat avec les équipes de l'ENVA. Au final, sur les 84 Léonbergs de notre étude, 43 soit % ont été inclus dans l'étude à la suite de leur prise en charge par les services de Neurologie et de Reproduction de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort et un par l'École Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL) (6, 91). Un tableau récapitulatif a été placé en Annexe 1.

Dans un premier temps, notre travail a consisté à mettre à jour les informations dont nous disposions sur les 32 chiens de l'étude de 2006. Pour cela, les propriétaires de ces animaux ont été contactés par téléphone. Nous avons commencé par prendre des nouvelles du ou des chiens dont nous possédions déjà des prélèvements, en questionnant les propriétaires sur leur état de santé, la présence de symptômes de polyneuropathie. Toutes les personnes contactées ont pris le temps de répondre à nos questions. Dans la mesure du possible, les propriétaires de Léonbergs contactés ont donné des nouvelles des descendants, descendants et frères et sœurs de leurs animaux. La race Léonberg n'est pas très fortement représentée en France, ce qui a pour conséquence que le monde de l'élevage dans cette race est restreint. C'est grâce à la confidentialité de cette race qu'il existe une proximité entre les éleveurs telle qu'ils peuvent suivre les membres de la famille de leurs chiens. Afin de compléter ces informations, nous avons utilisé les bases de données de la race. Grâce

à ces banques d'informations, les pedigrees des Léonbergs sont disponibles et accessibles très facilement. (59, 69, 117)

Sur les 32 chiens dont nous avons utilisé l'ADN, 6 étaient atteints de polyneuropathie. Cinq de ces 6 chiens ont été diagnostiqués par le service de Neurologie de l'ENVA. Le dernier Léonberg a été diagnostiqué par le Dr Granger, au Royaume-Uni. Après étude des pedigrees de tous les animaux, il s'est avéré qu'ils étaient apparentés, avec au moins un ancêtre commun. Le pedigree ne peut pas être présenté ici car il est trop étendu.

b. De l'animal à son ADN

Les 32 Léonbergs de notre étude ont fourni leur ADN pour nos recherches par prélèvement sanguin. Ces 32 Léonbergs ont été prélevés par les étudiants de l'ENVA. Tous les prélèvements ont été réalisés dans les mêmes conditions. La prise de sang s'effectue le plus souvent à la veine jugulaire ou à la veine saphène. Un tube dans lequel il y avait un anticoagulant : l'acide éthylène diamine tétra acétique ou EDTA a été utilisé. Le tableau présentant l'ensemble des chiens de l'étude est présenté en Annexe 1.

Un travail de prospection a permis de collecter des prélèvements sur 31 chiens cliniquement sains le 8 septembre 2007 lors d'une journée nationale de la race. Ces 31 chiens n'ont pas été ajoutés dans les expériences que nous présentons dans cette partie de notre thèse, mais ce travail nous donne l'occasion d'illustrer la méthode de recueil de l'ADN des chiens par frottis buccal. C'est, après le prélèvement sanguin, une deuxième méthode permettant de collecter de l'ADN sur un individu vivant. Elle présente plusieurs avantages : rapide, facile, fiable, peu invasive et indolore. Son principal inconvénient est la faible quantité d'ADN que cette méthode permet de récolter. Il suffit en effet de bien frotter la cytobrosse contre l'intérieur de la gencive et de la joue de l'animal pendant 20 secondes afin de récolter des fragments de muqueuse. Cette étape est illustrée par la figure 18. La brosse est ensuite conservée, à température ambiante, dans de l'éthanol à 90° lors de son acheminement jusqu'au laboratoire. Dans les deux cas, l'authenticité du prélèvement est garantie par le vétérinaire effectuant le prélèvement. Tout échantillon est accompagné du nom complet du chien, comprenant notamment son affixe, ce qui permet, lorsqu'il n'est pas fourni le jour du prélèvement par le propriétaire du chien, d'avoir accès facilement au pedigree de l'animal.

Figure 18 : Photographie d'un Léonberg en cours de prélèvement par frottis buccal



Légende :

Cette photographie illustre la méthode de recueil de l'ADN des chiens par frottis buccal. Elle consiste à frotter la cytobrosse contre l'intérieur de la gencive et de la joue de l'animal pendant 20 secondes afin de récolter des fragments de muqueuse.

Ce mode de prélèvement a été utilisé pour les 13 chiens sains obtenus grâce à une collaboration avec le laboratoire Antagene (6). Le récapitulatif des chiens de l'étude est présenté dans l'Annexe 1.

Lorsque le prélèvement arrive au laboratoire, il est conservé au réfrigérateur entre 0 et +4°C avant de procéder à l'extraction de l'ADN. L'extraction de l'ADN génomique à partir des cellules prélevées comporte plusieurs étapes immuables quel que soit le support utilisé (sang ou frottis buccal) :

- lyse des hématies et des leucocytes,
- destruction des protéines,
- destruction des autres acides nucléiques, notamment de l'ARN,

- séparation de la phase aqueuse contenant l'ADN, de la phase dans des solvants contenant les débris cellulaires.
- précipitation de l'ADN par l'alcool
- mise en suspension de la pelote d'ADN.

Au cours de notre étude, nous avons extrait l'ADN à partir de prélèvements sanguins. Nous détaillerons donc ce procédé. La lyse des cellules commence avec l'ajout d'un volume quadruple de Solution de Lyse des globules Rouges (SLR) au sang prélevé sur EDTA. La SLR est composée d'un mélange de 10 mmol/l de trishydroxyméthylaminométhane (TRIS), 5 mmol/l de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et de 10 mmol/l de chlorure de sodium (NaCl). Le mélange sang-SLR s'effectue sur agitateur à rouleaux pendant 5 minutes, puis il est centrifugé à 1500 tours par minutes à +4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est alors éliminé. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 3 ml de Solution de Lyse des globules Blancs (SLB). La SLB est composée de 10 mmol/l de (TRIS), 10mmol/l d'EDTA, de 50 mmol/l de NaCl et de 2% de dodécylsulfate de sodium (SDS). Cinq μ l de protéinase K à 20 mg/ml sont ajoutés au mélange culot-SLB avant de mettre le tout à incuber 2 à 16 heures entre 50 et 55°C. Cette suspension est alors transvasée dans un eppendorf contenant 1 ml de *phase lock gel*, qui a préalablement été centrifugé quelques secondes à 3000 tours/minutes. Trois ml d'une solution composée de 1,5 ml de phénol et 1,5 ml du mélange chloroforme-alcool isoamlylique (24/1) y sont ajoutés. Après une agitation vigoureuse, l'ensemble est centrifugé à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes. Après la centrifugation, 30 μ l d'ARNase A sous forme de solution congelée à 10 mg/ml sont ajoutés avant de placer le mélange 60 minutes à 37°C. Le même volume du mélange composé pour moitié de phénol et pour moitié du mélange chloroforme-alcool isoamlylique (24/1) est ensuite additionné au mélange. Après une agitation vigoureuse, l'ensemble est de nouveau centrifugé à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes. La phase supérieure est alors transvasée et 75 μ l de NaCl à une concentration de 5 mol/l y sont ajoutés avant de bien mélanger. Puis 2,5 volumes d'éthanol à 100% sont ajoutés. Après quelques délicats retournements de tube, la pelote d'ADN formée est visible. Celle-ci est récupérée et déposée dans un tube à centrifuger de 1,5 ml et 1 ml d'éthanol à 70° y est ajouté. Après 15 minutes, et une centrifugation à 15000 tours/minutes pendant 10 minutes si nécessaire, la pelote est récupérée afin d'être séchée pendant 10 minutes à 37°C. L'ADN est repris dans 1 ml de solution TRIS-EDTA de pH 8. Le tube est laissé une nuit complète sur agitateur circulaire avant de mesurer la densité optique.

Il est nécessaire de mesurer la densité optique de la solution obtenue afin de connaître sa concentration en ADN. Pour cela, on dilue 10 μ l de solution contenant l'ADN dans 90 μ l d'eau. Le spectrophotomètre Biophotometer 6131 que nous avons utilisé mesure la concentration de ces échantillons dilués au 1/10^{ème} à partir des mesures pour des longueurs d'onde de 230, 260 et 280 nm.

Dans certains cas, il arrive que le prélèvement n'apporte pas une quantité d'ADN suffisante pour être exploité dans autant d'expériences que nécessaire. Nous avons été confrontés à ce problème pour 11 Léonbergs de notre étude dans deux circonstances distinctes. Deux prélèvements d'ADN ont été fournis par le laboratoire Antagene à partir de frottis buccaux. Il arrive fréquemment dans ce cas que la quantité d'ADN se révèle insuffisante quand on souhaite utiliser ce matériel de nombreuses fois. Les 9 autres Léonbergs figuraient parmi les plus anciennement prélevés de notre échantillonnage, et revêtaient un caractère particulier, soit car c'étaient des animaux atteints de polyneuropathie héréditaire, soit car c'étaient des descendants de chiens atteints. Il était donc très important de pouvoir utiliser leur ADN dans notre étude. Nous avons donc utilisé un kit d'amplification du génome GenomiPhi V2 (GE Healthcare). Nous avons donc mélangé 1 µl d'ADN (10 ng) à 9 µl de *Sample Buffer* avant d'effectuer une dénaturation à 95°C pendant 3 minutes. Puis nous avons ajouté 10 µl du mélange 9 µl de *Reaction Buffer* et 1 µl d'*Enzyme Mix*. Le tout a été placé en incubation à 30°C pendant 90 minutes. L'enzyme ADN polymérase Phi 29 a ensuite été inactivée à 65°C pendant 10 minutes avant d'être refroidie progressivement jusqu'à 4°C. La réaction d'amplification a finalement été stoppée lors du stockage à -20°C. Grâce à cette amplification, nous avons obtenu pour chacun des 11 Léonbergs 20 µl d'une solution, qui, après une dilution au 1/10^{ème}, était concentrée entre 780 et 940 ng/µl en ADN, avec une concentration moyenne de 877 ng/µl et une médiane de 880 ng/µl. L'amplification a permis de multiplier par 10 environ la concentration de la solution tout en multipliant son volume par 20. Le protocole du kit « GenomiPhi V2 Amplification kit (GE Healthcare) » est présenté en Annexe 2.

c. Marqueurs utilisés

Le premier temps de la recherche du gène impliqué dans la polyneuropathie héréditaire du Léonberg a consisté à effectuer un criblage complet du génome. Pour cela, nous avons utilisé le *Minimal Screening Set 2* (MSS-2) qui contient 324 microsatellites canins (32). L'étude réalisée en 2006 par le Dr Riche ayant montré une transmission selon un mode autosomique récessif, nous n'avons pas utilisé les microsatellites de l'ensemble MSS-2 qui appartiennent aux chromosomes sexuels X et Y. La liste des 246 marqueurs qui nous ont permis de réaliser le génotypage figure dans le tableau 11. Les marqueurs ont été regroupés en *multiplex* afin d'économiser les quantités de réactifs et d'optimiser les temps de manipulation. Les *multiplex* que nous avons utilisés ont été regroupés par ligne. Nous avons choisi d'utiliser des microsatellites car ce sont des marqueurs bien adaptés à ce type d'étude. En effet, pour un même microsatellite, les allèles diffèrent par le nombre de répétitions du motif répété. La détermination de chaque allèle a été réalisée en amplifiant chaque microsatellite par PCR en choisissant des amorces spécifiques, dont l'une est fluorescente et en comparant la taille de chaque amplification sur un séquenceur capillaire. (32, 91)

Tableau 11 : Liste des marqueurs du MSS-2 utilisés (32)

Chromosome	Nom des marqueurs				
1	FH3413	C01.424	FH2793	FH2326	
1	FH3300	C01.251	FH2309		
1	FH2663	FH3603	FH3922	FH2294	
1	REN112I02	C00901			
2	FH3210	REN70M14	FH3965		
2	FH2890	C02.609	FH2613	FH2132	
2	FH2274	FH2608			
3	REN161A12	FH3464	FH2316	FH3377	
3	FH3115	C03.629	FH2145	REN260I04	
3	FH3396	FH2302			
4	REN298N18	REN303C04	AHT103		
4	FH2732	FH3310	REN74B13		
4	FH2776	REN195B08	FH2097	G07704	
5	FH3004	FH3978	REN175P10	CPH14	
5	FH3928	FH3320	FH3702	FH3089	
5	FH2140	REN285I23	FH3278	C05.771	
6	FH2525				
6	FH3933				
7	REN143L20				
8	FH3241	REN204K13	FH3316	C08.618	
8	REN178J05				
9	GALK1	FH2263	C09.173	REN54L20	REN287G01
9	FH2186	REN145P07	FH3835	FH2885	
10	FH2537	C10.781	ZUBECA1	DTR10.5	FH3381
10	REN06H21	FH2293	FH2422		
11	FH3203	REN242K04			
11	FH2004	C11.868	C11.873	DGN13	
11	FH4031	FH2319	FH2019		
12	REN153O12	FH2401	FH3591	REN94K11	
12	REN213F01	FH3711	FH1040	FH3748	
13	C13.391	REN120P21	FH3619	DTR13.6	
13	FH3494	REN227M12	FH3800		
14	FH3951	FH3725	FH2658	FH2763	
14	C14.866	PEZ10			
15	FH4012	CPH4	REN230G12		
15	FH3802	REN06C11	FH2360		
16	REN214L11	FH2670	REN73O19	REN85N14	FH3592
16	FH2155	REN275L19	FH2175		
17	REN240A05	FH3369	REN294E18	FH3995	
17	FH3047	FH4023			

Chromosome	Nom des marqueurs				
18	FH4060	FH3824	FH3815		
18	FH3944	FH2834	REN47J11	AHT130	
19	REN213G21	FH3491	FH3313	FH2380	
19	FH3299	FH3834	FH3969		
20	FH2951	FH2158	REN114M19		
20	REN55P21	REN100J13	REN93E07	AHTk209	
21	FH3803	FH2233	REN118B15	FH2441	
21	REN37A15	FH3398	FH2312		
22	REN42F10	FH3411			
22	REN49F22	REN128E21	C22.279	REN78I16	
23	FH3078	FH2626	REN181K04		
23	FH2508	REN113M13	REN02P03		
24	FH3023	FH2261			
24	AHT125	FH3287	REN228J19		
24	FH3750	REN106I06	REN272I16		
25	REN54E19	FH2324	FH3627		
26	REN62M06	DTR26.9	C26.733		
26	FH3426	DGN10			
27	FH3221	PEZ6	REN181L14	REN72K15	
27	FH2289	PEZ16	LEI002	FH3924	
28	C28.176	FH3963	FH2585		
28	REN146G17	FH2208			
29	FH2952	REN45F03	FH2385		
29	FH2364	REN52D08	FH1007		
30	FH3489	REN248F14	FH3632		
30	REN51C16	FH2290	FH3053		
31	FH2189	RVC11			
31	REN43H24	REN109B10	FH2712		
32	REN244E04	CPH2	FH3236		
32	FH2875	AHT127			
33	FH2790	FH3608	FH2361	REN186B12	
34	FH3721	REN174M24	REN243O23	REN314H10	
34	FH2377	FH3836			
35	REN282I22	REN94K23	REN112C08		
36	REN106I07	REN179H15	DTR36.3		
36	FH2611	FH3865			
37	FH3272	H10101	REN67C18		
37	FH3449	FH2532			
38	FH2766	REN02C20	REN164E17		

À cette liste ont été ajoutés d'autres marqueurs, afin de compléter le criblage du génome. Ces 47 marqueurs sont présentés dans le tableau 12 ci-dessous. Ils ont été choisis afin qu'il y ait au moins un marqueur toutes les 10 Mb sur l'ensemble du génome. En effet, certains marqueurs du panel initial se sont révélés non polymorphes chez le Léonberg et nous avons voulu compléter le criblage du génome.

Tableau 12 : Liste des marqueurs complémentaires utilisés (78)

Chromosome	Marqueur
2	REN95G07
2	FH2845
3	FH3738
3	REN75G13
3	FH3259
5	C02608
6	REN146A06
6	REN210I14
6	REN149M14
6	FH3282
6	REN37H09
6	REN65K24
6	REN287L04
7	REN211A02
7	FH2917
7	C07.620
7	FH3887
7	REN97N23
7	FH3042
8	FH4003
8	FH3653
10	REN181G20
13	FH3452
13	REN126A23
13	C13.900
15	FH2535
17	FH3775
18	REN183B03
22	REN228B08
23	FH3571
23	FH3108
24	FH3385
25	FH1004
25	FH2817

Chromosome	Marqueur
27	C27.502
27	REN100M16
27	REN260D22
27	C27.671
27	REN240O14
27	REN173L15
27	REN65A09
27	REN56C20
27	REN304E24
31	REN239G04
31	FH2239
32	REN286D15
35	FH3987

d. Protocole de PCR

Chaque échantillon soumis à la PCR, ou réaction de polymérisation en chaîne, était composé de 5 µl d'ADN et de 20 µl issus d'une solution mère dont 100 µl sont ainsi composés : 2,5 µl de désoxyribo-nucléotides triphosphates, 2,5 µl de *primer* R et 2,5 µl de *primer* F, 12,5 µl de tampon 10x, 1 µl de Taq polymérase (QBio Taq, MP Biomedicals) et 79 µl d'eau. Les *primers* R et F sont des amores spécifiques de la région à amplifier. Ce sont des oligonucléotides synthétiques d'une vingtaine de paires de bases, complémentaires de chaque extrémité du fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier. Dans notre cas, le fragment d'ADN amplifié était l'un des marqueurs présentés dans les tableaux 11 et 12.

Toutes les séries présentées en ligne dans le tableau 11 ont été amplifiées en PCR. Le principe de la PCR, reposant sur la succession de cycles à des températures différentes a été présenté dans la partie II. Nous avons programmé le thermocycleur pour chaque groupe de marqueurs. La PCR débutait avec 5 minutes à 95°C, suivies de 5 cycles composés de 30 secondes à 95°C, 15 secondes à 58°C et 10 secondes à 72°C. Trente cycles s'enchaînaient ensuite. Ils étaient composés de 3 phases : 20 secondes à 95°C, 15 secondes à 56°C et 10 secondes à 72°C. La phase d'extension finale durait 5 minutes à 72°C.

La qualité des amplifications a été vérifiée en électrophorèse dans un gel d'agarose avant de déterminer la taille des allèles sur un séquenceur à capillaires (ABI 6900, Applied Biosystem).

Nous allons détailler le protocole de préparation du gel d'agarose. Tout d'abord, 3 g d'agarose standard ont été mélangés dans 220 ml de tampon composé de TRIS, Acétate et EDTA (TAE). L'ensemble a été chauffé 5 minutes au micro-ondes à 800 Watts, puis nous avons fait refroidir en agitant la solution. Deux gouttes de bromure d'éthidium (BET) ont été ajoutées. Le BET est agent intercalant de l'ADN couramment utilisé comme marqueur d'acides nucléiques. Il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets. Le gel a finalement été coulé dans un support contenant un peigne afin d'être laissé à refroidir à température ambiante ou entre 0 et 4°C. Nous avons déposé dans chaque puits 5 µl de produit de PCR. À chaque extrémité du peigne et en son milieu quand le peigne était grand, nous avons placé 5 µl d'un marqueur de taille moléculaire. Le gel ainsi complété a été placé dans une cuve d'électrophorèse pour que la migration des morceaux d'ADN s'effectue. La taille des amplicons a été évaluée visuellement à l'aide du marqueur de taille qui forme une échelle de poids moléculaire. Les bandes générées étaient espacées de 100 paires de bases (pb) entre 100 pb et 1000 pb.

e. Analyse des produits de PCR

Les produits de PCR de bonne qualité ont été envoyés dans l'UMR6061 « Génétique et développement » du CNRS / Université de Rennes, chez le Dr Catherine André, responsable du Groupe Chien de l'UMR, afin de déterminer, grâce à un séquenceur, la taille des allèles. Deux µl de produit de PCR ont été séchés à 95°C pendant une minute, puis redilués dans de la formamide pour être analysés sur un séquenceur ABI 3900 (Applied Biosystem) (32).

f. Analyses statistiques

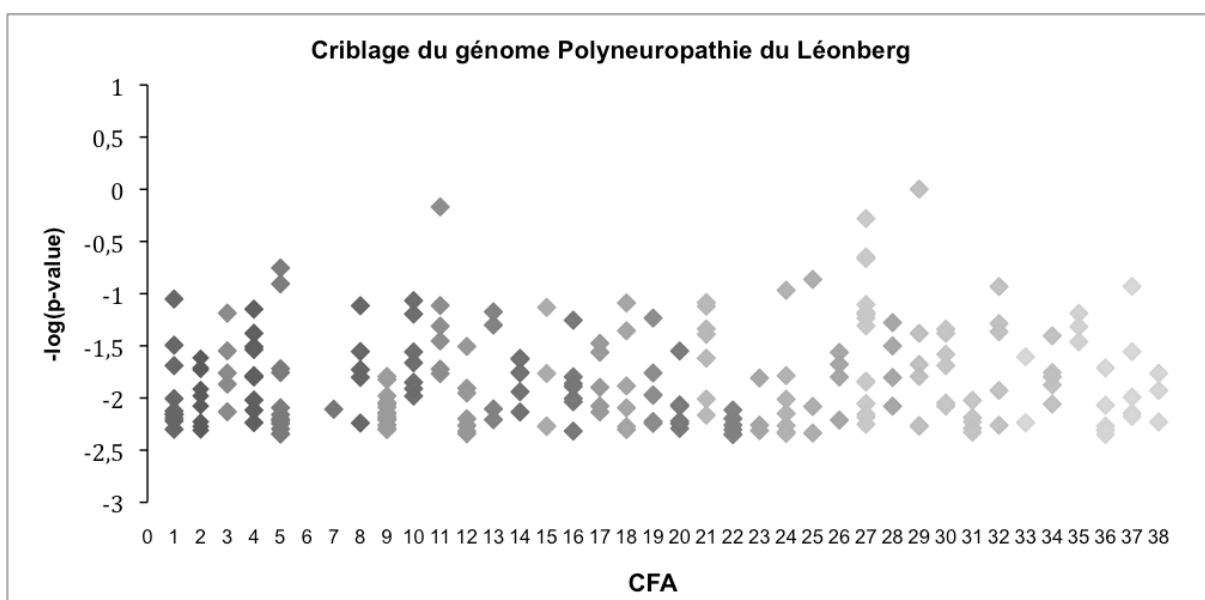
Les comparaisons des distributions alléliques des Léonbergs sains et atteints de polyneuropathie héréditaire ont été effectuées à l'aide d'un test du χ^2 bilatéral au risque d'erreur $\alpha = 5\%$. Le logiciel STRAT a été utilisé afin d'effectuer cette analyse (87). Une correction de Bonferroni a été appliquée pour tenir compte des comparaisons multiples.

2. Résultats

En première intention, les 246 marqueurs présentés dans le tableau 11 ont été amplifiés pour 15 chiens : L-02, L-06, L-07, L-09, L-14, L-15, L-21, L-22, L-25, L-26, L-27, L-30, L-31, L-32, L-33, dont 5 malades : L-02, L-22, L-30, L-31 et L-33. Le résultat

de la PCR et de l'électrophorèse en gel d'agarose pour le marqueur REN65A09 est illustré par la figure 14. Le résultat, suite à la lecture des allèles sur le séquenceur se présentait sous la forme de pics de fluorescence. La figure 15 illustre ce type de résultat. Les génotypes individuels des chiens ont été rassemblés dans un tableau afin de faciliter leur analyse. Deux cent vingt-sept marqueurs sur les 246 génotypés étaient polymorphes chez nos Léonbergs. Une comparaison des fréquences alléliques des malades et des sains a été effectuée à l'aide du logiciel STRAT (87) pour ces 227 marqueurs, avec une correction de Bonferroni. Les résultats de l'étude d'association sont présentés dans la figure 19. On constate qu'aucun marqueur ne présente une association statistiquement significative avec le locus de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg. En effet, $-\log(p\text{-value})$ est inférieur à 3 pour tous les marqueurs.

Figure 19 : Résultats de l'étude d'association effectuée sur les Léonbergs



Légende :

CF_{Axx} : chromosome canin xx. À chaque chromosome correspond une nuance de gris pour faciliter la lecture.

Chaque losange représente un marqueur microsatellite.

Le criblage du génome a été effectué sur 246 marqueurs. Parmi eux, 227 étaient polymorphes et ont donc été présentés sur cette figure.

En abscisse : les 38 autosomes canins.

En ordonnée : signification statistique de l'association entre chaque marqueur et le locus de la polyneuropathie. Le seuil est de +3.

On remarque également qu'aucun marqueur n'était exploitable sur le chromosome 6. Plusieurs marqueurs, pour lesquels les chiens malades étaient préférentiellement homozygotes, ont retenus notre attention. Les résultats de ces

différents marqueurs sont présentés dans les tableaux 14 à 29. Pour faciliter la lecture des génotypes, nous avons codé les allèles par des lettres minuscules (tableau 13).

Tableau 13 : Correspondance des différents allèles de marqueurs avec le nombre de répétitions

Chromosome	Marqueur	a	b	c	d	e	f	g
3	FH3115	227	230	232	226	228		
4	REN298N18	186	191					
4	REN303C04	373	375					
4	REN195B08	130	134	139				
11	C11.873	141	143	145				
11	DGN13	292	308	318	323	331	319	
14	FH3951	479	487	491	496	500		
16	REN214L11	223	227	231				
27	FH3221	180	184	188	189	193	196	
27	FH3924	355	365	385	389	390		
27	LEI002	130	140	123				
28	C28.176	187	193	195	204	186	192	
29	REN45F03	265	271	273				
32	CPH2	96	98	106	95	90		
32	FH2875	206	208	211	210			
35	REN94K23	240	242	248	247	235	239	241

Tableau 14 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3115 - 1 -

Chromosome 3 FH3115			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	c
L-22	malade	b	
L-30	malade	b	
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	
L-06	sain	b	a
L-07	sain	b	c
L-09	sain	a	
L-14	sain	b	a
L-15	sain	b	
L-21	sain	b	c
L-25	sain	b	
L-26	sain	b	
L-27	sain	b	c
L-32	sain	b	c

Tableau 15 : Résultats de l'amplification du marqueur REN298N18 - 1 -

Chromosome 4 REN298N18			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade	a	b
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-06	sain	a	
L-07	sain	a	b
L-09	sain	a	b
L-14	sain	a	
L-15	sain	a	b
L-21	sain	a	
L-25	sain	a	b
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	
L-32	sain	a	

Tableau 16 : Résultats de l'amplification du marqueur REN303C04 - 1 -

Chromosome 4 REN303C04			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	
L-22	malade	b	
L-30	malade	b	
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	
L-06	sain	b	
L-07	sain	b	
L-09	sain	b	
L-14	sain	b	a
L-15	sain	b	
L-21	sain	b	
L-25	sain	b	a
L-26	sain	b	a
L-27	sain	b	
L-32	sain	b	a

Tableau 17 : Résultats de l'amplification du marqueur REN195B08 - 1 -

Chromosome 4 REN195B08			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade	a	c
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-06	sain	a	b
L-07	sain	a	
L-09	sain	a	
L-14	sain	a	
L-15	sain	a	b
L-21	sain	a	b
L-25	sain	a	
L-26	sain	a	b
L-27	sain	a	b
L-32	sain	a	b

Tableau 18 : Résultats de l'amplification du marqueur C11.873 - 1 -

Chromosome 11 C11.873			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	
L-22	malade	c	
L-30	malade	c	
L-31	malade	c	
L-33	malade		
L-06	sain	c	
L-07	sain		
L-09	sain	c	
L-14	sain		
L-15	sain	c	a
L-21	sain	c	b
L-25	sain		
L-26	sain	c	
L-27	sain	c	
L-32	sain	c	a

Tableau 19 : Résultats de l'amplification du marqueur DGN13 - 1 -

Chromosome 11 DGN13			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	d	b
L-22	malade	d	
L-30	malade	d	
L-31	malade	d	
L-33	malade		
L-06	sain	d	
L-07	sain		
L-09	sain	d	c
L-14	sain		
L-15	sain	d	
L-21	sain	d	e
L-25	sain		
L-26	sain	d	a
L-27	sain	d	
L-32	sain	d	c

Tableau 20 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3951 - 1 -

Chromosome 14 FH3951			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	
L-22	malade	b	
L-30	malade	b	d
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	
L-06	sain	b	d
L-07	sain	b	c
L-09	sain		
L-14	sain	b	a
L-15	sain	b	c
L-21	sain	b	e
L-25	sain	b	a
L-26	sain	b	d
L-27	sain	b	d
L-32	sain	b	e

Tableau 21 : Résultats de l'amplification du marqueur REN214L11 - 1 -

Chromosome 16 REN214L11			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	c
L-22	malade	b	
L-30	malade	b	
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	
L-06	sain	b	
L-07	sain	b	
L-09	sain	b	
L-14	sain	b	c
L-15	sain	b	c
L-21	sain	b	a
L-25	sain	b	
L-26	sain	b	c
L-27	sain	b	
L-32	sain	b	c

Tableau 22 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3221 - 1 -

Chromosome 27 FH3221			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	d	
L-22	malade	d	
L-30	malade	d	b
L-31	malade	d	
L-33	malade	d	
L-06	sain	d	b
L-07	sain	d	b
L-09	sain	b	c
L-14	sain	d	c
L-15	sain	b	e
L-21	sain	d	b
L-25	sain	b	
L-26	sain	d	
L-27	sain	d	
L-32	sain	a	b

Tableau 23 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3924 - 1 -

Chromosome 27 FH3924			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade	a	c
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-06	sain	a	b
L-07	sain	a	b
L-09	sain	b	
L-14	sain	b	d
L-15	sain	d	
L-21	sain	a	b
L-25	sain	a	b
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	d
L-32	sain	a	c

Tableau 24 : Résultats de l'amplification du marqueur LEI002 - 1 -

Chromosome 27 LEI002			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade	a	b
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-06	sain	a	b
L-07	sain	a	b
L-09	sain	a	b
L-14	sain	a	b
L-15	sain	a	b
L-21	sain	a	b
L-25	sain	b	
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	
L-32	sain	a	b

Tableau 25 : Résultats de l'amplification du marqueur C28.176 - 1 -

Chromosome 28 C28.176			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade		
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-06	sain	a	d
L-07	sain	a	
L-09	sain	a	c
L-14	sain	a	c
L-15	sain	a	b
L-21	sain	a	
L-25	sain	a	b
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	
L-32	sain	a	

Tableau 26 : Résultats de l'amplification du marqueur REN45F03 - 1 -

Chromosome 29 REN45F03			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	a
L-22	malade	c	
L-30	malade		
L-31	malade	c	
L-33	malade	c	
L-06	sain	c	
L-07	sain	c	
L-09	sain	c	
L-14	sain	c	a
L-15	sain	c	
L-21	sain	c	b
L-25	sain	c	
L-26	sain	c	
L-27	sain	c	
L-32	sain	c	

Tableau 27 : Résultats de l'amplification du marqueur CPH2 - 1 -

Chromosome 32 CPH2			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	
L-22	malade	c	a
L-30	malade	c	
L-31	malade	c	
L-33	malade	c	
L-06	sain	b	
L-07	sain	c	b
L-09	sain	c	
L-14	sain	c	
L-15	sain	c	
L-21	sain	a	
L-25	sain	c	
L-26	sain	b	
L-27	sain	a	b
L-32	sain	c	

Tableau 28 : Résultats de l'amplification du marqueur FH2875 - 1 -

Chromosome 32 FH2875			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	b
L-22	malade	c	
L-30	malade	c	
L-31	malade	c	
L-33	malade	c	
L-06	sain	c	a
L-07	sain	c	a
L-09	sain	c	
L-14	sain	c	b
L-15	sain	c	
L-21	sain	c	
L-25	sain	c	
L-26	sain	a	
L-27	sain	c	a
L-32	sain	c	a

Tableau 29 : Résultats de l'amplification du marqueur REN94K23 - 1 -

Chromosome 35 REN94K23			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	
L-22	malade	c	
L-30	malade	c	b
L-31	malade	c	
L-33	malade	c	
L-06	sain	c	a
L-07	sain	c	
L-09	sain	c	b
L-14	sain	c	a
L-15	sain	c	b
L-21	sain	c	a
L-25	sain	c	
L-26	sain	c	a
L-27	sain	c	a
L-32	sain		

Les résultats des marqueurs complémentaires présentés dans le tableau 12 sont en cours d'analyse et ne seront donc pas présentés ici. Seules les électrophorèses en gel d'agarose de contrôle des PCR ont été effectuées. Celle du marqueur REN65A09 a été présentée dans la figure 14.

Afin de compléter les données des marqueurs ayant présenté une potentielle association avec la polyneuropathie (tableaux 14 à 29), nous avons génotypé 16 chiens sains supplémentaires : L-03, L-04, L-05, L-08, L-10, L-11, L-12, L-13, L-16, L-17, L-18, L-19, L-23, L-24, L-28 et L-29. Les résultats compilés pour tous les chiens génotypés sont présentés dans les tableaux 30 à 45 qui montrent les résultats pour les marqueurs indiqués dans le tableau 13.

Tableau 30 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3115 - 2 -

Chromosome 3 FH3115			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	c
L-22	malade	b	
L-30	malade	b	
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	
L-03	?	b	c
L-04	sain	b	
L-05	sain	d	
L-06	sain	b	a
L-07	sain	b	c
L-08	sain	b	
L-09	sain	a	
L-10	sain	b	
L-11	sain	b	
L-12	sain	b	
L-13	sain	b	
L-14	sain	b	a
L-15	sain	b	
L-16	sain	e	
L-17	sain	c	
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	b	c
L-23	sain	e	
L-24	sain	b	
L-25	sain	b	
L-26	sain	b	
L-27	sain	b	c
L-28	sain	e	c
L-29	sain	b	c
L-32	sain	b	c

Tableau 31 : Résultats de l'amplification du marqueur REN298N18 - 2 -

Chromosome 4 REN298N18			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade	a	b
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-03	?	a	
L-04	sain	a	b
L-05	sain	a	b
L-06	sain	a	
L-07	sain	a	b
L-08	sain	a	
L-09	sain	a	b
L-10	sain		
L-11	sain		
L-12	sain	a	b
L-13	sain	a	b
L-14	sain	a	
L-15	sain	a	b
L-16	sain	b	
L-17	sain	a	
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	a	
L-23	sain	a	
L-24	sain	b	
L-25	sain	a	b
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	
L-28	sain	a	b
L-29	sain	a	b
L-32	sain	a	

Tableau 32 : Résultats de l'amplification du marqueur REN303C04 - 2 -

Chromosome 4 REN303C04			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	
L-22	malade	b	
L-30	malade	b	
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	
L-03	?	b	
L-04	sain	b	
L-05	sain	b	
L-06	sain	b	
L-07	sain	b	
L-08	sain	b	a
L-09	sain	b	
L-10	sain	b	
L-11	sain	b	
L-12	sain	b	
L-13	sain	b	a
L-14	sain	b	a
L-15	sain	b	
L-16	sain	b	
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain	b	
L-21	sain	b	
L-23	sain	b	a
L-24	sain	b	
L-28	sain	b	a
L-25	sain	b	a
L-26	sain	b	a
L-27	sain	b	
L-29	sain	b	a
L-32	sain	b	a

Tableau 33 : Résultats de l'amplification du marqueur REN195B08 - 2 -

Chromosome 4 REN195B08			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade	a	c
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-03	?	a	
L-04	sain	a	
L-05	sain	a	b
L-06	sain	a	b
L-07	sain	a	
L-08	sain	a	b
L-09	sain	a	
L-10	sain	a	
L-11	sain	a	
L-12	sain	a	
L-13	sain	a	
L-14	sain	a	
L-15	sain	a	b
L-16	sain	a	
L-17	sain	a	b
L-18	sain	b	
L-19	sain	a	b
L-21	sain	a	b
L-23	sain	a	
L-24	sain	a	
L-25	sain	a	
L-26	sain	a	b
L-27	sain	a	b
L-28	sain	a	
L-29	sain	a	b
L-32	sain	a	b

Tableau 34 : Résultats de l'amplification du marqueur C11.873 - 2 -

Chromosome 11 C11.873			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	
L-22	malade	c	
L-30	malade	c	
L-31	malade	c	
L-33	malade		
L-03	?	c	
L-04	sain	c	
L-05	sain	c	
L-06	sain	c	
L-07	sain		
L-08	sain	c	
L-09	sain	c	
L-10	sain	c	b
L-11	sain	c	b
L-12	sain	c	
L-13	sain	c	
L-14	sain		
L-15	sain	c	a
L-16	sain	c	
L-17	sain	b	
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	c	b
L-23	sain	c	
L-24	sain	c	
L-25	sain		
L-26	sain	c	
L-27	sain	c	
L-28	sain	c	
L-29	sain	c	
L-32	sain	c	a

Tableau 35 : Résultats de l'amplification du marqueur DGN13 - 2 -

Chromosome 11 DGN13			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	d	b
L-22	malade	d	
L-30	malade	d	
L-31	malade	d	
L-33	malade		
L-03	?	d	
L-04	sain	d	f
L-05	sain	d	
L-06	sain	d	
L-07	sain		
L-08	sain	d	b
L-09	sain	d	c
L-10	sain		
L-11	sain	f	
L-12	sain	d	f
L-13	sain	d	
L-14	sain		
L-15	sain	d	
L-16	sain		
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	d	e
L-23	sain	d	
L-24	sain	d	
L-25	sain		
L-26	sain	d	a
L-27	sain	d	
L-28	sain	b	f
L-29	sain	d	f
L-32	sain	d	c

Tableau 36 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3951 - 2 -

Chromosome 14 FH3951			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	
L-22	malade	b	
L-30	malade	b	d
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	
L-03	?	b	a
L-04	sain		
L-05	sain	b	d
L-06	sain	b	d
L-07	sain	b	c
L-08	sain		
L-09	sain		
L-10	sain	b	
L-11	sain		
L-12	sain	b	
L-13	sain	b	a
L-14	sain	b	a
L-15	sain	b	c
L-16	sain		
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	b	e
L-23	sain	b	?
L-24	sain		
L-25	sain	b	a
L-26	sain	b	d
L-27	sain	b	d
L-28	sain	b	
L-29	sain	b	
L-32	sain	b	e

Tableau 37 : Résultats de l'amplification du marqueur REN214L11 - 2 -

Chromosome 16 REN214L11			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	c
L-22	malade	b	
L-30	malade	b	
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	
L-03	?	b	a
L-04	sain	b	
L-05	sain	b	
L-06	sain	b	
L-07	sain	b	
L-08	sain	b	
L-09	sain	b	
L-10	sain	b	c
L-11	sain	b	c
L-12	sain	b	
L-13	sain	b	c
L-14	sain	b	c
L-15	sain	b	c
L-16	sain	b	
L-17	sain	b	
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	b	a
L-23	sain	b	
L-24	sain	b	
L-25	sain	b	
L-26	sain	b	c
L-27	sain	b	
L-28	sain	b	
L-29	sain	b	
L-32	sain	b	c

Tableau 38 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3221 - 2 -

Chromosome 27 FH3221			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	d	
L-22	malade	d	
L-30	malade	d	b
L-31	malade	d	
L-33	malade	d	
L-03	?	d	c
L-04	sain	c	
L-05	sain	d	c
L-06	sain	d	b
L-07	sain	d	b
L-08	sain		
L-09	sain	b	c
L-10	sain	b	
L-11	sain	d	b
L-12	sain	d	b
L-13	sain	d	
L-14	sain	d	c
L-15	sain	b	e
L-16	sain	d	b
L-17	sain	d	f
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	d	b
L-23	sain	d	b
L-24	sain	d	b
L-25	sain	b	
L-26	sain	d	
L-27	sain	d	
L-28	sain	d	
L-29	sain	d	
L-32	sain	a	b

Tableau 39 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3924 - 2 -

Chromosome 27 FH3924			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade	a	c
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-03	?	b	
L-04	sain	a	b
L-05	sain		
L-06	sain	a	b
L-07	sain	a	b
L-08	sain	a	e
L-09	sain	b	
L-10	sain	b	
L-11	sain	a	b
L-12	sain	a	b
L-13	sain	a	e
L-14	sain	b	d
L-15	sain	d	
L-16	sain		
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	a	b
L-23	sain	a	b
L-24	sain	a	e
L-25	sain	a	b
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	d
L-28	sain	a	
L-29	sain	a	e
L-32	sain	a	c

Tableau 40 : Résultats de l'amplification du marqueur LEI002 - 2 -

Chromosome 27 LEI002			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade	a	b
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-03	?	a	b
L-04	sain	a	
L-05	sain	a	c
L-06	sain	a	b
L-07	sain	a	b
L-08	sain	a	b
L-09	sain	a	b
L-10	sain		
L-11	sain	a	
L-12	sain	a	b
L-13	sain	a	b
L-14	sain	a	b
L-15	sain	a	b
L-16	sain	a	
L-17	sain	a	b
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	a	b
L-23	sain	a	b
L-24	sain	a	b
L-25	sain	b	
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	
L-28	sain	a	
L-29	sain	a	
L-32	sain	a	b

Tableau 41 : Résultats de l'amplification du marqueur C28.176 - 2 -

Chromosome 28 C28.176			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade		
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-03	?	e	c
L-04	sain	e	c
L-05	sain	e	d
L-06	sain	a	d
L-07	sain	a	
L-08	sain		
L-09	sain	a	c
L-10	sain	e	
L-11	sain		
L-12	sain	e	c
L-13	sain		
L-14	sain	a	c
L-15	sain	a	b
L-16	sain	e	
L-17	sain	e	c
L-18	sain	e	c
L-19	sain	e	c
L-21	sain	a	
L-23	sain	e	f
L-24	sain	e	
L-25	sain	a	b
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	
L-28	sain	e	
L-29	sain	e	
L-32	sain	a	

Tableau 42 : Résultats de l'amplification du marqueur REN45F03 - 2 -

Chromosome 29 REN45F03			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	a
L-22	malade	c	
L-30	malade		
L-31	malade	c	
L-33	malade	c	
L-03	?	c	a
L-04	sain	c	
L-05	sain	c	
L-06	sain	c	
L-07	sain	c	
L-08	sain		
L-09	sain	c	
L-10	sain		
L-11	sain	c	
L-12	sain		
L-13	sain	c	
L-14	sain	c	a
L-15	sain	c	
L-16	sain		
L-17	sain	c	
L-18	sain	c	
L-19	sain	c	a
L-21	sain	c	b
L-23	sain	c	
L-24	sain		
L-25	sain	c	
L-26	sain	c	
L-27	sain	c	
L-28	sain	c	
L-29	sain	c	
L-32	sain	c	

Tableau 43 : Résultats de l'amplification du marqueur CPH2 - 2 -

Chromosome 32 CPH2			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	
L-22	malade	c	a
L-30	malade	c	
L-31	malade	c	
L-33	malade	c	
L-03	?	c	b
L-04	sain	c	b
L-05	sain	c	b
L-06	sain	b	
L-07	sain	c	b
L-08	sain	b	d
L-09	sain	c	
L-10	sain	c	
L-11	sain	c	
L-12	sain	c	d
L-13	sain		
L-14	sain	c	
L-15	sain	c	
L-16	sain	c	b
L-17	sain	c	d
L-18	sain	c	d
L-19	sain	d	e
L-21	sain	a	
L-23	sain	c	
L-24	sain	c	d
L-25	sain	c	
L-26	sain	b	
L-27	sain	a	b
L-28	sain	c	b
L-29	sain	c	b
L-32	sain	c	

Tableau 44 : Résultats de l'amplification du marqueur FH2875 - 2 -

Chromosome 32 FH2875			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	b
L-22	malade	c	
L-30	malade	c	
L-31	malade	c	
L-33	malade	c	
L-03	?	d	b
L-04	sain	d	a
L-05	sain	d	
L-06	sain	c	a
L-07	sain	c	a
L-08	sain	d	a
L-09	sain	c	
L-10	sain	d	b
L-11	sain	d	
L-12	sain	d	a
L-13	sain	d	
L-14	sain	c	b
L-15	sain	c	
L-16	sain	d	
L-17	sain	a	
L-18	sain	d	a
L-19	sain	d	
L-21	sain	c	
L-23	sain	d	
L-24	sain	d	
L-25	sain	c	
L-26	sain	a	
L-27	sain	c	a
L-28	sain	d	a
L-29	sain	d	
L-32	sain	c	a

Tableau 45 : Résultats de l'amplification du marqueur REN94K23 - 2 -

Chromosome 35 REN94K23			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	
L-22	malade	c	
L-30	malade	c	b
L-31	malade	c	
L-33	malade	c	
L-03	?	d	
L-04	sain	e	
L-05	sain	e	f
L-06	sain	c	a
L-07	sain	c	
L-08	sain		
L-09	sain	c	b
L-10	sain		
L-11	sain	d	
L-12	sain	d	g
L-13	sain	d	f
L-14	sain	c	a
L-15	sain	c	b
L-16	sain		
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	c	a
L-23	sain	d	
L-24	sain	d	f
L-25	sain	c	
L-26	sain	c	a
L-27	sain	c	a
L-28	sain	g	
L-29	sain		
L-32	sain		

Enfin, nous avons génotypé le chien malade provenant du Royaume-Uni (L-34) pour les marqueurs du chromosome 27. Les résultats des 32 Léonbergs pour les 15 marqueurs du chromosome canin 27 sont présentés dans les tableaux 47 à 61. Le tableau 46 présente ces 15 marqueurs ainsi que la correspondance entre les différents allèles des marqueurs, notés en lettres dans les tableaux 47 à 61 pour en simplifier la lecture. Les tableaux 40, 38 et 39 correspondant respectivement aux marqueurs LEI002, FH3221 et FH3924 ont été repris ici afin de faciliter l'accès à l'information et numérotés 51, 54 et 57. Ainsi, toutes les données concernant le chromosome canin 27 de notre étude sont regroupées dans les tableaux 47 à 61.

Tableau 46 : Correspondance des différents allèles de marqueurs du chromosome canin 27 avec le nombre de répétitions

Chromosome	Marqueur	a	b	c	d	e	f	g
27	FH2289	280	287	295	299	316	320	324
27	PEZ16	296	300					
27	REN304E24	162	179					
27	REN173L15	176	185					
27	LEI002	130	140	123				
27	REN65A09	189	199	209	211	215		
27	C27.502	160	167	169				
27	FH3221	180	184	188	189	193	196	
27	C27.671	180	188	190				
27	REN56C20	247	249					
27	FH3924	355	365	385	389	390		
27	PEZ6	171	172	175	179	183	184	187
27	REN100M16	206	211	215				
27	REN181L14	179	181	182	184			
27	REN72K15	240	251	253	255	257		

Tableau 47 : Résultats de l'amplification du marqueur FH2289

Chromosome 27 FH2289			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	e
L-22	malade	c	d
L-30	malade	b	f
L-31	malade	c	b
L-33	malade	c	b
L-34	malade		
L-03	?		
L-04	sain		
L-05	sain		
L-06	sain	b	
L-07	sain	c	
L-08	sain		
L-09	sain	b	
L-10	sain		
L-11	sain		
L-12	sain		
L-13	sain		
L-14	sain	a	g
L-15	sain	c	f
L-16	sain		
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	b	
L-23	sain		
L-24	sain		
L-25	sain	b	f
L-26	sain	c	b
L-27	sain	c	f
L-28	sain		
L-29	sain		
L-32	sain	c	f

Tableau 48 : Résultats de l'amplification du marqueur PEZ16

Chromosome 27 PEZ16			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	
L-22	malade	b	a
L-30	malade	b	a
L-31	malade	b	a
L-33	malade	b	a
L-34	malade		
L-03	?		
L-04	sain		
L-05	sain		
L-06	sain	b	
L-07	sain	b	
L-08	sain		
L-09	sain	a	
L-10	sain		
L-11	sain		
L-12	sain		
L-13	sain		
L-14	sain	b	a
L-15	sain	a	
L-16	sain		
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	b	a
L-23	sain		
L-24	sain		
L-25	sain	a	
L-26	sain	b	a
L-27	sain	b	
L-28	sain		
L-29	sain		
L-32	sain	b	a

Tableau 49 : Résultats de l'amplification du marqueur REN304E24

Chromosome 27 REN304E24			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	b
L-30	malade	a	
L-31	malade	a	b
L-33	malade	a	b
L-34	malade	a	
L-03	?	a	
L-04	sain	a	
L-05	sain	a	
L-06	sain	a	
L-07	sain	a	
L-08	sain	a	
L-09	sain	a	
L-10	sain	a	
L-11	sain	a	
L-12	sain	a	
L-13	sain	a	
L-14	sain	a	
L-15	sain	a	
L-16	sain	a	
L-17	sain	a	
L-18	sain	a	
L-19	sain	a	
L-21	sain	a	b
L-23	sain	a	
L-24	sain	a	
L-25	sain		
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	
L-28	sain	a	
L-29	sain	a	
L-32	sain	a	b

Tableau 50 : Résultats de l'amplification du marqueur REN173L15

Chromosome 27 REN173L15			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	
L-22	malade	b	
L-30	malade	b	
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	
L-34	malade		
L-03	?	b	
L-04	sain	b	
L-05	sain	b	
L-06	sain		
L-07	sain	b	
L-08	sain	b	a
L-09	sain	b	a
L-10	sain	b	
L-11	sain	b	
L-12	sain	b	
L-13	sain	b	
L-14	sain	b	
L-15	sain	b	
L-16	sain	b	
L-17	sain	b	
L-18	sain	b	
L-19	sain	b	
L-21	sain	b	
L-23	sain	b	
L-24	sain	b	
L-25	sain	b	
L-26	sain	b	
L-27	sain	b	
L-28	sain	b	
L-29	sain	b	a
L-32	sain	b	

Tableau 51 : Résultats de l'amplification du marqueur LEI002 - 3 -

Chromosome 27 LEI002			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade	a	b
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-34	malade		
L-03	?	a	b
L-04	sain	a	
L-05	sain	a	c
L-06	sain	a	b
L-07	sain	a	b
L-08	sain	a	b
L-09	sain	a	b
L-10	sain		
L-11	sain	a	
L-12	sain	a	b
L-13	sain	a	b
L-14	sain	a	b
L-15	sain	a	b
L-16	sain	a	
L-17	sain	a	b
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	a	b
L-23	sain	a	b
L-24	sain	a	b
L-25	sain	b	
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	
L-28	sain	a	
L-29	sain	a	
L-32	sain	a	b

Tableau 52 : Résultats de l'amplification du marqueur REN65A09

Chromosome 27 REN65A09			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	d
L-22	malade	b	
L-30	malade	d	
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	d
L-34	malade	b	c
L-03	?	b	d
L-04	sain	b	d
L-05	sain	b	d
L-06	sain	b	c
L-07	sain	b	a
L-08	sain	b	d
L-09	sain	b	d
L-10	sain	b	d
L-11	sain	b	d
L-12	sain	b	d
L-13	sain	b	d
L-14	sain	d	
L-15	sain	d	
L-16	sain	b	
L-17	sain	b	
L-18	sain	b	d
L-19	sain	b	e
L-21	sain	b	d
L-23	sain	b	d
L-24	sain	d	
L-25	sain	b	d
L-26	sain	b	d
L-27	sain	d	
L-28	sain	b	d
L-29	sain	b	d
L-32	sain	d	

Tableau 53 : Résultats de l'amplification du marqueur C27.502

Chromosome 27 C27.502			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	a
L-22	malade	c	
L-30	malade	a	
L-31	malade	c	
L-33	malade	c	a
L-34	malade	c	a
L-03	?	a	
L-04	sain	c	a
L-05	sain	c	a
L-06	sain	c	a
L-07	sain	c	
L-08	sain	c	a
L-09	sain	c	a
L-10	sain	c	a
L-11	sain	c	a
L-12	sain	c	
L-13	sain	c	a
L-14	sain	a	
L-15	sain	a	
L-16	sain	c	a
L-17	sain	c	a
L-18	sain	c	a
L-19	sain	c	a
L-21	sain	c	a
L-23	sain	c	a
L-24	sain	c	a
L-25	sain	c	
L-26	sain	c	a
L-27	sain	a	
L-28	sain	c	a
L-29	sain	c	a
L-32	sain	c	b

Tableau 54 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3221 - 3 -

Chromosome 27 FH3221			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	d	
L-22	malade	d	
L-30	malade	d	b
L-31	malade	d	
L-33	malade	d	
L-34	malade		
L-03	?	d	c
L-04	sain	c	
L-05	sain	d	c
L-06	sain	d	b
L-07	sain	d	b
L-08	sain		
L-09	sain	b	c
L-10	sain	b	
L-11	sain	d	b
L-12	sain	d	b
L-13	sain	d	
L-14	sain	d	c
L-15	sain	b	e
L-16	sain	d	b
L-17	sain	d	f
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	d	b
L-23	sain	d	b
L-24	sain	d	b
L-25	sain	b	
L-26	sain	d	
L-27	sain	d	
L-28	sain	d	
L-29	sain	d	
L-32	sain	a	b

Tableau 55 : Résultats de l'amplification du marqueur C27.671

Chromosome 27 C27.671			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	c	
L-22	malade	c	
L-30	malade	c	b
L-31	malade	c	
L-33	malade	c	
L-34	malade	c	b
L-03	?	b	
L-04	sain	c	b
L-05	sain	c	b
L-06	sain	c	b
L-07	sain	c	
L-08	sain	c	
L-09	sain	c	b
L-10	sain	c	b
L-11	sain	c	b
L-12	sain	c	
L-13	sain	c	
L-14	sain	c	b
L-15	sain	b	
L-16	sain	c	b
L-17	sain	c	b
L-18	sain	c	
L-19	sain	c	a
L-21	sain	c	b
L-23	sain	c	
L-24	sain	c	
L-25	sain	c	
L-26	sain	c	
L-27	sain	c	
L-28	sain	c	
L-29	sain	c	
L-32	sain	c	a

Tableau 56 : Résultats de l'amplification du marqueur REN56C20

Chromosome 27 REN56C20			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	
L-22	malade	b	
L-30	malade	b	
L-31	malade	b	
L-33	malade	b	
L-34	malade	b	
L-03	?	b	
L-04	sain	b	
L-05	sain	b	
L-06	sain	b	
L-07	sain	b	
L-08	sain	b	a
L-09	sain	b	
L-10	sain	b	
L-11	sain	b	
L-12	sain	b	
L-13	sain	b	a
L-14	sain	b	a
L-15	sain	b	a
L-16	sain	b	
L-17	sain	b	
L-18	sain	b	a
L-19	sain	b	a
L-21	sain	b	
L-23	sain	b	
L-24	sain	b	a
L-25	sain	b	
L-26	sain	b	
L-27	sain	b	a
L-28	sain	b	
L-29	sain	b	
L-32	sain	b	

Tableau 57 : Résultats de l'amplification du marqueur FH3924 - 3 -

Chromosome 27 FH3924			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	
L-22	malade	a	
L-30	malade	a	c
L-31	malade	a	
L-33	malade	a	
L-34	malade		
L-03	?	b	
L-04	sain	a	b
L-05	sain		
L-06	sain	a	b
L-07	sain	a	b
L-08	sain	a	e
L-09	sain	b	
L-10	sain	b	
L-11	sain	a	b
L-12	sain	a	b
L-13	sain	a	e
L-14	sain	b	d
L-15	sain	d	
L-16	sain		
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	a	b
L-23	sain	a	b
L-24	sain	a	e
L-25	sain	a	b
L-26	sain	a	
L-27	sain	a	d
L-28	sain	a	
L-29	sain	a	e
L-32	sain	a	c

Tableau 58 : Résultats de l'amplification du marqueur PEZ6

Chromosome 27 PEZ6			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	e	f
L-22	malade	e	f
L-30	malade	a	
L-31	malade	e	f
L-33	malade	e	f
L-34	malade		
L-03	?	c	
L-04	sain	e	c
L-05	sain	e	c
L-06	sain	e	c
L-07	sain	e	d
L-08	sain		
L-09	sain	c	d
L-10	sain	e	c
L-11	sain	e	c
L-12	sain	e	d
L-13	sain	e	b
L-14	sain	a	c
L-15	sain	e	a
L-16	sain		
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	c	f
L-23	sain	e	f
L-24	sain	e	b
L-25	sain	e	f
L-26	sain	e	
L-27	sain	a	g
L-28	sain	e	
L-29	sain	e	
L-32	sain	c	d

Tableau 59 : Résultats de l'amplification du marqueur REN100M16

Chromosome 27 REN100M16			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	a	c
L-22	malade	a	c
L-30	malade	a	c
L-31	malade	a	c
L-33	malade	b	c
L-34	malade	b	
L-03	?		
L-04	sain	a	
L-05	sain	a	
L-06	sain	a	
L-07	sain	a	b
L-08	sain	a	
L-09	sain	b	
L-10	sain	a	
L-11	sain	a	
L-12	sain	a	b
L-13	sain	a	
L-14	sain		
L-15	sain	a	
L-16	sain	c	
L-17	sain	a	
L-18	sain	a	
L-19	sain	a	
L-21	sain	c	
L-23	sain	a	c
L-24	sain	a	
L-25	sain	a	
L-26	sain	a	b
L-27	sain	a	c
L-28	sain	a	b
L-29	sain		
L-32	sain	a	c

Tableau 60 : Résultats de l'amplification du marqueur REN181L14

Chromosome 27 REN181L14			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	b	a
L-22	malade	b	a
L-30	malade	b	
L-31	malade	b	a
L-33	malade	b	a
L-34	malade		
L-03	?		
L-04	sain		
L-05	sain		
L-06	sain	b	c
L-07	sain	b	a
L-08	sain		
L-09	sain	a	
L-10	sain		
L-11	sain		
L-12	sain		
L-13	sain		
L-14	sain	a	c
L-15	sain		
L-16	sain		
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	a	c
L-23	sain		
L-24	sain		
L-25	sain	d	
L-26	sain	b	
L-27	sain	b	a
L-28	sain		
L-29	sain		
L-32	sain	b	a

Tableau 61 : Résultats de l'amplification du marqueur REN72K15

Chromosome 27 REN72K15			
Chien	Phénotype	allèle 1	allèle 2
L-02	malade	e	a
L-22	malade	e	a
L-30	malade	e	c
L-31	malade	e	a
L-33	malade	a	c
L-34	malade		
L-03	?		
L-04	sain		
L-05	sain		
L-06	sain	e	c
L-07	sain	e	c
L-08	sain		
L-09	sain	c	d
L-10	sain		
L-11	sain		
L-12	sain		
L-13	sain		
L-14	sain	c	
L-15	sain	e	
L-16	sain		
L-17	sain		
L-18	sain		
L-19	sain		
L-21	sain	a	c
L-23	sain		
L-24	sain		
L-25	sain	e	
L-26	sain	e	c
L-27	sain	e	a
L-28	sain		
L-29	sain		
L-32	sain	e	b

3. Discussion

Après un premier criblage sur le génome de 15 Léonbergs, effectué avec les 246 marqueurs présentés dans le tableau 11, il est apparu que 16 d'entre eux présentent un certain intérêt (tableau 13). En effet, les marqueurs FH3115, REN298N18, REN303C04, REN195B08, C11.873, DGN13, FH3951, REN214L11, FH3221, FH3924, LEI002, C28.176, REN45F03, CPH2, FH2875 et REN94K23 étaient polymorphes pour la population des 15 léonbergs sains et malades que nous avons génotypés. Le chien L-31, qui était malade, était homozygote pour ces 16 marqueurs. L-33, malade, était homozygote pour les 14 marqueurs pour lesquels nous avons eu un résultat c'est-à-dire : FH3115, REN298N18, REN303C04, REN195B08, FH3951, REN214L11, FH3221, FH3924, LEI002, C28.176, REN45F03, CPH2, FH2875 et REN94K23. Le chien L-22, malade, était homozygote pour 15 des 16 marqueurs, et hétérozygote pour le marqueur CPH2. Le chien L-02, malade, était homozygote pour 10 des 16 marqueurs : REN298N18, REN303C04, REN195B08, C11.873, FH3951, FH3221, FH3924, LEI002, CPH2 et REN94K23. Le chien L-30, malade lui aussi était homozygote pour 9 des 16 marqueurs : FH3115, REN303C04, C11.873, DGN13, REN214L11, C28.176, REN45F03, CPH2 et FH2875. Pour chaque marqueur, 3 à 5 des 5 chiens malades de l'échantillon étaient homozygotes pour le même allèle du marqueur.

Il s'agit de :

- l'allèle 230 pour le marqueur FH3115 pour 4 chiens : L-22, 30, 31 et 33,
- l'allèle 186 pour le marqueur REN298N18 pour 4 chiens : L-02, 22, 31 et 33,
- l'allèle 375 pour le marqueur REN303C04 pour les 5 chiens,
- l'allèle 130 pour le marqueur REN195B08 pour 4 chiens : L-02, 22, 31 et 33,
- l'allèle 145 pour le marqueur C11.873 pour 4 chiens : L-02, 22, 30 et 31,
- l'allèle 323 pour le marqueur DGN13 pour 3 chiens : L-22, 30 et 31,
- l'allèle 487 pour le marqueur FH3951 pour 4 chiens : L-02, 22, 31 et 33,
- l'allèle 227 pour le marqueur REN214L11 pour 4 chiens : L-22, 30, 31 et 33,
- l'allèle 189 pour le marqueur FH3221 pour 4 chiens : L-02, 22, 31 et 33,
- l'allèle 355 pour le marqueur FH3924 pour 4 chiens : L-02, 22, 31 et 33,
- l'allèle 130 pour le marqueur LEI002 pour 4 chiens : L-02, 22, 31 et 33,
- l'allèle 187 pour le marqueur C28.176 pour 4 chiens : L-02, 22, 31 et 33,
- l'allèle 273 pour le marqueur REN45F03 pour 3 chiens : L-22, 31 et 33,

- l'allèle 106 pour le marqueur CPH2 pour 4 chiens : L-02, 30, 31 et 33,
- l'allèle 211 pour le marqueur FH2875 pour 4 chiens : L-22, 30, 31 et 33
- l'allèle 248 pour le marqueur REN94K23 pour 4 chiens : L-02, 22, 31 et 33.

Si l'on considère ces allèles comme associés au phénotype de la maladie, il est intéressant de comptabiliser les chiens cliniquement sains de notre échantillon qui étaient homozygotes pour celui-ci. On recense alors :

- 3 cas pour le marqueur FH3115 : L15, 25 et 26,
- 6 cas pour le marqueur REN298N18 : L-06, 14, 21, 26, 27 et 32,
- 6 cas pour le marqueur REN303C04 : L-06, 07, 09, 15, 21 et 27,
- 4 cas pour le marqueur REN195B08 : L-07, 09, 14 et 25,
- 4 cas pour le marqueur C11.873 : L-06, 09, 26 et 27,
- 3 cas pour le marqueur DGN13 : L-06, 15 et 27,
- aucun cas pour le marqueur FH3951,
- 5 cas pour le marqueur REN214L11 : L-06, 07, 09, 25 et 27,
- 2 cas pour le marqueur FH3221 : L-26 et 27,
- 1 cas pour le marqueur FH3924 : L-26,
- 2 cas pour le marqueur LEI002 : L-26 et 27,
- 5 cas pour le marqueur C28.176 : L-07, 21, 26, 27 et 32,
- 8 cas pour le marqueur REN45F03 : L-06, 07, 09, 15, 26, 27 et 29,
- 5 cas pour le marqueur CPH2 : L-09, 14, 15, 25 et 32,
- 4 cas pour le marqueur FH2875 : L-09, 15, 21 et 25,
- 2 cas pour le marqueur REN94K23 : L-07 et 25.

On a remarqué alors que les chiens L-26 et 27 étaient homozygotes pour 8 des 16 marqueurs, L-09 pour 7 marqueurs, L-06, 07, 15 et 25 pour 6 marqueurs, L-21 pour 4 marqueurs, L-14 et 32 pour 3 marqueurs.

En étudiant ces données, il nous a semblé que les marqueurs FH3221, FH3924 et LEI002 possédaient des allèles qui ségréguaient plus volontiers avec le gène impliqué dans la polyneuropathie héréditaire du Léonberg que les autres marqueurs de notre étude. Nous avons donc émis, à partir de ces résultats, l'hypothèse que le gène impliqué dans la polyneuropathie héréditaire du Léonberg pouvait se situer sur le chromosome 27 canin.

Cette hypothèse semblait d'autant plus prometteuse que le chromosome 27 canin possède une zone de synténie avec le chromosome 12 de l'Homme. Or il a été démontré que, sur ce chromosome 12, sont situés des locus de gènes porteurs de mutations responsables de formes de maladie de Charcot-Marie-Tooth. Il s'agit : (39, 81, 108)

- du gène *FGD4* (*FYVE, RhoGEF, and PH domain-containing protein 4*), situé en 12p11.2, responsable de la CMT4H,
- d'un gène non identifié à l'heure actuelle, situé en 12q12-q13.3 responsable de la CMT2C,
- d'un gène non identifié, responsable de la CMT2G, situé lui aussi en 12q12-q13.3, sans que l'on sache encore s'il s'agit d'un seul et unique gène dont des mutations provoquent des formes différentes de CMT ou de 2 gènes très proches,
- du gène *HSPB8* (*heat shock protein beta 8*), situé en 12q24, responsable de la CMT2L.

À la suite de cette hypothèse, nous avons génotypé 15 marqueurs : FH2289, PEZ16, REN304E24, REN173L15, LEI002, REN65A09, C27.502, FH3221, C27.671, REN56C20, FH3924, PEZ6, REN100M16, REN181L14 et REN72K15 situés sur le chromosome 27 du Chien pour 7 nouveaux Léonbergs. Il s'est avéré, à la lecture des résultats que les chiens malades n'étaient pas plus fréquemment homozygotes pour ces marqueurs que les chiens sains. Il n'a donc pas été possible d'associer un allèle du marqueur, pourtant choisi pour son polymorphisme, à l'un des 2 groupes de chiens : atteints ou sains.

Ce résultat décevant a impliqué une étape non prévue initialement dans notre étude. Nous avons eu recours aux 36 autres marqueurs du tableau 12 afin de compléter le criblage du génome. L'objectif fut de combler les lacunes du premier *genome scan*, en particulier l'absence de marqueurs polymorphes sur le chromosome canin CFA6 et un seul marqueur sur le CFA7. Au moment où notre étude s'est arrêtée, cette nouvelle étape non encore finalisée n'avait pas permis de progresser dans la recherche du gène impliqué dans la polyneuropathie héréditaire du Léonberg.

Il semble désormais indispensable, pour progresser dans l'étude génétique de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg, qu'il faille recruter davantage de chiens, et notamment des chiens atteints. En effet, notre étude ne comportait que 6 Léonbergs atteints de polyneuropathie. Sur ce faible nombre de cas, il ne peut pas être exclu qu'un ou plusieurs animaux soient atteints d'une maladie aux symptômes identiques ou très proches. Sans aller aussi loin, il est probable que des individus atteints de la même maladie fassent l'objet de mutations sur des gènes différents, à défaut de mutations différentes d'un même gène. En effet, si la polyneuropathie héréditaire du Léonberg constitue une forme similaire, chez le Chien, de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de l'Homme, et plus particulièrement de la forme AR-

CMT2, autosomique récessive, on peut tout à fait imaginer que l'appellation polyneuropathie héréditaire du Léonberg recouvre autant de diversité que l'appellation CMT. Dans ce cas, on pourrait être confronté à une hétérogénéité génétique responsable d'un même phénotype.

Les formes AR-CMT2, formes axonales autosomiques récessives de CMT, proches de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg ont trois locus identifiés à l'heure actuelle. La forme AR-CMT2A est due à une mutation du gène *LMNA* situé en 1q21. La forme AR-CMT2B est due à une mutation du gène *MED 25* situé en 19q13.3. Le troisième locus, toutefois plus discuté, concerne le gène *GDAP1*, localisé en 8q13-21. Il est considéré comme responsable de formes démyélinisantes de CMT4, mais il semblerait impliqué dans des familles pour lesquelles la CMT de transmission autosomique récessive a un profil électrophysiologique et histologique axonal. Il a été démontré chez l'Homme, qu'il existait des interactions entre le gène *LMNA* et des gènes modificateurs qui affectent son expression ou même la pénétrance de la maladie. Ceci conduit à une variabilité importante des phénotypes, sans doute au sein même d'une famille. Par analogie, la présence de gènes modificateurs d'un gène principal, responsable de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg, pourrait expliquer les variabilités observées dans le phénotype de la maladie. (15, 23, 35, 68, 85, 91, 102)

D'autre part, nous avons effectué une étude d'association, dont le principe est de comparer les résultats d'un groupe de sujets atteints à ceux d'un groupe de témoins sains. Au cours de notre étude, nous avons étudié le pedigree des animaux que nous avions recrutés. Nous nous sommes rendu compte qu'ils appartenaient à la même très large famille. Malheureusement, le pedigree est trop étendu pour être placé en Annexe ici. En effet, grâce aux ADNs fournis par le laboratoire Antagene (6) et à ceux qui ont été récoltés lors de la Nationale d'Élevage de Romorantin en septembre 2007, nous bénéficions maintenant d'un bon nombre de prélèvements de chiens apparentés. Il serait donc intéressant d'analyser les données de génotypage obtenues à l'aide d'une analyse de liaison. Cela permettrait en effet d'exploiter les relations de parenté des chiens, que notre étude d'association n'a pas exploitées. (109)

La polyneuropathie héréditaire du Léonberg est une affection héréditaire qui se transmet selon un mode autosomique récessif et dont les symptômes se déclarent à l'âge adulte. Comme nous l'avons décrit dans la partie II de notre thèse, les premiers symptômes apparaissent entre 1 et 5 ans. Or l'âge moyen de la première mise la reproduction est de 3 ans dans la race Léonberg. Une partie des chiens qui déclarent une polyneuropathie ont donc déjà eu des petits au moment du diagnostic. Il n'est bien sûr pas envisageable de retirer de la reproduction tous les membres de la famille d'animaux malades. Il n'est pas non plus réalisable en élevage de repousser la mise à la reproduction des animaux jusqu'à l'âge de 5 ans afin de connaître le statut du chien. Le seul moyen de limiter la fréquence de l'allèle morbide dans la population de la race est la mise au point d'un test génétique. Cela permettrait de déterminer de façon précoce et certaine le génotype d'un individu vis-à-vis de la

maladie. La connaissance du statut d'un animal permettrait de décider de sa mise à la reproduction ou non, et de choisir de façon judicieuse les partenaires. En effet, un individu porteur sain doit être accouplé avec un homozygote sain. Dans ce cas, tous les chiots de la portée sont phénotypiquement sains. Cinquante pourcents d'entre eux sont génotypiquement hétérozygotes et ne devront à leur tour se reproduire qu'avec des individus homozygotes sains. Peu à peu, en sélectionnant les porteurs sains mis à la reproduction, on pourrait diminuer la fréquence de l'allèle morbide sans perdre les caractéristiques de la lignée qui ont été acquises au fil des ans.

L'élaboration d'un test génétique implique la connaissance du gène impliqué dans la polyneuropathie héréditaire du Léonberg, et son locus. Comme nous l'avons évoqué, la recherche du locus demande le recrutement d'un grand nombre d'animaux, et notamment de chiens malades. Les deux stratégies que nous avons présentées dans la partie II : clonage positionnel et approche « gène candidat » s'affrontent et se complètent dans le but de s'approcher du locus du gène. Il est bien entendu possible de poursuivre la piste que nous avons suivie lors de notre étude, mais il existe d'autres voies. Par exemple, il serait judicieux de tester les régions du génome canin qui correspondent aux gènes du génome humain responsables de formes autosomiques récessives axonales de maladie de Charcot-Marie-Tooth (AR-CMT). Pour commencer, on peut suggérer les gènes suivants : ENSCAFG00000008178 situe sur le chromosome 29, ENSCAFG00000016863 sur le chromosome 7 et un gène du chromosome 1. (45, tableau 10)

CONCLUSION

À l'issue de notre travail, il n'a pas été possible d'identifier le locus du gène impliqué dans la polyneuropathie héréditaire du Léonberg, la mutation qui entraîne la maladie ou encore la nature de la protéine défective. Cet échec pourrait s'expliquer par le faible nombre de cas de chiens malades inclus dans notre étude. On peut aussi émettre l'hypothèse d'une variabilité génotypique de la maladie, sur le modèle de la maladie de Charcot-Marie-Tooth chez l'Homme.

Un recrutement massif de chiens, notamment atteints, associé à un criblage du génome avec des marqueurs plus rapprochés permettra sans doute dans l'avenir d'achever notre travail avec plus de succès. L'objectif final est, chez le Chien, l'obtention d'un test génétique fiable afin de guider les éleveurs dans leur choix lors de la mise à la reproduction des Léonbergs. Mais la connaissance du gène responsable de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg a d'autres implications, notamment la possible découverte d'une nouvelle protéine impliquée dans les polyneuropathies périphériques, non seulement chez le Chien, mais pourquoi pas aussi chez l'Homme. Ceci pourrait ensuite déboucher sur des pistes thérapeutiques innovantes, qu'il s'agisse de traitements conventionnels ou de thérapies émergentes comme la thérapie génique ou acellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. La maladie de Charcot-Marie-Tooth. *Journal de pédiatrie et de puériculture* août 2008, **21** (5-6), 279-280
2. ABITBOL M. *Génétique Moléculaire - Cours de Génétique Moléculaire PCEV2*. Polycopié École Nationale Vétérinaire d'Alfort. Unité pédagogique de Génétique. 2004-2005 156p
3. ABITBOL M. *Génétique et Biologie Moléculaire Paracliniques - Cours de Génétique Moléculaire semestre 7* Polycopié École Nationale Vétérinaire d'Alfort. Unité pédagogique de Génétique. 2006-2007 ENVA 141p
- 4.AITKENS S.G., MCMCRORY M.A., KILMER D.D., BERNAUER E.M. Moderate resistance exercise program: its effect in slowly progressive neuromuscular disease. *Arch. Phys. Med. Rehab.* 1993, **74**, 711-715
5. ALLEMAN A.R. Molecular tools for the diagnosis of animal diseases. *Vet Clin North Am. Small Anim. Pract.* Sept 1996, **26**, 1223-1237
6. Antagene. *Site du laboratoire Antagene* [en ligne], Mise à jour en 2007 [www.antagene.com] (dernière consultation le 10 février 2010)
7. AZZEDINE H., BOLINO A., TAIEB T., BIROUK N., DI DUCA M., BOUHOUCHE A. *et al.* Mutations in MTMR13, a new pseudophosphatase homologue of MTMR2 and Sbf1, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease associated with early-onset glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, **72**, 1141-53
8. BAXTER R.V., BEN OTHMANE K., ROCHELLE J.M., STAJICH J., HULETTE C., DEW-KNIGHT S. *et al.* Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutated in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat. Genet.* 2002, **30**, 21-22
9. BEHSE F., BUCHTHAL F. II. Histological findings in sural nerves. In : *Peroneal muscular atrophy (PMA) and related disorders*. Brain 1977, 100 Pt 1, 67-85
10. BEN OTHMANE K., HENTATI F., LENNON F., BEN HAMIDA C., BLEL S., ROSES A.D. *et al.* Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. *Hum. Mol. Genet.* 1993, **2**, 1625-1628
11. BEN OTHMANE K., ROCHELLE J.M., BEN HAMIDA M., SLOTTERBECK B., RAO N., HENTATI F. *et al.* Fine localization of the CMT4A locus using a PAC contig and haplotype analysis. *Neurogenetics* 1998, **2**, 18-23

12. BEN OTHMANE K., JOHNSON E., MENOLD M., GRAHAM F.L., BEN HAMIDA M., HASEGAWA O. *et al.* Identification of a new locus for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease with focally folded myelin on chromosome 11p15. *Genomics* 1999, **62**, 344-9
13. BERCIANO J., CALLEJA J., COMBAROS O. Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 1994, **44**, 1985-1986
14. BERGHOFF C., BERGHOFF M., LEAL A., MORERA B., BARRANTES R., REIS A. *et al.* Clinical and electrophysiological characteristics of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2B) that maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscular Disorders* 2004, **14**, 301-306
15. BERNARD R., DE SANDRE-GIOVANNOLI A., DELAGUE V., LEVY N. Molecular genetics of autosomal-recessive axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Neuromolecular Med.* 2006, **8**, 87-106
16. BIRD T.D. Hereditary motor-sensory neuropathies: Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Neurol. Clin.* 1989, **7**, 9-23
17. BIROUK N., MAISONOBLE T., LE FORESTIER N., GOUIDER R., LEGER J.M., BOUCHE P. Maladie de Charcot-Marie-Tooth : l'électromyogramme reste utile au diagnostic et à la classification. *Revue neurologique (Paris)* 1997, **153**, 727-736
18. BLOT S. Électrodiagnostic des maladies neuromusculaires. *Point Vét.*, 1991, **23**, 585-595
19. BLOT S. *Neurologie des carnivores domestiques DCEV2*. Polycopié École Nationale Vétérinaire d'Alfort. Unité pédagogique de Médecine des Carnivores Domestiques, 2006, 254p
20. BOERKOEL C.F., TAKASHIMA H., NAKAGAWA M., IZUMO S., ARMSTRONG D., BUTLER I. *et al.* CMT4A : identification of a Hispanic GDAP1 founder mutation. *Ann. Neurol* 2003, **53**, 400-5
21. BOLINO A., BRANCOLINI V., BONO F., BRUNI A., GAMBARDELLA A., ROMEO G. *et al.* Localization of a gene responsible for autosomal recessive demyelinating neuropathy with focally folded myelin sheaths to chromosome 11q23 by homozygosity mapping and haplotype sharing. *Hum. Mol. Genet.* 1996, **5**, 1051-4
22. BOLINO A., MUGLIA M., CONFORTI F.L., LEGUERN E., SALIH M.A.M., GEORGIOU D.M. *et al.* Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat. Genet.* 2000, **25**, 17-19
23. BOUHOUCHE A., BENOMAR A., BIROUK N., MULARONI A., MEGGOUH F., TASSIN J. *et al.* A locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-

Marie-Tooth disease maps to chromosome 1q21.2-q21.3. *Am. J. Hum. Genet.* 1999, **65** (3), 722-727

24. BOWEN J. Electromyography. In : OLIVIER, HOERLEIN, MAYTEW. *Veterinary neurology*. Toronto : WB Saunders company, 1987, 145-169
25. BUFF S, *Amélioration génétique et rationalisation de l'élevage canin. Création et exploitation d'une base de données informatique en race Léonberg*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 1998, n°82, 201p
26. BURNS J., OUVRIER R.A., YIU E.M., JOSEPH P.D., KORNBERG A.J., FAHEY M.C. *et al.* Ascorbic acid for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy trial. *Lancet Neurol.* Juin 2009, **8** (6), 537-44
27. CHANCE P.F. Genetic studies in polyneuropathy. In: CROS D, editor. *Peripheral neuropathy: a practical approach to diagnosis and management*. Philadelphia : Williams & Wilkins, 2001, 280-293
28. CHARCOT J, MARIE P. Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains, *Rev. Med.* 1886, **6**, 97-138
29. CHETLIN R.D., GUTMANN L., TARNOPOLSKY M., ULRICH I.H., YEATER R.A. Resistance training effectiveness in patients with Charcot- Marie-Tooth disease: recommendations for exercise prescription. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 2004, **85**, 1217-1224.
30. CHETLIN R.D., GUTMANN L., TARNOPOLSKY M.A., ULLRICH I.H., YEATER R.A. Resistance training exercise and creatine in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Muscle Nerve* 2004, **30**, 69-76
31. CHOJNOWSKI A. *Myotubularines et maladie de Charcot-Marie-Tooth*. Thèse Méd. Paris V, 2007, n°S01
32. CLARK L.A., TSAI K.L., STEINER J.M., WILLIAMS D.A., GUERRA T., OSTRANDER E.A. *et al.* Chromosome-specific microsatellite multiplex sets for linkage studies in the domestic dog. *Genomics* 2004, **84**, 550-554
33. COATES J.R., O'BRIEN D.P. Inherited peripheral neuropathies in dogs and cats. *Vet. Clin. Small Anim.* 2004, **34**, 1361-1401
34. CUDDON P.A. Acquired canine peripheral neuropathies. *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)*, 2002, **32**, 207-246
35. CUESTA A., PEDROLA L., SEVILLA T., GARCIA-PLANELLS J., CHUMILLAS M.J., MAYORDOMO F. *et al.* The gene encoding ganglioside-induced

differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 2002, **30** (1), 22-25

36. CUESTA M. *Les maladies génétiques du Chat domestique*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2008, 147p
37. DE JONGHE P., TIMMERMAN V., CEUTERICK C., NELIS E., DE VRIENDT E., LOFGREN A. *et al.* The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain* 1999, **122** (Pt 2), 281-90
38. DE SANDRE-GIOVANNOLI A., CHAOUCH M., BOCCACCIO I., BERNARD R., DELAGUE V., GRID D. *et al.* Phenotypic and genetic exploration of severe demyelinating and secondary axonal neuropathies resulting from GDAP1 nonsense and splicing mutations. *J. Med. Genet.* 2003, **40** (7), e87
39. DE SANDRE-GIOVANOLI A., DELAGUE V., HAMADOUCH T., CHAOUCH M., KRAHN M., BOCCACCIO I. *et al.* Homozygosity mapping of autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT4H) to a novel locus on chromosome 12p11.21-q13.11. *J. Med. Genet.* 2005, **42**, 260-265
40. DUBOURG O. Charcot-Marie-Tooth: from phenotype to genotype. *Rev. Neurol.* 2004, **160**, 1221-1229.
41. DUBOURG O., AZZEDINE H., VERNY C., DUROSIER G., BIROUK N., GOUIDER R. *et al.* Autosomal recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006, **8**, 75-86
42. DYCK P.J. Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory and autonomic neurons. In : DYCK P.J. *Peripheral Neuropathy*. 1975, 825-867
43. DYCK P.J., CHANCE P., LEBO R., CARNEY J.A. Hereditary motor and sensory neuropathies. In : DYCK P.J., THOMAS P.K., editors. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia : WB Saunders, 1993, 1094-1136
44. EGGEN A. Cartographie fine d'un gène et clonage positionnel. *INRA Prod. Anim.*, 2000, Hors série : « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 133-136
45. Ensembl. *Site de base de données de gènes [en ligne]*, Mise à jour en septembre 2009 [www.ensembl.org] (dernière consultation le 25 février 2010)
46. EYMARD B. et les neurologues du groupe de la Pitié-Salpêtrière. *Neuropathologie DCEM2-DCEM3* Polycopié Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 2000, 83p

47. FUHRER L. Les Examens complémentaires dans les syndromes neuromusculaires. Électrodiagnostic et biopsie musculaires et nerveuses. *Point Vét.*, 1996, **27** (172), 823-832
48. GRANDIS M., SHY M., Current therapy for Charcot-Marie-Tooth disease, *Curr. Treat. Options Neurol.*, 2005, **7**, 23-31
49. GRIFFIN J.W., KIDD G., TRAPP B.D. Interactions between axons and Schwann cells. In : DYCK P.J., THOMAS P.K., editors. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia : WB Saunders, 1993, 317-30
50. GROSLAMBERT E. *Électrodiagnostic appliqué aux affections neuromusculaires en pratique canine*. Thèse Méd. Vét., Lyon, 1990, n°80, 140 p
51. GUILBOT A. A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum. Mol. Genet.* 2001, **10**, 415-21
52. HARDING A.E. From the syndrome of Charcot, Marie and Tooth to disorders of peripheral myelin proteins. *Brain* 1995, **118**, 809-818
53. HARDING A.E., THOMAS P. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 1980, **103** (2), 259-80
54. HAUGE J.G., DODDS J., WOMACK J.E. Molecular genetics, gene transfer and therapy. *Adv. med. vet.* 1997, **40**, 1-49
55. HAYASAKA K., TAKADA G., IONASESCU V.V. Mutation of the myelin P0 gene in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B. *Hum. Mol. Genet.* 1993, **2** (9), 1369-72
56. HAYASAKA K., HIMORO M., SATO W., TAKADA G., UYEMURA K., SHIMIZU N. *et al.* Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat. Genet.* 1993, **5**(1), 31-4
57. HEBERT F. *Guide pratique de Médecine interne canine et feline*, 2^e édition, Méd'com, 2006, 576p
58. HOULDEN H., REILLY M.M. Molecular genetics of autosomal-dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006, **8**, 43-62
59. International Leonberger Database : <http://ileodata.com/> dernière consultation le 15 février 2010
60. KALAYDJIEVA L., HALLMAYER J., CHANDLER D., SAVOV A., NIKOLOVA A., ANGELICHEVA D. *et al.* Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nat. Genet.* 1996, **14**, 214-17

61. KALAYDJIEVA L., GRESHAM D., GOODING R., HEATHER L., BAAS F., DE JONGHE P. *et al.* N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Nat. Genet.* 2000, **67**, 47-58
62. KAPLAN J.C., DELPECH M. *Biologie moléculaire et médecine*, 2e éd. Flammarion, 1996, 790p
63. KHAJAVI M., SHIGA K., WISZNIEWSKI W., HE F., SHAW C.A., YAN J. *et al.* Oral Curcumin Mitigates the Clinical and Neuropathologic Phenotype of the Trembler-J Mouse : A Potentiel Therapy for Inherited Neuropathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2007, **81**, 438-453
64. KILMER D.D., MCCRORY M.A., WRIGHT N.C.,AITKENS S.G., BERNAUER E.M. The effect of a high resistance exercise program in slowly progressive neuromuscular disease. *Arch. Phys. Med. Rehab.* 1994, **75**, 560-563
65. KOENIG H.L., SCHUMACHER M., FERZAZ B., THI A.N., RESSOUCHES A., GUENNOUN R. *et al.* Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 1995, **268**, 1500-1503
66. KWON J.M., ELLIOTT J.L., YEE W.C., IVANOVICH J., SCAVARDA N.J., MOOLSINTONG P.J. *et al.* Assignment of a second Charcot-Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q. *Am. J. Hum. Genet.* 1995, **57**, 853-858
67. LAMBERT E.H. *Clinical examinations in neurology*. Mayo Clinic, Philadelphia : WB Saunders, 1956 : 287-317
68. LEAL A., MORERA B., DEL VALLE G., HEUSS D., KAYSER C., BERGHOFF M. *et al.* A second locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 19q13.3. *Am. J. Hum. Genet.* 2001, **68** (1), 269-274
69. Leonberger dogs database, *Site de base de données de la race Léonberg* [en ligne], Mise à jour le 24 mars 2002 [www.leonbergerdatabase.com/] (dernière consultation le 15 février 2010)
70. LIDBLAD-TOH K., WADE C.M., MIKKELSEN T.S., KARLSSON E.K., JAFFE D.B., KAMAL M., *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 2005, **438**, 803-819
71. LUPSKI J.R., DE OCA-LUNA R.M., SLAUGENHAUPT S., PENTAO L., GUZZETTA V., TRASK B.J. *et al.* DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991, **66**, 219-232
72. MARROSO M.G., VACCARGIU S., MARROSO G., VANNELLI A., CIANCHETTI C., MUNTONI F. Charcot-Marie-Tooth disease type 2 associated with mutation of the myelin protein zero gene. *Neurology* 1998, **50** (5), 1397-401

73. MATSUNAMI N., SMITH B., BALLARD L., LENSCHE M.W., ROBERTSON M., ALBERTSEN H. *et al.* Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nat. Genet.* 1992, **1**, 176-179
74. MCPHERSON E. Genetic Diagnosis and Testing in Clinical Practice *Clinical Medicine & Research*, 2006, **4** (2), 123-129
75. MERSIYANOVA I.V., PEREPELOV A.V., POLYAKOV A.V., SITNIKOV V.F., DADALI E.L., OPARIN R.B. *et al.* A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2000, **67** (1), 37-46
76. MICALLEF J., ATTARIAN S., DUBOURG O., GONNAUD P.M., HOGREL J.Y., STOJKOVIC T. *et al.* Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2009, **8** (12), 1103-10
77. Myoinfo : Zoom sur la recherche dans les maladies de Charcot-Marie-Tooth, *Myoinfo AFM*, juin 2009
78. NCBI : Site du centre national d'information sur les biotechnologies [en ligne], Mise à jour le 28 février 2010 [www.ncbi.nlm.nih.gov/] (dernière consultation le 28 février 2010)
79. NELIS E., VAN BROECKHOVEN C., DE JONGHE P., LOFGREN A., VANDENBERGHE A., LATOUR P. *et al.* Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies : a European collaborative study. *Eur. J. Hum. Genet.* 1996, **4**, 25-33
80. NELIS E., ERDEM S., VAN DEN BERGH P.Y., BELPAIRE-DETHIOU M.C., CEUTERICK C., VAN GERWEN V. *et al.* Mutations in GDAP1 : autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology* 2002, **59**, 1865-72
81. NELIS E., BERCIANO J., VERPOORTEN N., COEN K., DIERICK I., VAN GERWEN V. *et al.* Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2G) maps to chromosome 12q12-q13.3 *J. Med. Genet.* 2004, **41**, 193-197
82. OMIM Site de génétique mendélienne chez l'Homme [en ligne], Mise à jour le 28 février 2010 [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM] (dernière consultation le 28 février 2010)
83. OSTRANDER E.A., KRUGLYAK L. Unleashing the canine genome. *Genome Res.* 2000, **10**, 1271-1274

84. PASSAGE E., NORREEL J.C., NOACK-FRAISSIGNES P., SANGUEDOLCE V., PIZANT J., THIRION X. *et al.* Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease, *Nat. Med.*, 2004, **10**, 396-401
85. PATTERSON N. Leonberger polyneuropathy update, mars 2006, placé en Annexe 3
86. POUGET J. Diagnostic moléculaire des neuropathies héréditaires de type Charcot-Marie-Tooth. *Rev. Neurol. (Paris)* 2004, **160** (2), 181-187
87. PRITCHARD J.K., STEPHENS M., ROSENBERG N.A., DONNELLY P. Association mapping in structured populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2000, **81**, 559-575
88. RAEYMAEKERS P., TIMMERMAN V., NELIS E., DE JONGHE P., HOOGENDUK J.E., BAAS F. *et al.* Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT1A). *Neuromusc. Disord.* 1991, **1**, 93-97
89. REILLY M.M. Genetically determined neuropathies. *J. Neurol.*, 1998, **245**, 6-13.
90. REILLY M.M. Classification of the hereditary motor and sensory neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* 2000, **13** (5), 561-4
91. RICHE C. *La polyneuropathie héréditaire du Léonberg : caractérisation clinique, électromyographique et génétique*. Thèse Méd. Vét, Alfort, 2006, 115p
92. ROBIN S., TACHER S., RIMBAULT M., VAYSSE A., DREANO S., ANDRE C. *et al.* Genetic diversity of canine olfactory receptors. *BMC Genomics* 2009, **10**, 21
93. ROGERS A. *Site de l'Union Internationale des Léonbergs*, [En ligne] mise à jour le 11 février 2010 [www.leonbergerunion.com/Symptomspnfr.htm] (dernière consultation le 19 janvier 2010) d'après Dr. Paul Treichler et Dr Cord Drögemüller, Institut de génétique, Université de Berne
94. ROSSIGNOL J.L. *Gènes et génome*. Dunod, 2004, 232p
95. SABIN T. Generalized peripheral neuropathy: symptoms, signs and syndromes. In: CROS D, editor. *Peripheral neuropathy: a practical approach to diagnosis and management*. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2001, 3-19.
96. SAHENK Z., NAGARAJA H.N., MCCRACKEN B.S., KING W.M., FREIMER M.L., CEDARBAUM J.M. *et al.* NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients. *Neurology*, 2005, **65**, 681-689
97. SAID G. Étude des fibres nerveuses isolées dans les névrites hypertrophiques primitives. *Rév. Neurol.* 1976, **132**, 467-480

98. SAIFI G.M., SZIGETI K., SNIPES G.J., GARCIA C.A., LUPSKI J.R. Molecular mechanisms, diagnosis, and rational approaches to management and therapy for Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J. Investig. Med.*, 2003, **51**, 261-283
99. SANDROCK A. Neurotrophic factors: biological properties and their potential as therapeutic agents for peripheral neuropathy. In: CROS D, editor. *Peripheral neuropathy: a practical approach to diagnosis and management*. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2001, 235- 263.
100. SENDEREK J., BERGMANN C., STENDEL C., KIRFEL J., VERPOORTEN N., DE JONGHE P. et al. Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, **73**, 1106-19
101. SEREDA M.W., MEYER ZU HORSTE G., SUTER U., UZMA N., NAVÉ K.A. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT1A), *Nat. Med.*, 2003, **9**, 1533-1537
102. SHELTON D., PODELL M., PONCELET L., SCHATZBERG S., PATTERSON E., POWELL H.C. et al. Inherited polyneuropathy in Leonberger dogs : a mixed or intermediate form of Charcot-Marie-Tooth disease? *Muscle Nerve*, 2003, **27**, 471-477
103. SHELTON D. Peripheral Neuropathy/Laryngeal Paralysis In The Leonberger, *LCA Family Affair*, 2006, 83-85
104. SHY ME. Charcot-Marie-tooth disease: an update. *Curr. Opin. Neurol.*, 2004, **17**, 579-585.
105. SNIPES G.J., SUTER U., WELCHER A.A., SHOOTER E.M. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP22/SR13). *J. Cell. Biol.* 1992, **117**, 225-238
106. STRAMER M., SIBRIJNS H. *Site de l'Union Internationale des Léonbergs* [En ligne] mise à jour le 11 février 2010 [www.leonbergerunion.com/LPNfr.htm] (dernière consultation le 28 février 2010)
107. SZIGETI K., LUPSKI J.R. Charcot-Marie-Tooth disease. *European Journal of Human Genetics* 2009, **17**, 703-710
108. TANG B.S., LUO W., XIA K., XIAO J.F., JIANG H., SHEN L. et al. A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2L) maps to chromosome 12q24. *Hum. Genet.* 2004, **114**, 527-533
109. TEARE D., BARRETT J.H. Genetic linkage studies. *The lancet* 2005, **366** (9490), 1036-1044

110. TOOTH H. *The peroneal type of progressive muscular atrophy*. Thèse Méd. Angleterre, Université de Cambridge, 1886
111. VANBELLE P. Intérêt du modèle canin en thérapie génique. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2008, 205p
112. VERHAMME C., DE HAAN R.J., VERMEULEN M., BAAS F., DE VISSER M., VAN SCHAIK I.N. Oral high dose ascorbic acid treatment for one year in young CMT1A patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *BMC Med.* 2009, **7** (1), 70
113. VERNY C. *Etude des gènes candidats par fonction dans les formes autosomiques récessives et démyélinisantes de maladie de Charcot-Marie-Tooth*. Thèse Méd., Angers, 2000, n°1076
114. VINCI P., ESPOSITO C., PERELLI S.L., ANTENOR J.V., THOMAS F.P. Overwork weakness in Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch. Phys. Med. Rehab.* 2003, **84**, 825-827
115. WHEELER S. *Manuel of small animal neurology*. 2nd Ed. Cheltenham : Brit. Small. An. Vet. Ass., 1995, 256p
116. WILLIAMS L., O'DOUGHERTY M.M., WRIGHT F.S., BOBULSKI R.J., HORROCKS L.A. Dietary essential fatty acids, vitamin E, and Charcot-Mary-Tooth disease. *Neurology*, 1986, **36**, 1200-1205
117. Worldwide Independent Leonberger Database [En ligne] mise à jour du 23 février 2010 [www.leonberger-database.com/pp_search.htm] (dernière consultation le 28 février 2010)
118. YOUNG P., SUTER U. Disease mechanisms and potential therapeutic strategies in Charcot-Marie-Tooth disease, *Brain Res. Rev.*, 2001, **36**, 213-221.
119. ZHAO C., TAKITA J., TANAKA Y., SETOU M., NAKAGAWA T., TAKEDA S. et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell.* 2001, **105** (5), 587-97
120. ZUCHNER S., VANCE J.M. Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006, **8**, 63-74

- Annexe 1 : Tableau récapitulatif des Léonbergs inclus dans notre étude

N° du Léonberg	Date de naissance	Sexe	Statut	Source	Suivi
L-01	04/03/1997	M	A	ENVA	DCD
L-02	20/08/2001	F	A	ENVA	
L-03	27/12/2002	F	inconnu	ENVA	DCD tumeur 2004
L-04	05/04/2002	M	S	ENVA	en vie 2007
L-05	05/04/2002	F	S	ENVA	en vie 2007
L-06	13/12/1998	F	S	ENVA	en vie 2007
L-07	18/08/1995	F	S	ENVA	
L-08	10/01/2001	F	S	ENVA	en vie 2007
L-09	06/08/1998	M	S	ENVA	en vie 2007
L-10	20/08/2001	M	S	ENVA	
L-11	20/08/2001	F	S	ENVA	
L-12	17/02/2001	F	S	ENVA	en vie 2007
L-13	31/01/2001	M	S	ENVA	DCD anévrisme 2006
L-14	14/01/2000	F	S	ENVA	
L-15	28/11/1997	F	S	ENVA	
L-16	05/06/2001	F	S	ENVA	
L-17	04/07/2002	F	S	ENVA	
L-18	04/07/2002	F	S	ENVA	
L-19	09/04/2003	F	S	ENVA	
L-20 = L02	20/08/2001	F	A	ENVA	
L-21	24/08/2001	M	S	ENVA	DCD torsion estomac
L-22	02/08/1999	M	A	ENVA	DCD tumeur
L-23	03/02/2003	F	S	ENVA	
L-24	01/01/2001	F	S	ENVA	
L-25	06/08/1998	M	S	ENVA	
L-26	10/03/1997	M	S	ENVA	DCD
L-27	05/09/2000	M	S	ENVA	DCD 2006
L-28	10/08/1995	F	S	Extérieur	
L-29	10/01/2001	M	S	ENVA	en vie 2007
L-30	07/07/1997	M	A	Extérieur	

L-31	20/02/2003	M	A	ENVA	DCD
L-32	13/06/1999	F	S	ENVA	DCD 2006 leishmaniose
L-33	20/02/2003	M	A	ENVA	
L-34	01/05/2001	M	A	Dr Granger	
L-35	26/03/2004	F	S	ENVA	
L-36	17/06/2005	F	S	ENVA	
L-37	19/06/1999	M	S	Extérieur	
L-38	09/10/1998	F	S	Extérieur	
L-39	20/02/2003	M	S	Extérieur	
L-40	05/09/2000	F	S	Antagene	
L-41	10/08/1995	F	S	Antagene	
L-42	27/12/2002	F	S	Antagene	
L-43	20/08/2001	F	A	Antagene	en vie 2007
L-44	10/01/2001	F	S	Antagene	
L-45	25/04/2001	M	S	Antagene	
L-46	10/01/2001	M	S	Antagene	
L-47	02/08/2001	F	S	Antagene	
L-48	05/06/2001	M	S	Antagene	
L-49	19/04/2002	M	S	Antagene	
L-50	14/10/2000	M	S	Antagene	
L-51	13/12/1998	M	S	Antagene	
L-52	31/12/2003	F	S	Antagene	
L-53	27/07/2005	F	S	ENVA	
L-54	05/05/2002	F	S	ENVA	
L-55	22/10/2005	F	S	ENVA	
L-56	22/10/2005	F	S	ENVA	
L-57	20/05/2005	M	S	ENVA	
L-58	14/05/2002	M	S	Extérieur	
L-59	11/03/2006	M	S	Extérieur	
L-60	06/05/2003	F	A	ENVA	
L-61	10/09/1997	M	S	ENVL	
L-62	?	?	S	Dr Granger	
L-63	?	?	S	Dr Granger	
L-64	?	?	S	Dr Granger	
L-65	9 ans	M	A	Dr Granger	
L-66	?	?	S	Dr Granger	
L-67	5 ans	M	A	Dr Granger	
L-68	?	?	S	Dr Granger	
L-69	?	?	S	Dr Granger	
L-70	?	?	S	Dr Granger	
L-71	?	?	S	Dr Granger	
L-72	?	?	S	Dr Granger	
L-73	?	?	S	Dr Granger	

L-74	?	?	S	Dr Granger	
L-75	?	?	S	Dr Granger	
L-76	?	?	S	Dr Granger	
L-77	?	?	S	Dr Granger	
L-78	?	?	S	Dr Granger	
L-79	?	?	S	Dr Granger	
L-80	2001	M	S	ENVA	
L-81	2 ans	M	S	Dr Granger	
L-82	27/08/2004	F	S	ENVA	
L-83	23/03/2006	F	S	ENVA	
L-84	09/03/2006	M	S	ENVA	
L-85	26/07/1998	F	S	ENVA	

Légende :

M : mâle

F : femelle

S : sain

A : atteint de polyneuropathie héréditaire

ENVA : École Nationale Vétérinaire d'Alfort

Extérieur: prélèvement sanguin adressé par un confrère exerçant en clientèle privée

Dr Granger : prélèvement sanguin provenant de Cambridge

Antagene : prélèvement buccal provenant du laboratoire Antagene

ENVL : École Nationale Vétérinaire de Lyon

DCD : animal décédé

Les chiens de la première cohorte, génotypés dans notre étude, sont indiqués en gras.

Par la suite, les prélèvements sanguins de 20 chiens ont été obtenus grâce à une collaboration avec le Dr. Nicolas Granger (Université de Cambridge) et les prélèvements buccaux de 13 chiens sains grâce à une collaboration avec le laboratoire Antagene (6). Enfin, l'École Nationale Vétérinaire de Lyon a envoyé un prélèvement sanguin.

Les 31 prélèvements issus de chiens sains, récoltés lors d'une Nationale d'élevage de la race le 8 septembre 2007 ne sont pas indiqués dans ce tableau.

- Annexe 2 : Protocole du kit « Genomi Phi V 2 Amplification kit » (GE Healthcare)

4. Product description

4.1 The basic principle

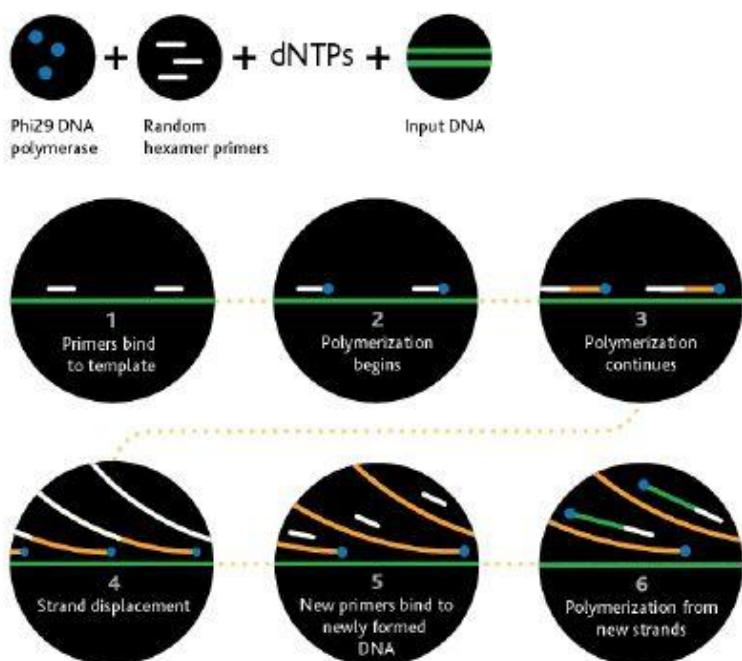


Figure 1 Overview of the GenomiPhi HY DNA Amplification Kit procedure

Figure 1 shows an overview of whole genome amplification by isothermal strand displacement using the **GenomiPhi HY DNA Amplification Kit**. DNA is briefly heat-denatured then cooled in sample buffer containing random hexamers that non-specifically bind to the DNA. A master-mix containing DNA polymerase, additional random hexamers, nucleotides, salts and buffers is added and isothermal amplification proceeds at 30°C for 4 hours. After amplification the enzyme is heat inactivated during 10 minute incubation at 65°C.

4.2 Kit specifications

Typical amplification kinetics with **GenomiPhi HY DNA Amplification Kit** is shown in Figure 2 below. Microgram quantities of DNA are generated from nanogram amounts of starting material in only a few hours. Typical DNA yields from a **GenomiPhi HY DNA Amplification Kit** reaction are 45 µg per 50 µl reaction with an average product length of greater than 10 kb. DNA replication is extremely accurate due to the proofreading 3'- 5' exonuclease activity of the DNA polymerase (3, 4). Amplification reactions are generally complete in 3-4 h, yielding approximately 45 µg DNA. Reactions containing no DNA will produce the same amount as with DNA reactions.

5. Protocols

5.1. Short Protocol

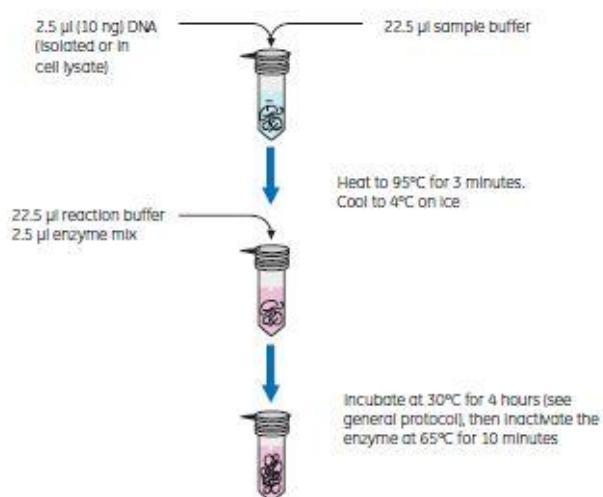


Figure 4 Schematic representation of GenomiPhi HY DNA Amplification Kit protocol.

5.2 General Protocol

The steps outlined below describe a general protocol for amplifying template DNA. This protocol should be considered a starting point for optimizing the reaction in your laboratory.

1 Mix sample buffer with template DNA

Add 22.5 μ l Sample Buffer to 2.5 μ l of 10 ng template DNA.

22.5 μ l Sample Buffer

Template DNA should be resuspended in TE or water.

2.5 μ l DNA Template (10 ng)

2 Denature template DNA

Heat the samples to 95°C for 3 minutes then cool to 4°C on ice.

95°C
for 3 minutes

Heating the DNA for longer than 3 minutes or at higher temperatures can cause damage to the DNA.

- 3 Prepare the master mix for each amplification reaction**
 For each amplification reaction, on ice combine 22.5 µl of Reaction Buffer with 2.5 µl of Enzyme Mix.
-  Prepare the master mix only in sufficient quantities and immediately prior to use. Keep the master mix on ice and discard any unused portion. The master mix contains all the components required for DNA amplification and will generate amplification products if exposed to temperatures > 4°C for sufficient time.
-
- 4 Transfer master mix to cooled sample.**
 Add 25 µl of prepared master mix from Step 3 to each cooled sample, on ice.
- | |
|---------------------|
| 25 µl
Master Mix |
|---------------------|
-
- 5 Incubate for DNA amplification.**
 Incubate the samples at 30°C for 4 hours.
- | |
|---------------------|
| 30°C
for 4 hours |
|---------------------|
-
- 6 Phi29 DNA polymerase enzyme.**
 Heat the samples to 65°C for 10 minutes then cool to 4°C.
-  Heating is required to inactivate the exonuclease activity of the DNA polymerase which would otherwise begin to degrade the amplification product.
- | |
|------------------------|
| 65°C
for 10 minutes |
|------------------------|
-
- 7 Storage of amplified material.**
 Store amplification reactions at -20°C.
-  GenomPhi DNA HY amplification products should be stored and treated as genomic DNA.
- Due to the viscosity of the amplification product, dilution in 2 volumes of TE can ease handling. Mix amplification products thoroughly after freezing and thawing.

5.3 Chemical denaturation of template DNA

The steps outlined below describe a general protocol for amplifying template DNA.

-
- 1 Prepare denaturation and neutralization buffers.**

Denaturation Buffer

400 mM KOH
 10 mM EDTA

Neutralization Buffer

200 mM HCl
 300 mM Tris-HCl, pH 7.5

2	Denature template DNA Mix 2.5 μ l of template (10 ng total) with 2.5 μ l of Denaturation Buffer at room temperature. Incubate for 3 minutes.	2.5 μ l of DNA + 2.5 μ l Denaturation Buffer
	 Mix by pipetting up and down. Do not vortex.	RT for 3 min
3	Neutralize DNA solution. Add 5 μ l of Neutralization Buffer.	5 μ l Neutralization Buffer
	 Mix by pipetting up and down. Do not vortex.	
4	Prepare the master mix for each amplification reaction For each amplification reaction, on ice combine 15 μ l of Sample Buffer and 22.5 μ l of Reaction Buffer, with 2.5 μ l of Enzyme Mix.	
	 Prepare the master mix only in sufficient quantities and immediately prior to use. Keep the master mix on ice and discard any unused portion. The master mix contains all the components required for DNA amplification and will generate amplification products if exposed to temperatures > 4°C for sufficient time.	
5	Transfer master mix to cooled sample. Add 40 μ l of prepared master mix from Step 4 to each cooled sample, on ice.	40 μ l Master Mix
6	Incubate for DNA amplification. Incubate the samples at 30°C for 4 hours.	30°C for 4 hours
7	Phi29 DNA polymerase enzyme. Heat the samples to 65°C for 10 minutes then cool to 4°C.	65°C for 10 minutes
	 Heating is required to inactivate the exonuclease activity of the DNA polymerase which would otherwise begin to degrade the amplification product.	
8	Storage of amplified material. Store amplification reactions at -20°C.	
	 GenomiPhi DNA HY amplification products should be stored and treated as genomic DNA.	
	Due to the viscosity of the amplification product, dilution in 2 volumes of TE can ease handling. Mix amplification products thoroughly after freezing and thawing.	

5.4 Quantitation of amplification products

Quantification is generally not required as every reaction will yield approximately the same amount of DNA. **Quanti-iT™ PicoGreen® dsDNA quantitation reagent** (Invitrogen, P7581) is recommended if accurate quantitation is required.



Quantitation of non-purified amplification products by UV absorption will generate inaccurate results due to the presence of unused hexamers in the completed reaction.

1 Prepare TE buffer.

Dilute the concentrated TE buffer included in the kit to 1x concentration using water.

Dilute 1:20



Use only sterile, distilled, DNase free water when preparing the dilution to ensure accurate quantitation.

2 Prepare 1:25 dilution of PicoGreen reagent.

Determine the required volume of a 1:25 dilution of PicoGreen reagent.

- Volume = $100 \mu\text{l}/\text{sample} \times \# \text{ of samples}$
Determine the volume of stock PicoGreen reagent necessary to produce the required volume of a 1:25 dilution

- Volume = $\frac{\text{volume of required dilution}}{25}$



Reagent adsorbs to glass surfaces. Use plasticware only. Protect the solution from light at all times.

3 Prepare the λ DNA standard curve.

Dilute the λ DNA standard supplied in the kit to a **10 ng/ μl** working solution. Use this working stock to prepare a standard curve (see below). **Add 100 μl** of each dilution to each well of the assay plate.

Standard Number	λ DNA (10 ng)	λ DNA (10 ng/ μl)	1x TE
1	600	60 μl	40 μl
2	500	50 μl	50 μl
3	400	40 μl	60 μl
4	200	20 μl	80 μl
5	100	10 μl	90 μl
6	50	5 μl	95 μl
7	25	2.5 μl	97.5 μl
8	0	0 μl	100 μl

- 4 Dilute the GenomiPhi HY amplification products twice.**
- Dilute the GenomiPhi HY amplification products 1:4 by adding 150 µl of 1x TE to each amplification reaction.
- Dilute the 1:4 dilution in a separate tube by adding 10 µl of 1:4 dilution to 90 µl of 1x TE.
-  Due to the viscosity of the amplification product, mix amplification products thoroughly by vortexing heavily.
-
- 5 Add diluted GenomiPhi amplification products to the assay plate.**
- Aliquot 90 µl of 1x TE into each sample well. Add 10 µl of diluted sample for a final volume of 100 µl.
-  Because the amplification product is diluted before the assay, the dilution factor must be taken into consideration when calculating total yields.
-
- 6 Add diluted PicoGreen to sample wells.**
- Add 100 µl of the 1:25 dilution of PicoGreen to all wells containing standards and samples. Mix contents well by pipetting up and down.
- Seal the plate with foil and spin in microplate centrifuge for 1 minute at < 200 x g to eliminate bubbles.
-  Protect plate from light at all times. The plate must be read 5-10 min after addition of PicoGreen reagent to ensure accurate quantitation.
-
- 7 Measure the sample fluorescence.**
- Place the sample assay plate into a fluorescence microplate reader.
- Set the fluorescence reader at the following parameters:
- Excitation wavelength: **480 nm**
 - Emission wavelength: **520 nm**
 - Gain: **Optimal**
-  If it is not possible to set the instrument gain to optimal, find a way to have the instrument read the sample where the highest DNA concentration generates readings that fall within the linear dynamic range of the instrument.

8 Calculate the concentration of the amplification product.

Correct the data by subtracting the value obtained for the blank from that of each of the samples.

Generate a standard curve of fluorescence versus DNA concentration using the corrected data.

Determine the concentration of GenomiPhi HY Kit amplified products from the equation of the line derived from the standard curve.

- **Annexe 3 : PATTERSON N. Leonberger's polyneuropathy update, mars 2006**

We now have medical data for 242 Leonbergers and DNA for 150 of those individuals. At this time we have a ratio of 3-1 of affected males to females. We have tested 98 X-chromosome markers and so far none are significantly associated with the disease. Many dogs show signs of the disease by 3 years of age, however, we have now a number of dogs previously indicated as being unaffected with a change to a diagnosis of affected, because in some dogs the signs do not first occur until after 6 years of age. We now have 7 confirmed cases and 4 possible cases where there were no signs of the disease until after 6 years of age.

Due to the change in diagnosis for a number of dogs, we are now re-analyzing the data with the new diagnostic information for x-linked recessive inheritance and since more females have now been detected, we are also analyzing for x-linked dominant inheritance. In addition we are going to test 2-3 markers near genes that have been documented for Charcot-Marie-Tooth disease in people that are not on the dog X chromosome. We anticipate finishing this analysis (X chromosome plus 5-10 additional areas) by the end of the year. We have enough internal funds to finish this analysis.

If this planned analysis does not find an associated marker, the next step will be a whole genome scan (testing 300-400 markers spread out on all 38 dog chromosomes). There is some evidence that estrogen has a protective effect on myelin which could possibly explain the gene potentially being on an autosome (not a sex chromosome) and still having more affected males than females. The cost of a whole genome scan would be in the range of \$30,000-50,000 and we would plan on submitting a funding proposal to the Canine Health Foundation or the Morris Animal Foundation in late 2006 or early 2007 if necessary. If the current analysis finds a linked (associated) marker we would develop a screening marker test and start to try to sequence the actual gene.

More samples from affected dogs and related non affected are needed to confirm any positive findings and to add power to the study. We continue to collaborate with Dr. Diane Shelton for the diagnosis and we thank everyone for their participation and response to our renewed efforts at getting more DNA samples and medical information.

RECHERCHE DU GÈNE IMPLIQUÉ DANS LA POLYNEUROPATHIE HÉRÉDITAIRE DU LÉONBERG

VIALLET-LE BORGNE-GODENER Claire, Marion

Résumé

La polyneuropathie héréditaire du Léonberg est une maladie neurologique d'apparition progressive. Elle est due à une dégénérescence axonale à prédominance distale et rétrograde, accompagnée d'une démyélinisation secondaire et se caractérise par des symptômes non spécifiques de polyneuropathie périphérique. Cette maladie génétique, qui se transmet selon un mode autosomique récessif, constitue un modèle de la maladie de Charcot-Marie-Tooth chez l'Homme.

Après une étude bibliographique de la maladie de Charcot-Marie-Tooth chez l'Homme, puis de la polyneuropathie héréditaire du Léonberg, nous présenterons notre étude génétique réalisée sur 32 chiens de race Léonberg.

La découverte du gène impliqué pourrait conduire à l'obtention d'un test génétique permettant d'établir le génotype des Léonbergs, de compléter la connaissance de la physiopathologie des polyneuropathies du Chien et de l'Homme et d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques dans les deux espèces.

Mots clés : GENETIQUE, MALADIE GENETIQUE, MALADIE HEREDITAIRE, MALADIE NEUROLOGIQUE, POLYNEUROPATHIE, MALADIE DE CHARCOT-MARIE-TOOTH, RACE CANINE, CARNIVORE, CHIEN, LEONBERG, HOMME.

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Abitbol M.

Assesseur : Pr. Blot S.

Adresse de l'auteur :

Mme Claire Godener
6 rue Ernest Renan
94 700 Maisons Alfort

SEARCH OF A GENE INVOLVED IN LEONBERGER'S HEREDITARY POLYNEUROPATHY

VIALLET-LE BORGNE-GODENER Claire, Marion

Summary

Leonberger's hereditary polyneuropathy is a neurological disease of gradual onset. It is due to axonal degeneration, predominantly distal and retrograde, accompanied by secondary demyelination. It is characterized by nonspecific symptoms of peripheral polyneuropathy. This genetic disease which has an autosomic recessive mode of transmission, may be regarded as a model of Charcot-Marie-Tooth's disease in Humans.

After a review of the literature on Charcot-Marie-Tooth's disease in humans and on Leonberger's hereditary polyneuropathy, we present our genetic study conducted on 32 Leonberger dogs.

Discovery of the gene involved could lead to the development of a genetic test to identify Leonberger genotypes, to complete our understanding of the pathophysiology of neuropathies in Dogs and Humans, and to consider new therapeutic approaches in the two species.

Keywords : GENETIC, GENETIC DISEASE, HEREDITARY DISEASE, NEUROLOGIC DISEASE, POLYNEUROPATHY, CHARCOT-MARIE-TOOTH'S DISEASE, CANINE, DOG, LEONBERGER, HUMAN

Jury :

President : Pr.

Director : Dr. Abitbol M.

Assessor : Pr. Blot S.

Author's address:

Mme Claire Godener
6 rue Ernest Renan
94 700 Maisons Alfort