

Année 2017



**ÉTUDES GÉNÉTIQUE ET MOLÉCULAIRE DES
ANOMALIES VERTÉBRALES THORACIQUES
DANS UNE COHORTE DE BOULEDOGUES
FRANÇAIS**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le.....

par

Camille, Marie, ROUX

Née le 15 Mars 1993 à Bourges (CHER)

JURY

Président : Pr

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

Membres

Directeur : Marie ABITBOL

Maitre de conférences à VetAgro Sup

Assesseur : Pierre MOISSONNIER

Professeur à l'ENVA

Invités : Laurent TIRET Professeur à l'ENVA

Loïc DESQUILBET Maître de conférences à l'ENVA

Liste des membres du corps enseignant

Directeur : M. le Professeur Degueurce Christophe

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs : Cotard Jean-Pierre, Mialot Jean-Paul, Moraillon Robert, Parodi André-Laurent, Pilet Charles, Toma Bernard.

Professeurs émérites : Mme et MM. : Bénét Jean-Jacques, Chermette René, Combrisson Hélène, Courreau Jean-François, Deputte Bertrand,

Niebauer Gert, Paragon Bernard, Pouchelon Jean-Louis.

Département d'élevage et de pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - Adjoint : Pr Blot Stéphane

<p>Unité pédagogique de cardiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chetboul Valérie* - Dr Gkouni Vassiliki, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique de clinique équine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Audigé Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Bourzac Céline, Maître de conférences contractuelle - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier * - Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier - Dr Moiroud Claire, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique de médecine interne</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Benchekroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guibert Morgane Maître de conférence contractuel - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticien hospitalier - Dr Maurey-Guéneq Christelle, Maître de conférences <p>Discipline : imagerie médicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Stambouli Fouzia, Praticien hospitalier 	<p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cléro Delphine, Maître de conférences - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences - Pr Grandjean Dominique* - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier - Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Fayolle Pascal - Dr Mailhac Jean-Marie, Maître de conférences - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences - Pr Moissonnier Pierre - Pr Viateau-Duval Véronique* <p>Discipline : anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Zilberstein Luca, Maître de conférences <p>Discipline : ophtalmologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier
--	--

Département des Productions Animales et de la Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - Adjoint : Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Augustin Jean-Christophe - Dr Bolnot François, Maître de conférences * - Pr Carlier Vincent <p>Unité pédagogique de maladies règlementées, zoonoses et épidémiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Dufour Barbara* - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Praud Anne, Maître de conférences - Dr Rivière Julie, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Adjou Karim* - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences - Pr Millemann Yves - Dr Ravary-Plumioën Béragère, Maître de conférences - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier 	<p>Unité pédagogique de reproduction animale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr El Bay Sarah, Praticien hospitalier - Dr Mauffré Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Pr Bossé Philippe* - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Dr Leroy-Barassin Isabelle, Maître de conférences - Pr Ponter Andrew - Dr Wolgust Valérie, Praticien hospitalier
--	--

Département des sciences biologiques et pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Chateau Henry - Adjoint : Dr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Degueurce Christophe - Pr Robert Céline* <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Boulouis Henri-Jean* - Pr Eloit Marc - Dr Le Poder Sophie, Maître de conférences - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences - Pr Quintin-Colonna Françoise <p>Unité pédagogique de biochimie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Bellier Sylvain* - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier - Dr Michaux Jean-Michel, Maître de conférences <p>Discipline : éducation physique et sportive</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. Philips Pascal, Professeur certifié <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques* - Dr Laloy Eve, Maître de conférences - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Dr Desquilbet Loïc, Maître de conférences (Biostatistique, Epidémiologie) * - Dr Fournel Christelle, Maître de conférences contractuelle (Gestion et management) <p>Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticien hospitalier (rattachée au DEPEC) - Dr Darmon Céline, Maître de conférences contractuelle (rattachée au DEPEC) - Pr Guillot Jacques* - Dr Polack Bruno, Maître de conférences - Dr Risco-Castillo Verónica, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Enriquez Brigitte, - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences * - Pr Tissier Renaud <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Dr Gilbert Caroline, Maître de conférences (Ethologie) - Pr Panther Jean-Jacques (Génétique) - Dr Pilot-Storck Fanny, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tiret Laurent, (Physiologie, Pharmacologie) *
---	---

* responsable d'unité pédagogique

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.

Au Docteur Marie ABITBOL,

Maître de Conférences à VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,
Pour la confiance que vous m'avez accordée pour ce projet de thèse, pour votre aide, votre
patience, votre disponibilité et votre gentillesse,
Très sincères remerciements.

Au Professeur Pierre MOISSONNIER,

Professeur de l'École nationale vétérinaire d'Alfort,
Unité pédagogique de chirurgie,
Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour avoir accepté d'être l'assesseur de cette thèse,
pour votre temps et pour vos corrections pertinentes,
Très sincères remerciements.

Au Professeur Laurent TIRET et au Docteur Loïc DESQUILBET,

Pour m'avoir épaulée lors de ce projet de thèse,
Sincères remerciements.

**A toute l'équipe de l'U955 Inserm IMRB Equipe 10 BNSM, Génétique Médicale
Comparée de l'École nationale vétérinaire d'Alfort et en particulier au Docteur
JARAUD Ambre,**

Pour votre temps, votre aide et votre gentillesse,
Sincères remerciements.

**Au club des Bouledogues Français, à Madame Elyse WAGET (présidente) et à Monsieur
Daniel BEGUIN (vice-président),**

Aux propriétaires des Bouledogues Français ainsi qu'à leurs chiens,
En reconnaissance de leur contribution et de leur aide,
Remerciements.

**A Monsieur Christophe HITTE de l'Institut de Génétique et Développement de Rennes,
UMR6290, Equipe « Génétique du Chien », CNRS-Université de Rennes 1**

Pour les analyses bio-informatiques.

**Ce travail a été financé par le Conseil Scientifique de l'EnvA et la SCC (Société Centrale
Canine)**



REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus sincères à l'ensemble de mes proches pour m'avoir accompagnée avec constance, enthousiasme, exigence et compréhension tout au long de ce parcours.

Merci à eux de leur confiance quant à mon aptitude à mener à bien mon projet professionnel, mais aussi d'avoir su susciter, en permanence, la curiosité et l'envie d'aller plus loin.

C'est l'occasion pour moi, également, de remercier mes différents maîtres de stage dont le rôle a été déterminant dans ma formation, tant chacun a pris la peine de m'associer pleinement à ce qui fait le quotidien de la profession, dans des styles variés, avec bienveillance mais sans complaisance.

Leur énergie, leur bonne humeur, leur engagement ont été des moteurs premiers et n'ont fait que conforter dans mon esprit, si besoin en était que le métier de vétérinaire est bel et bien un métier de passion.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION.....	11
PREMIÈRE PARTIE :	13
I. Présentation des différentes anomalies vertébrales recensées chez le Bouledogue Français	15
A. Le Bouledogue Français	15
1. Historique et standard de race	15
2. La colonne vertébrale normale du Bouledogue Français	17
B. Monographies des anomalies vertébrales canines	18
1. Le bloc vertébral.....	18
2. Aplasie et hypoplasie du corps vertébral : les hémivertèbres : l'hémivertèbre <i>stricto sensu</i> et la vertèbre cunéiforme	19
3. La vertèbre en ailes de papillon.....	20
4. La vertèbre transitionnelle.....	20
5. La <i>Spina-bifida</i>	21
6. Nombre anormal de vertèbres	21
7. Aplasie et dysplasie des facettes articulaires.....	21
8. Ostéochondromatose (exostoses ostéo-cartilagineuses).....	21
9. Une conséquence de certaines malformations vertébrales : la sténose du canal vertébral :.....	22
10. Une seconde conséquence de certaines malformations vertébrales : la déformation globale du rachis	22
C. Traitement des anomalies vertébrales	23
D. Les anomalies vertébrales thoraciques chez le Bouledogue Français.....	23
E. Les hypothèses physiopathologiques expliquant la présence des anomalies vertébrales thoraciques du Bouledogue Français	26
II. Étude génétique des anomalies vertébrales	27
A. Stratégies générales d'identification de gènes et mutations chez le chien	28

1.	Les outils	28
a.	Les marqueurs génétiques	28
b.	Les puces à SNP	28
c.	Le séquençage de l'ADN	31
2.	Les stratégies générales d'identification de gènes et de mutations	34
a.	Les analyses de liaison	34
b.	Les études d'association	36
c.	Stratégies de séquençage à haut débit <i>Whole Exome Sequencing</i> , <i>RNA-Seq</i> et <i>Whole Genome Sequencing</i>	38
d.	Approche gène-candidat	38
3.	Particularités du génome canin et conséquences sur l'identification de locus d'intérêt chez le Chien.....	41
B.	Les anomalies vertébrales recensées chez les mammifères, déterminisme génétique	43
1.	Déterminisme génétique des anomalies vertébrales chez l'Homme	43
2.	Déterminisme génétique des anomalies vertébrales chez la souris.....	45
3.	Déterminisme génétique des anomalies vertébrales chez les animaux de rente et les animaux domestiques et sauvages	53
4.	Avancées génétiques chez le Bouledogue Français	57
	DEUXIÈME PARTIE :	59
I.	Matériel et méthodes	61
A.	Animaux	61
1.	Sujets	61
2.	Clichés radiographiques	61
3.	Méthode de recrutement	62
4.	Critères d'inclusion	62
B.	Arbres généalogiques	63
C.	Extractions des ADNs	63
1.	Extraction de l'ADN des échantillons sanguins.....	63
2.	Extraction de l'ADN des brossettes buccales	63
3.	Concentration des ADN	64
D.	Génotypage.....	64
E.	Analyses statistiques	64

II. Résultats	65
A. Arbres généalogiques	65
B. Extraction et concentration des ADN.....	71
C. Mise en évidence de l'absence d'effet de stratification	71
D. Résultats de l'analyse point par point : le Manhattan Plot.....	72
E. Recherche de gènes candidats	74
1. Exploitation de bases de données bibliographiques et génomiques.....	74
2. Analyse de la localisation des marqueurs situés sur les chromosomes 1-5-14 et 23 et identifiés avant correction de Bonferroni	75
III. Discussion	79
A. Critique de la méthode de recrutement des Bouledogues Français et de la collecte des échantillons	79
B. Impact du mode de transmission sur les résultats obtenus.....	79
C. Critique des résultats de l'analyse point par point	80
CONCLUSION	83
BIBLIOGRAPHIE	85
ANNEXES	91
Annexe 1	91
Annexe 2	95
Annexe 3	97
Annexe 4	99
Annexe 5	107

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Dessin du standard officiel représentant le Bouledogue Français idéal (Standard F.C.I. N°101) (Site officiel du club de race du Bouledogue Français : http://www.cbf-asso.org/).</i>	16
<i>Figure 2 : Cinquième vertèbre thoracique de chien : vue latérale gauche (à gauche) et vue crâniale (à droite) (Barone, 1986).</i>	17
<i>Figure 3 : Types de segmentation des hémivertèbres (Kaplan et al., 2005).</i>	19
<i>Figure 4 : Coupes sagittales de rachis (tomodensitométrie) présentant une légère lordose (flèche image à gauche) et une cyphose marquée (flèches image à droite) (Caudal, 2012).</i>	22
<i>Figure 5 : Coupe frontale de rachis présentant une scoliose (flèche) (Caudal, 2012).</i>	22
<i>Figure 6 : Répartition des anomalies vertébrales, tous types confondus, en fonction de la localisation vertébrale thoracique (Krumeich, 2011).</i>	25
<i>Figure 7 : Caryotypes des différentes espèces : Homme (a), Souris (b) et Chien (c) (site http://www.ensembl.org/index.html).</i>	27
<i>Figure 8 : Schémas d'une puce à ADN (Letourneur, 2011).</i>	29
<i>Figure 9 : Un des principes des puces à SNP (site Université Pierre et Marie Curie).</i>	30
<i>Figure 10 : Hybridation et révélation d'une puce à SNP (www.illumina.com).</i>	30
<i>Figure 11 : Formule d'un nucléotide modifié et présentation de son mode d'action lors de la polymérisation (site Bio Web).</i>	32
<i>Figure 12 : Principe de la méthode de séquençage de Sanger (site Parlons Science et Curiosité).</i>	32
<i>Figure 13 : Résultat d'un séquençage Sanger avec fluorochromes (Marie Abitbol, données personnelles).</i>	33
<i>Figure 14 : Exemple de courbe de Lod score multipoint pour le glaucome à angle fermé chez le Basset Hound (Ahram et al., 2015).</i>	35
<i>Figure 15 : Courbe du risque de mettre en évidence une association due au hasard en fonction du nombre de SNP étudiés (Vasseur, 2010).</i>	36
<i>Figure 16 : Illustration du « bruit de fond statistique » en cas de méthodes GWAS (Vasseur, 2010).</i>	37
<i>Figure 17 : Illustration de la cartographie en deux étapes lors d'études d'association chez l'espèce canine (Karlsson et Lindblad-Toh, 2008).</i>	42

<i>Figure 18 : Répartition des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies des vertèbres, du crâne et des côtes sur les différents chromosomes de l'Homme.</i>	45
<i>Figure 19 : Répartition des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies des vertèbres, du crâne et des côtes sur les différents chromosomes de la Souris.</i>	51
<i>Figure 20 : Méthode de mesure de l'angulation de la principale anomalie (Krumeich, 2011).</i>	61
<i>Figure 21 : Arbres généalogiques dessinés avec le logiciel Genopro.</i>	66
<i>Figure 22 : Graphique de la répartition des concentrations des échantillons d'ADN de l'ensemble des chiens Bouledogue Français inclus dans l'étude.</i>	71
<i>Figure 23 : Figure de stratification cas-contrôle de notre étude par la méthode de «multidimensional-scaling ».</i>	72
<i>Figure 24 : Résultats du Manhattan Plot (avant correction de Bonferroni).</i>	73
<i>Figure 25 : Recensement des 30 marqueurs SNP mis en évidence lors de l'analyse point par point avec leur signification statistique de l'association avec les anomalies vertébrales avant (3^{ème} colonne) puis après (5^{ème} colonne) correction de Bonferroni.</i>	74
<i>Figure 26 : Graphique de la répartition chromosomique des gènes canins et des gènes équivalents canins (obtenus à partir d'autres espèces) responsables d'anomalies vertébrales thoraciques.</i>	75

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Classification des anomalies vertébrales les plus communes selon leur stade de développement (Westworth et Sturges, 2010).</i>	18
<i>Tableau 2 : Répartition des Bouledogues Français mâles et femelles, dans les classes « indemne », « atteint » et « à surveiller cliniquement » telles que définies dans l'étude de Krumeich. Les valeurs se lisent « effectif (pourcentage) » (Krumeich, 2011).</i>	24
<i>Tableau 3 : Effectif et fréquence de chaque anomalie vertébrale thoracique ou conséquence d'anomalie vertébrale thoracique chez les Bouledogue Français (Krumeich, 2011).</i>	24
<i>Tableau 4 : Avantages et inconvénients de puces à SNP (Kaplan et Delpech, 2007 ; Devaux, 2016).</i>	31
<i>Tableau 5 : Comparaison séquenceur classique et séquenceur de nouvelle génération (Kaplan et Delpech, 2007).</i>	33
<i>Tableau 6 : Intérêts et limites des différentes stratégies d'identification de mutations.</i>	39
<i>Tableau 7 : Tableau des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales chez l'Homme (d'après OMIM®).</i>	44
<i>Tableau 8 : Tableau des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales et d'anomalies de développement vertébral chez la Souris (d'après MGI®).</i>	47
<i>Tableau 9 : Tableau des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales chez les bovins (Bos taurus) (d'après OMIA®).</i>	54
<i>Tableau 10 : Tableau des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales chez le Chien (Canis lupus familiaris) (d'après OMIA®).</i>	55
<i>Tableau 11 : Tableau des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales chez le Chat (Felis catus) (d'après OMIA®).</i>	56
<i>Tableau 12 : Éléments envoyés aux propriétaires des chiens selon le type de prélèvement ADN choisi.</i>	62
<i>Tableau 13 : Recensement des localisations sur les chromosomes canins 1-5-14-23 des différents marqueurs identifiés lors de l'étude d'association (avant correction de Bonferroni), et comparaison avec les localisations des gènes canins ou homologues canins impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales thoraciques ou d'anomalies du crâne ou des côtes.</i>	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
AKC : *American Kennel Club*
CED : *CranioEctodermal Dysplasia*
Chr : Chromosome
CKC : *Canadian Kennel Club*
DO: Densité optique
EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EnvA : Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
FCI : Fédération Cynologique Internationale
Gb : Giga bases
GWAS : *Genome Wide Association Study*
kb : kilo-bases
KC: *Kennel Club* britannique
LD : *Linkage Disequilibrium*
Mb : Méga bases
mds : *multidimensional-scaling*
MgCl₂ : chlorure de magnésium
MGI® : *Mouse Genome Informatics*®
MVD mitrale : Maladie Valvulaire Dégénérative mitrale
NaCl : chlorure de sodium
ng : nanogramme
NGS : *Next Generation Sequencing*
OMIA® : *Online Mendelian Inheritance In Animals*®
OMIM® : *Online Mendelian Inheritance in Man*®
pb : paire de bases
SCC : Société Centrale Canine
SCDO : *Spondylocostal Dysostosis*
SLR : Solution de Lyse des globules Rouges
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
SRTD : *Short-Rib Thoracic Dysplasia*
TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane
WES : *Whole Exome Sequencing*
WGS : *Whole Genome Sequencing*
μL : microlitre

INTRODUCTION

Le Bouledogue Français est une race répandue en France et bien connue dans le monde qui bénéficie d'une cote de popularité faisant régulièrement augmenter son effectif (la population a plus que triplé en dix ans en France).

De nombreux croisements et efforts de sélection ont permis d'aboutir à ce molossoïde de petit format. Cette sélection a eu pour but d'obtenir des sujets possédant des critères caractéristiques morphologiques précis, ceci en utilisant comme reproducteurs un petit nombre d'individus sélectionnés qui ont engendré des descendants, eux même sélectionnés sur ces mêmes critères, et ainsi de suite sur de nombreuses générations. L'utilisation d'un noyau de reproducteurs de départ, de la sélection stricte de leur descendance et l'usage de la consanguinité afin de faciliter la fixation des caractères recherchés, a engendré une homogénéité phénotypique et génétique des chiens Bouledogue Français et la fixation involontaire de caractères délétères.

Parmi ceux-ci, la littérature vétérinaire insiste sur la fréquence des malformations vertébrales qui sont le plus souvent asymptomatiques et diagnostiquées de façon fortuite.

Compte tenu de la fréquence suspectée de ces malformations dans la race, une étude constituée de plusieurs volets sur les anomalies vertébrales thoraciques chez le Bouledogue Français a vu le jour.

Tout d'abord, la prévalence de ces anomalies vertébrales a été étudiée au sein d'une cohorte de 360 chiens Bouledogue Français (Krumeich, 2011).

Cette étude a permis de mettre en évidence que plus de 90% des Bouledogues Français de la cohorte recrutée présentaient au moins une anomalie vertébrale sur leur rachis thoracique (le plus fréquemment des hémivertèbres ou des vertèbres en ailes de papillon) sans qu'aucun signe clinique ne leur soit associé.

Par ailleurs, l'existence d'associations statistiques entre certaines de ces anomalies vertébrales et certaines lésions a été prouvée : la spondylose, les fusions inter-épineuses et les déformations en cyphose apparaissent comme les conséquences les plus fréquentes des anomalies vertébrales thoraciques des chiens Bouledogue Français.

Ensuite, une deuxième étude menée sur une cohorte augmentée de cette même race (Moreno, 2014) s'est intéressée à l'existence d'association entre la présence d'anomalies vertébrales thoraco-lombaires et la survenue ultérieure au dépistage des anomalies de troubles neurologiques d'origine médullaire, ainsi qu'à la recherche d'un lien entre les conditions de vie du chien et la survenue de ces troubles.

Il a pu être mis en évidence que la présence d'une hémivertèbre thoracique semblait être un facteur de risque pour la survenue de myélopathie thoraco-lombaire telle que la hernie discale. D'autre part, l'étude a révélé des associations significatives entre le surpoids, la stérilisation, le sexe mâle, et les jeux intenses pendant moins de trois heures par semaine avec la survenue de ces troubles nerveux. La majorité de ces paramètres pouvant être indirectement liées au poids de l'animal, les conseils diététiques prodigués par les vétérinaires semblaient donc essentiels.

La présente thèse avait pour objet d'effectuer une étude génétique sur cette seconde cohorte de Bouledogue Français.

L'objectif de l'étude était de déterminer s'il existait un mode de transmission pour les anomalies vertébrales thoraciques chez le Bouledogue Français et de rechercher le ou les locus(i) responsable(s) de ces anomalies à partir d'une sous-cohorte de 79 chiens, afin qu'à terme une sélection des reproducteurs puisse être mise en place pour réduire la prévalence des anomalies vertébrales dans la race.

Avant d'exposer et de discuter les résultats obtenus, nous présentons dans une première partie bibliographique un bref rappel sur les différentes anomalies vertébrales thoraciques, puis nous détaillons les différents types de stratégies génétiques de recherche de locus morbides, et enfin nous abordons le déterminisme génétique des anomalies vertébrales chez différentes espèces de Mammifères.

PREMIÈRE PARTIE :
Étude bibliographique

I. Présentation des différentes anomalies vertébrales recensées chez le Bouledogue Français

A. Le Bouledogue Français

1. Historique et standard de race

Le Bouledogue Français est un molossoïde de petit format qui fait partie du groupe 9 (chien d'agrément et de compagnie) et dont la race est reconnue aujourd'hui par la FCI (Fédération Cynologique Internationale), le KC (*Kennel Club* britannique), l'AKC (*American Kennel Club*) et le CKC (*Canadian Kennel Club*).

Le Bouledogue Français est un produit de différents croisements réalisés par les éleveurs passionnés des quartiers populaires de Paris dans les années 1880, année de la fondation du premier club de race à Paris. Le premier registre d'inscription et le premier standard de la race furent établis respectivement en 1885 et 1889 (année où la SCC (Société Centrale Canine) reconnut la race). Les bouchers avaient traditionnellement pour compagnon le dogue, et cela depuis le Moyen Âge. Le dogue évolua au cours des siècles, et certains individus perdirent de la taille donnant le doguin. Par la suite, ces bouchers achetèrent des Bulldog Anglais de petite taille, qui étaient alors très différents du type actuel (moins lourds, moins massifs, plus haut sur pattes). Les combats de chiens étaient des divertissements très appréciés à l'époque, et beaucoup de bouchers possédaient un chien de combat. A la même époque, le chien ratier était très répandu dans les faubourgs parisiens. Il était surtout prisé des cochers qui s'en servaient pour débarrasser les écuries des rats. Ce ratier avait souvent les oreilles droites et la robe bringée. C'est en croisant ce ratier avec le Bulldog Anglais pour avoir un chien de combat plus petit, que l'on obtint le Bouledogue Français. On francisa le nom qui devint tout naturellement Bouledogue au lieu de Bulldog. On accentua encore le caractère brachycéphale de l'animal, à l'aide du Lillois, petit chien du Nord de la France, aujourd'hui disparu et issu du Carlin (Site officiel du club de race des bouledogues français : <http://www.cbf-asso.org/>). Les premiers sujets n'avaient pas toujours les oreilles droites et l'usage était alors de leur couper. A cette époque, la couleur bringée était la plus recherchée. Il y eut beaucoup de tâtonnements et d'échecs avant d'obtenir un bon type de Bouledogue. C'est dans les années 1900 que la race connut un succès extraordinaire dans le pays, ainsi qu'à l'étranger, Angleterre, Etats-Unis, Allemagne, Autriche...

Si le premier standard date de 1889, il a évolué en 1931-1932, 1948, puis a été reformulé en 1986 et en 1994. Enfin ce standard fut de nouveau modifié en 2012 par le Comité du Club du Bouledogue Français (Site officiel du club de race des bouledogues français : <http://www.cbf-asso.org/> et Grandjean *et al*, 2010).

Le Bouledogue Français est un chien dont le poids varie entre 8 et 14 kg (8-13 pour les femelles et 9-14 pour les mâles) selon la taille au garrot (mâle : 27 cm à 35 cm et femelle 24 cm à 32 cm). Typiquement molossoïde de petit format, il s'agit d'un chien puissant, bréviligne, trapu et ramassé dans toutes ses proportions.

La longueur du corps, prise entre la pointe de l'épaule et la pointe de la fesse, est légèrement supérieure à la hauteur au garrot. La longueur du chanfrein est d'environ 1/6 de la longueur totale de la tête.

La tête est très forte, large, carrée et recouverte par la peau qui forme des plis et des rides presque symétriques. Une caractéristique du Bouledogue Français est un crâne large et court qui entraîne un retrait du massif maxillo-nasal. Les yeux sont placés bas, loin des oreilles et de la truffe. De forme ronde et de couleurs foncés, les yeux sont assez grands, légèrement en saillie et sclérotiques (c'est-à-dire qu'ils ne laissent voir aucune trace de blanc quand l'animal regarde de face). Le bord des paupières doit être noir. Les arcades sourcilières sont proéminentes et séparées par un sillon prononcé entre les yeux. Le nez est légèrement retroussé (ou « remouché »). La truffe est de couleur noire, large, camuse, avec des narines bien ouvertes, symétriques et dirigées obliquement vers l'arrière. Les lèvres apparaissent épaisses, un peu lâches et noires. La langue ne doit jamais être apparente au repos (défaut assez fréquent). Les mâchoires sont larges et puissantes et présentent des incisives et des canines suffisamment développées.

Les oreilles sont de taille moyenne, larges à la base et arrondies au sommet. Elles sont placées haut sur la tête sans être trop rapprochées l'une de l'autre. Elles sont portées droites. Le pavillon est ouvert vers l'avant.

La forme du corps recherchée (dos de carpe ou « roach-back ») est celle où la ligne du dessus se relève progressivement au niveau du rein avant de descendre rapidement vers la queue. Cette particularité est liée à la forme du rein (court et large), à un dos large et musclé et à une croupe oblique. Par ailleurs, la poitrine du Bouledogue Français apparaît bien cylindrique et descendue avec un poitrail largement ouvert et des côtes dites en tonneau (très arrondies).

Les pieds antérieurs sont ronds, compacts, de petite dimension et dits "pieds de chat" (c'est à dire tournés légèrement en dehors). Les pieds postérieurs quant à eux sont ronds, bien compacts mais ni en dedans, ni en dehors.

La queue est courte (longueur variable entre 1 cm et une queue repliée sur elle-même de quelques centimètres), attachée bas sur la croupe. Elle est collée sur les fesses, épaisse à la base et effilée à l'extrémité. La queue peut être cassée naturellement (*Figure 1*).

La robe standard est variable : sont acceptées les robes uniformément colorée fauve, bringées ou non, avec ou sans panachure blanche (dans le cas d'une panachure blanche envahissante sur une robe noire bringée on parle de « robe caille »). Le poil est ras, serré, brillant et doux. Il n'y a pas de sous-poils.

Figure 1: Dessin du standard officiel représentant le Bouledogue Français idéal (Standard F.C.I. N°101) (Site officiel du club de race du Bouledogue Français : <http://www.cbf-asso.org/>).



2. La colonne vertébrale normale du Bouledogue Français

La colonne vertébrale se définit comme une tige solide et souple servant d'axe au squelette. La colonne est constituée des vertèbres, des disques intervertébraux et du canal vertébral. Le contenu de ce dernier est constitué d'éléments nerveux et d'autres formations que nous ne détaillerons pas dans cette étude. Les éléments osseux qui composent la colonne vertébrale se répartissent en 5 régions : cervicale, thoracique, lombaire, sacrale et caudale.

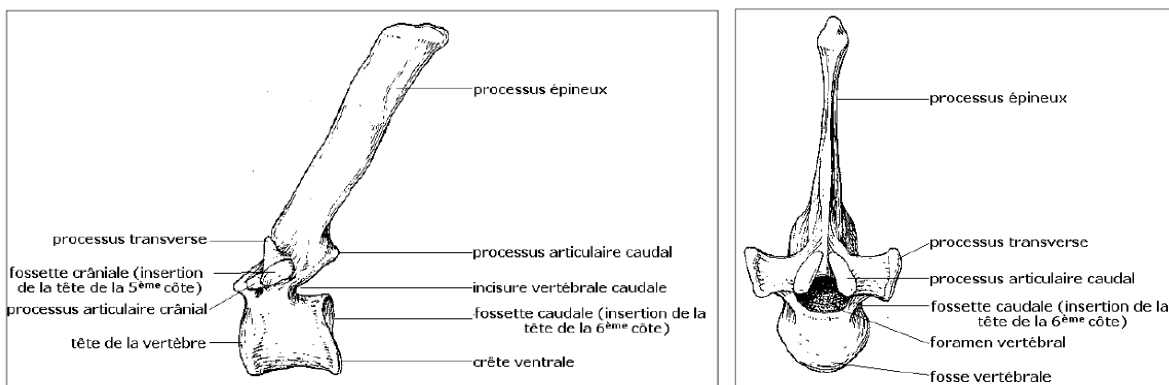
La formule vertébrale du chien est la suivante : C7 - T13 - L7 - S3 - Cd nombre variable jusqu'à 22.

Bien que toutes différentes, on peut établir la conformation type d'une vertèbre :

- un corps vertébral ventral délimitant le plancher du canal vertébral, zone d'insertion des disques intervertébraux.
- un arc vertébral dorsal formé par deux lames vertébrales et deux pédicules reliant les lames au corps vertébral.
- différents processus permettant les insertions musculaires et l'articulation de la colonne vertébrale : épineux, transverse, articulaire, accessoire et mamillaire.

Dans le cas particulier de la région thoracique, le corps vertébral est plus court que celui des vertèbres cervicales et lombaires. Ce corps porte des fossettes de chaque côté : une crâniale et une caudale. Le plateau vertébral crânial de la vertèbre est moins concave et le plateau vertébral caudal moins convexe. De plus, le processus épineux des vertèbres crâiales à la vertèbre anticlinale (T11 la plupart du temps) est dirigé caudalement, et celui des vertèbres caudales à l'anticlinale est dirigé crânialement (Kealy *et al.*, 2011). Enfin, les vertèbres thoraciques sont caractérisées par leur connexion avec les côtes. A chaque vertèbre correspond une paire de côtes. Ces dernières s'articulent par leur tête avec la cupule costale délimitée crânialement par la fossette costale du processus transverse de la vertèbre concernée et caudalement par la fossette costale du processus transverse de la vertèbre précédente (Figure 2).

Figure 2: Cinquième vertèbre thoracique de chien : vue latérale gauche (à gauche) et vue crâniale (à droite) (Barone, 1986).



B. Monographies des anomalies vertébrales canines

La plupart des malformations vertébrales se mettent en place au cours du développement embryonnaire, même si quelques-unes peuvent être acquises (par exemple la fusion de deux vertèbres lors de spondylose). Les raisons du développement de ces malformations restent aujourd'hui mal connues. Cependant certains facteurs ont pu être identifiés comme étant à l'origine de ces anomalies : prédisposition génétique, mutation, anomalie métabolique (carence en acide folique par exemple), médicament tératogène ou certains toxiques.

Les malformations rachidiennes ont été classées par Bailey en deux groupes majeurs selon leur origine embryologique (Platt *et al.*, 2004):

- Les malformations originaires du mésoderme : elles impliquent les vertèbres et les corps vertébraux.
- Les malformations originaires de l'ectoderme qui concernent la moelle épinière et les méninges. Ces dernières ne seront pas développées dans cette étude dont le sujet porte uniquement sur les anomalies vertébrales thoraciques.

Plus précisément, les anomalies vertébrales (donc d'origine mésodermique) sont classées selon leur stade de développement : embryonnaire ou fœtal (*Tableau 1*).

Tableau 1: Classification des anomalies vertébrales les plus communes selon leur stade de développement (Westworth et Sturges, 2010).

Stade embryonnaire = défaut de formation	Stade fœtal = défaut de segmentation ou retard de formation
Hémivertèbre vraie	Bloc vertébral
Vertèbre cunéiforme	Hypoplasie des facettes articulaire
Vertèbre transitionnelle	Défaut de segmentation de l'articulation costo-vertébrale
Vertèbre en ailes de papillon	Hypoplasie ou aplasie du corps vertébral
Diastématomyélie	Vertèbre cunéiforme
	Vertèbre transitionnelle

1. Le bloc vertébral

Le bloc vertébral résulte d'une migration incomplète des somites, engendrant une séparation incomplète de deux vertèbres adjacentes. Ce défaut de segmentation est attribué à des anomalies de vascularisation par les artères intersegmentaires (Bailey et Morgan, 1992).

Le bloc peut se traduire par la fusion des corps vertébraux, des arcs vertébraux ou simplement par un développement incomplet du disque intervertébral.

Il n'a pas été démontré de localisation préférentielle de cette anomalie à un segment du rachis identifié.

Le bloc vertébral est souvent plus court que les vertèbres normales équivalentes, et peut être responsable d'une angulation du rachis ou d'une sténose du canal vertébral. Il peut augmenter les contraintes mécaniques sur les espaces intervertébraux adjacents par « effet domino » et ainsi provoquer la dégénérescence des disques intervertébraux pouvant causer des hernies discales en ces sites (Bailey, 1975).

2. Aplasie et hypoplasie du corps vertébral : les hémivertèbres : l'hémivertèbre *stricto sensu* et la vertèbre cunéiforme

L'hémivertèbre vraie (*stricto sensu*) résulte d'une impossibilité de mise en place d'une moitié de la vertèbre dans le plan sagittal concernant à la fois le corps vertébral et les lames dorsales. L'origine suspectée est un défaut de vascularisation unilatéral au cours de l'embryogenèse, qui entraînerait alors l'absence de formation d'un centre d'ossification (Westworth et Sturges, 2010).

La conséquence directe de leur présence est l'apparition d'une scoliose. Si plusieurs hémivertèbres sont situées du même côté du rachis, une scoliose importante est présente, mais si elles se situent de côtés opposés elles peuvent se compenser (Bailey, 1975).

On rencontre fréquemment cette anomalie chez les chiens à queue courte, en particulier chez le Bouledogue Français. Elle intéresse souvent les vertèbres thoraciques et plus rarement les vertèbres lombaires.

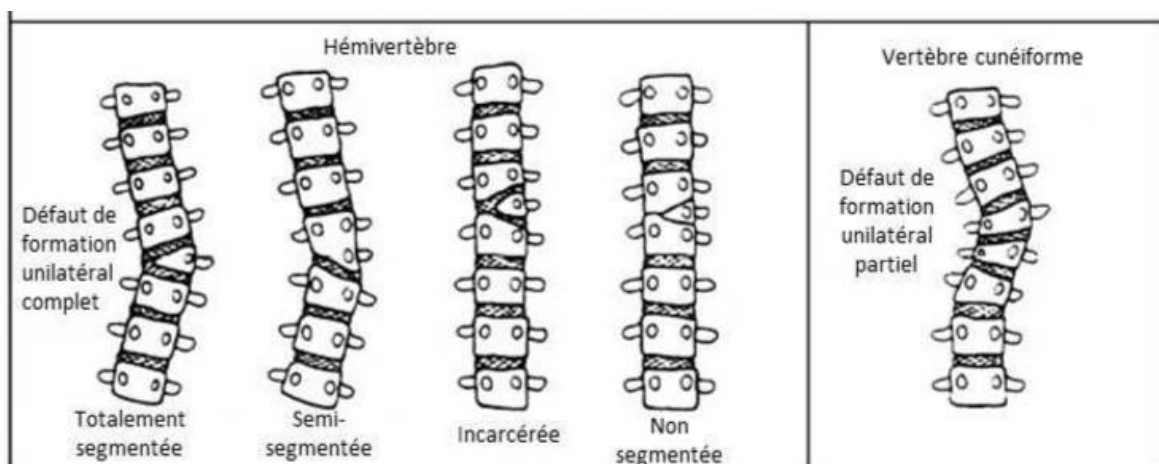
La vertèbre cunéiforme, résulte d'une hypoplasie ou d'une aplasie du seul centre d'ossification du corps vertébral, conduisant au raccourcissement de ce dernier dans le plan latéro-latéral (Westworth et Sturges, 2010). Ce défaut donne à la vertèbre une forme de coin d'où son nom de vertèbre cunéiforme.

Les vertèbres cunéiformes sont souvent instables et sont à l'origine de déviations angulaires de la colonne vertébrale, en particulier de cyphose d'intensité souvent proportionnelle au nombre de vertèbres atteintes.

Les hémivertèbres peuvent être :

- segmentées : elles sont encadrées par une plaque de croissance crâniale et par une plaque de croissance caudale.
- semi-segmentées : elles sont fusionnées avec la vertèbre crâniale ou caudale.
- non segmentées : elles sont fusionnées avec les vertèbres crâniale et caudale.
- incarcerated : lorsque les vertèbres crâniale et caudale à l'hémivertèbre sont conformées de manière à englober cette dernière (*Figure 3*).

Figure 3 : Types de segmentation des hémivertèbres (Kaplan et al., 2005).



3. La vertèbre en ailes de papillon

Une vertèbre en ailes de papillon est une variation de l'hémivertèbre fendue dans le plan sagittal, et qui en vue radiographique ou tomodensitométrique dorso-ventrale possède une allure de papillon (Caudal, 2012). La partie ventrale ou crâniale de la vertèbre présente un défaut de formation partiel ou complet : il ne subsiste que la fusion des lames dorsales.

Ces anomalies résultent d'une migration incomplète du matériel de la notocorde à travers le disque intervertébral, conduisant à la création de deux centres d'ossification dans le corps vertébral au lieu d'un. Ceux-ci se développent insuffisamment, entraînant un défaut partiel voire complet de formation des portions centrale et ventrale du corps vertébral, laissant deux fragments dorso-latéraux d'os attachés à l'arc vertébral (Krumeich, 2011).

Certaines études de la littérature portant sur des cas isolés (Sonel *et al.*, 2001) ont conclu au fait que les vertèbres en ailes de papillon augmentaient le risque de hernie discale, d'une part car elles engendraient des modifications biomécaniques, et d'autre part car les disques intervertébraux adjacents étaient pathologiques. Néanmoins, dans la seule étude de cohorte actuelle menée chez des Bouledogues Français (Moreno, 2014), aucun lien entre les hernies discales et la présence de vertèbres en ailes de papillon à proximité n'a été démontré.

4. La vertèbre transitionnelle

Une vertèbre transitionnelle est une vertèbre qui présente les caractéristiques d'une partie adjacente de la colonne. Les régions les plus fréquemment touchées sont les régions thoraco-lombaire et lombo-sacrée avec en particulier atteinte de L7 ou S1. Cette anomalie étant plus ou moins complète, il existe une grande variété de présentation et d'aspect.

La thoracisation

Cette anomalie concerne la dernière vertèbre cervicale qui va présenter certaines caractéristiques des vertèbres thoraciques comme par exemple une paire de côtes (plus ou moins développées), un processus épineux développé ou des processus transverses courts.

La lombarisation

Ce processus peut toucher la dernière vertèbre thoracique (T13) ou la première sacrée (S1) qui présente alors des caractéristiques des vertèbres lombaires. Dans le cas de T13, la (ou les) côte(s) peut (peuvent) apparaître absente(s) ou vestigiale(s) ou être remplacée(s) par un (ou des) processus transverse(s). Dans le cas de S1, le sacrum est divisé en deux ou trois parties et S1 présente un processus transverse (le côté controlatéral étant relié à l'ilium).

La sacralisation

Cette malformation concerne la dernière vertèbre lombaire qui est fréquemment liée au sacrum et à l'ilium.

Les côtes transitionnelles ou surnuméraires

Les côtes incomplètes ou transitionnelles sont retrouvées sur C7 ou L1. Il s'agit de structures osseuses dont la tête semble absente et dont la jonction avec le corps de la vertèbre adjacente est semblable à celle du processus transverse. Dans le cas de C7, on peut observer des côtes anormalement larges qui fusionnent en partie distale avec la première côte.

5. La Spina-bifida

La *spina-bifida* se définit comme l'absence d'une partie des structures dorsales d'une vertèbre non formées lors du développement embryonnaire. Cette anomalie est le plus souvent rencontrée chez les races de chiens à queue courte et chez les chats de race Manx (Krumeich, 2011). La *spina-bifida* est rare chez le Bouledogue français alors qu'elle est plus fréquente chez le Carlin (Ryan, 2017).

Elle correspond à un défaut de fusion du tube neural et de l'arc vertébral dans le plan médian (complexe dysraphisme spinal) (Bailey, 1975). L'anomalie de développement embryonnaire conduisant à la *spina bifida* est encore mal connue. On suspecte que la *spina bifida* soit une anomalie à composante génétique, même si certains facteurs environnementaux comme des substances tératogènes ou encore des carences pourraient jouer un rôle dans leur apparition.

Lorsque les tissus nerveux ne sont pas recouverts par la peau et sont en contact avec l'extérieur, la *spina-bifida* est qualifiée d'« ouverte ». Dans ce cas elle n'est généralement pas viable. Lorsqu'elle est « fermée » (c'est-à-dire recouverte par les muscles et la peau) l'expression clinique est très variable.

Il existe différents types de *spina-bifida* classées selon les atteintes osseuses et médullaires.

6. Nombre anormal de vertèbres

Cette malformation assez fréquente ne concerne en général qu'une région de la colonne. Il n'est pas rare dans ce cas qu'une région présente une vertèbre de moins que la normale alors que la région adjacente possède une vertèbre en excédent.

7. Aplasie et dysplasie des facettes articulaires

Il s'agit de la réduction ou de l'absence de la formation des facettes articulaires.

Cette anomalie est généralement située crânialement à la vertèbre T10 (vertèbre diaphragmatique). Dans ce cas, elle présente à priori peu de conséquences cliniques puisque les facettes articulaires des vertèbres thoraciques crâniales à T10 ne jouent pas ou peu de rôle dans la stabilisation des mouvements de la colonne (Zimmerman *et al.*, 1992).

A l'inverse, lorsque que l'aplasie ou la dysplasie touche des facettes articulaires des vertèbres post-diaphragmatiques (caudales à T10), l'impact clinique est plus marqué. En effet, les facettes et arcs vertébraux post-diaphragmatiques ont un rôle dans le support du poids et dans la transmission des forces de l'arrière main vers l'avant main. Donc en cas d'aplasie ce rôle est uniquement assuré par les disques intervertébraux. C'est pourquoi il est probable que l'aplasie des facettes articulaires des vertèbres caudales à T10 prédispose à l'apparition d'affections touchant le disque intervertébral comme la hernie discale.

8. Ostéochondromatose (exostoses ostéo-cartilagineuses)

L'ostéochondromatose se présente comme une pseudotumeur et correspond à des productions osseuses couvertes de cartilage qui émergent dans les régions métaphysaires et épiphysaires des os. Les vertèbres font partie des os les plus fréquemment atteints (Caudal, 2012).

Cette anomalie est liée à une migration anormale d'un groupe de chondrocytes depuis la plaque de croissance. Ceci entraîne une croissance de l'os dans une direction déviée par rapport à l'os issu de la plaque de croissance initiale.

Les conséquences cliniques ne sont présentes qu'en cas d'exostoses dirigées vers l'intérieur du canal vertébral, ce qui est à l'origine d'une compression de la moelle épinière.

9. Une conséquence de certaines malformations vertébrales : la sténose du canal vertébral :

La sténose est un rétrécissement du canal vertébral qui peut survenir en association avec d'autres anomalies (comme l'hémivertèbre, le bloc vertébral) ou en tant que malformation isolée. Il faut distinguer un rétrécissement en relation avec une hypertrophie des tissus mous (ligament jaune, portion dorsale de l'anneau fibreux, capsule facettaire) généralement rencontrée dans les instabilités inter-vertébrales, et les sténoses « vraies » du canal par réduction du diamètre du canal vertébral dans sa partie osseuse.

Ce rétrécissement est à l'origine d'une compression de la moelle épinière, des racines nerveuses ou des nerfs spinaux, ce qui peut engendrer de nombreux symptômes neurologiques (parésie, paralysie, ataxie, incontinence urinaire et/ou fécal). La sténose du canal vertébral est focale, segmentaire ou généralisée à l'ensemble de la colonne vertébrale (Bailey et Morgan, 1992). Les sténoses peuvent être classées selon leur origine congénitale, développementale ou acquise.

10. Une seconde conséquence de certaines malformations vertébrales : la déformation globale du rachis

Les malformations vertébrales peuvent entraîner selon leur nature, leur morphologie et leur nombre, une déformation globale du rachis.

En ce qui concerne la colonne vertébrale on parle de « lordose » en cas de concavité ventrale et de « cyphose » en cas de concavité dorsale (*Figure 4*). Dans le plan frontal, la déformation de la colonne se nomme « scoliose » (*Figure 5*).

Figure 4 : Coupes sagittales de rachis (tomodensitométrie) présentant une légère lordose (flèche image à gauche) et une cyphose marquée (flèches image à droite) (Caudal, 2012).

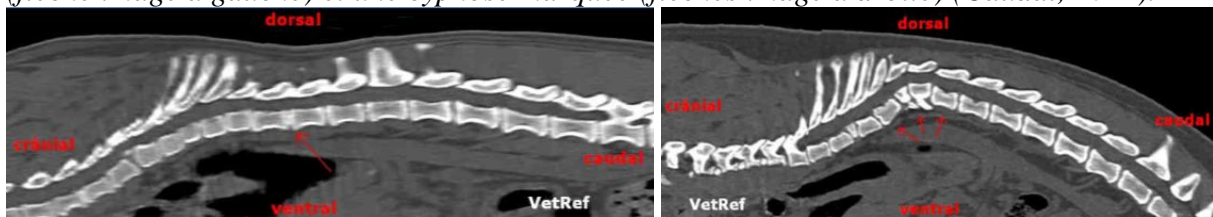


Figure 5 : Coupe frontale de rachis présentant une scoliose (flèche) (Caudal, 2012).



Il existe chez le chien des concavités physiologiques : une lordose cervicale et une cyphose thoraco-lombaire. L'augmentation, la réduction, la disparition ou l'inversion de ces courbures est donc pathologique.

Pour mettre en évidence ces anomalies des clichés radiographiques ou tomodensitométriques sont réalisés dans le plan sagittal (pour la lordose et la cyphose) et dans le plan frontal (pour la scoliose) (Caudal, 2012).

C. Traitement des anomalies vertébrales

Ce n'est pas l'anomalie vertébrale proprement dite que l'on traite, mais ses conséquences, à savoir une compression médullaire avec ou sans sténose du canal vertébral, ou encore une instabilité vertébrale.

Le traitement des anomalies vertébrales congénitales se justifie lorsque le chien présente une douleur rachidienne chronique non soulagée de manière durable par le traitement médical ou en présence de symptômes neurologiques (Dewey, 2013).

Lorsque la compression est modérée, un traitement médical analgésique et anti-inflammatoire associé à du repos peut être envisagé.

Mais lorsque la compression devient plus importante, une intervention chirurgicale visant à obtenir une décompression doit être réalisée : une laminectomie associée à une facetectomie, une mini-hémilaminectomie, ou une corpectomie. Une stabilisation intervertébrale (par de nombreuses techniques) peut être envisagée lorsque la sténose découle d'une instabilité vertébrale.

En ce qui concerne la stabilisation, une étude sur la région lombo-sacrée (Richard, 2001) a mis en évidence que le choix de la technique de stabilisation intervertébrale n'a pas énormément d'impact sur la stabilisation dans le plan médian (flexion / extension), mais a des conséquences sur la stabilisation dans le plan axial (torsion). Le brochage facettaire semblait à l'époque stabiliser l'articulation de manière supérieure aux autres implants en rotation axiale. D'autres techniques sont actuellement beaucoup plus stables que le vissage facettaire.

D. Les anomalies vertébrales thoraciques chez le Bouledogue Français

Il existe à ce jour quatre études épidémiologiques descriptives des anomalies vertébrales chez le chien. L'étude de Done *et al.* (1975) a porté sur 20 chiens de races diverses, dont 18 chiens brachycéphales : Pékinois, Bouledogue Français, Bulldog Anglais et Carlin, présentés pour paralysie postérieure, et ayant effectué une radiographie du rachis. L'étude de Krumeich (2011) a porté sur 360 Bouledogues Français, dont il a décrit les anomalies radiographiques vertébrales thoraciques, et dont le suivi dans le temps a ensuite été analysé dans l'étude de Moreno (2014). L'étude de Caudal (2012) est une étude tomodensitométrique du rachis du Bouledogue Français réalisée sur 54 chiens ayant eu une hernie discale comparés à sept chiens n'en ayant pas eu.

Cette partie va donc se baser essentiellement sur l'étude de Krumeich, mais les résultats des deux autres études (Done *et al.* et Caudal) seront également présentés.

On retiendra que plus de 92% des Bouledogue Français présentaient des anomalies vertébrales, dont beaucoup avec des conséquences anatomiques marquées (sténose du canal, cyphose), même si les conséquences cliniques restaient rares. Les chiens présentaient en moyenne 2,9 (Caudal, 2012) à 3,7 (Krumeich, 2011) anomalies vertébrales thoraciques (Tableau 2).

Tableau 2 : Répartition des Bouledogues Français mâles et femelles, dans les classes « indemne », « atteint » et « à surveiller cliniquement » telles que définies dans l'étude de Krumeich. Les valeurs se lisent « effectif (pourcentage) » (Krumeich, 2011).

	Indemne	Atteint	Atteint à surveiller cliniquement	Total
Femelle	19 (9,4%)	116 (57,4%)	67 (33,2%)	202 (100%)
Mâle	14 (8,9%)	82 (51,9%)	62 (39,2%)	158 (100%)
Total	33 (9,2%)	198 (55%)	129 (35,8%)	

Les anomalies les plus fréquentes étaient les hémivertèbres et les vertèbres en ailes de papillon dans les trois études. Ces affections ont pour conséquences les spondyloses avec des localisations corrélées à celles des anomalies vertébrales, ainsi que les sublaxations qui touchent surtout T11 (Krumeich, 2011). Les fusions inter épineuses représentaient 10 % des anomalies et les blocs vertébraux 1,1% (Krumeich, 2011) (Tableau 3).

Tableau 3 : Effectif et fréquence de chaque anomalie vertébrale thoracique ou conséquence d'anomalie vertébrale thoracique chez les Bouledogue Français (Krumeich, 2011).

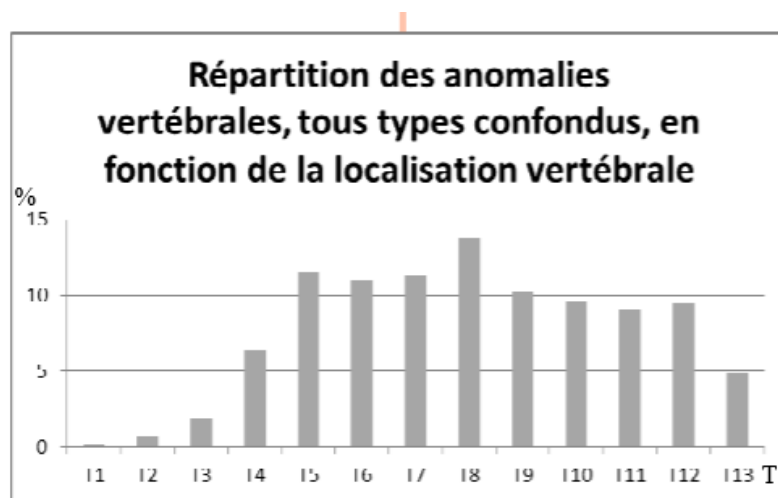
Type d'anomalie	Effectif dans l'étude	Fréquence parmi l'ensemble des anomalies
Hémivertèbre	552	44,7%
Vertèbre en ailes de papillon	492	39,8%
Fusion inter-épineuse	118	9,5%
Spina bifida	53	4,3%
Bloc vertébral	12	1,1%
Vertèbre transitionnelle	8	0,6%
Type de conséquence d'anomalie	Effectif dans l'étude	–
Spondylose	278	–

En raison du phénotype établi par le standard du bouledogue français (dos de carpe ou « roach-back » (cf IA1), queue courte avec une partie repliée sur elle-même voire naturellement cassée) les hémivertèbres coccygiennes ont été sélectionnées comme phénotype d'intérêt chez les Bouledogues Français depuis près de 150 ans (Done *et al.*, 1975). Kramer *et al.* (1982) ont montré que la transmission de cette anomalie se faisait sur un mode autosomique récessif. La nature anormale ou caractéristique de race des hémivertèbres peut donc se discuter. On peut ainsi supposer que la forte prévalence des hémivertèbres

thoraciques chez les Bouledogues Français résulte d'une sélection involontaire, concomitante à celle exercée sur les vertèbres coccygiennes (et de la cyphose souhaitée par sélection de la forme du dos).

Quatre-vingt-six pour cent des anomalies concernaient le segment central T5-T12, alors que les vertèbres thoraciques 1 à 3 et 13 étaient souvent épargnées par ces affections (Krumeich, 2011) (Figure 6).

Figure 6 : Répartition des anomalies vertébrales, tous types confondus, en fonction de la localisation vertébrale thoracique (Krumeich, 2011).



E. Les hypothèses physiopathologiques expliquant la présence des anomalies vertébrales thoraciques du Bouledogue Français

Les hypothèses physiopathologiques pouvant expliquer les anomalies vertébrales thoraciques chez le Bouledogue Français sont de plusieurs ordres :

- Anomalie vasculaire entraînant une anomalie de développement des centres d'ossification

L'hémivertèbre serait une conséquence d'un défaut de vascularisation unilatéral au cours de l'embryogenèse.

Les vertèbres en ailes de papillon proviendraient d'une migration incomplète du matériel de la notocorde à travers le disque intervertébral, conduisant à la création de deux centres d'ossification dans le corps vertébral au lieu d'un.

De même, les vertèbres cunéiformes seraient la conséquence de l'hypoplasie ou de l'aplasie du seul centre d'ossification du corps vertébral.

- Anomalie des chondrocytes

L'ostéochondromatose résulterait d'une migration anormale d'un groupe de chondrocytes depuis la plaque de croissance.

II. Étude génétique des anomalies vertébrales

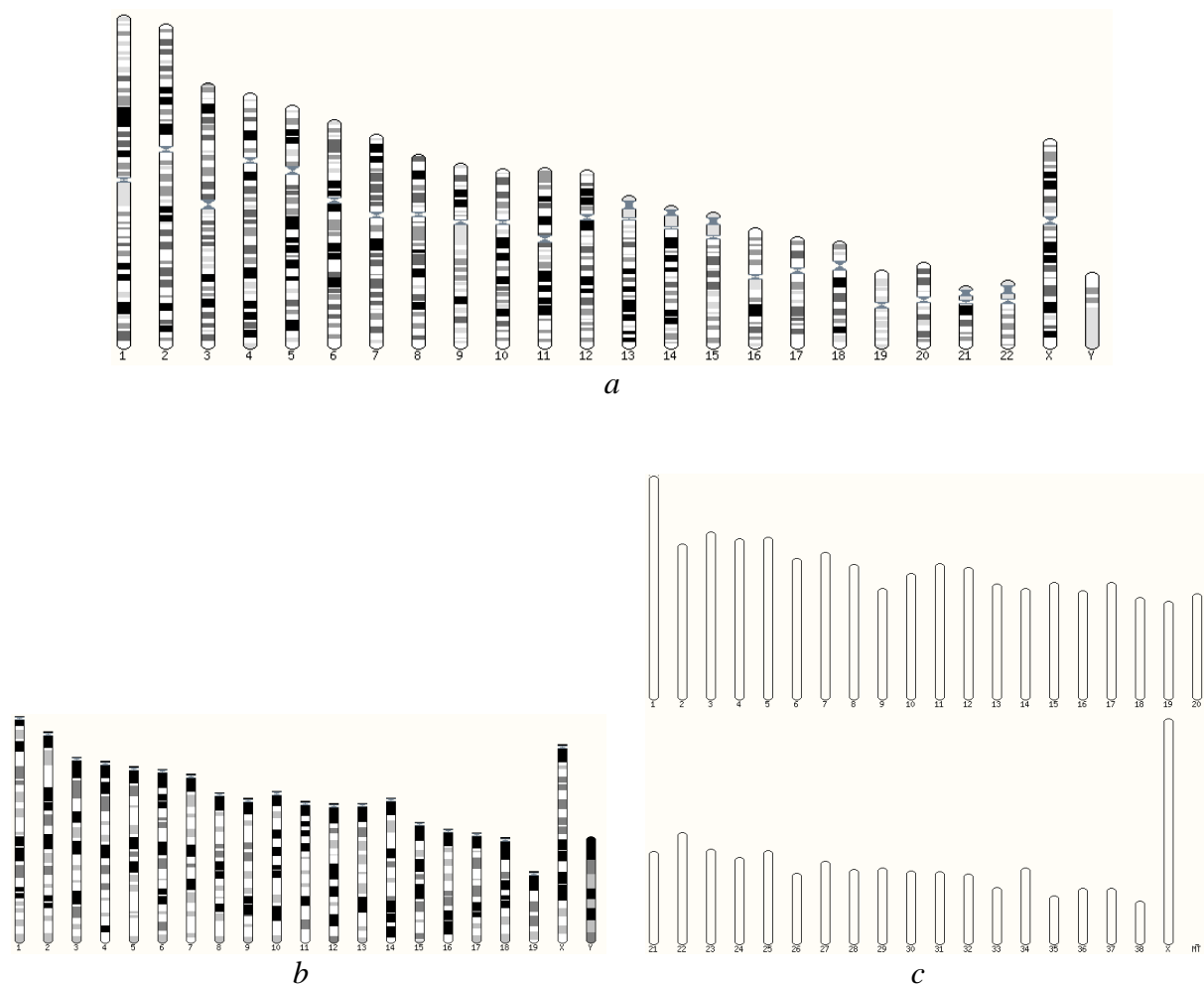
Le patrimoine génétique d'un mammifère comme le Chien est porté par son ADN nucléaire (situé dans le noyau de la cellule) et son ADN mitochondrial (situé dans les mitochondries, petits organites intracellulaires). La plus grande partie de ce patrimoine génétique est constitué de l'ADN nucléaire qui, lors de certaines phases du cycle cellulaire, se trouve condensé sous la forme de chromosomes. Chacun des chromosomes a une forme différente.

Le nombre de paires de chromosomes varie selon les espèces :

- chez l'Homme : 22 paires et la paire de chromosomes sexuels (XX ou XY).
- chez la Souris : 19 paires et la paire de chromosomes sexuels (XX ou XY).
- chez le Chien : 38 paires et la paire de chromosomes sexuels (XX ou XY).

Le caryotype est une photographie de l'ensemble des chromosomes triés d'une cellule (*Figure 7*).

Figure 7 : Caryotypes des différentes espèces : Homme (a), Souris (b) et Chien (c) (site <http://www.ensembl.org/index.html>).



Les unités de structure et de fonction du patrimoine génétique sont appelés gènes et chaque gène contient de l'information pour la synthèse régulée d'un ARN (acide ribonucléique) ou d'une protéine. Chaque gène a un emplacement fixe sur un chromosome que l'on appelle le locus du gène. Un locus désigne donc une région chromosomique unique.

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à l'étude génétique des anomalies vertébrales et en particulier au recensement et à la localisation sur les chromosomes des locus et gènes connus à ce jour comme intervenant dans l'apparition des anomalies vertébrales thoraciques.

A. Stratégies générales d'identification de gènes et mutations chez le chien

1. Les outils

a. Les marqueurs génétiques

Les marqueurs génétiques correspondent à des séquences d'ADN polymorphes (possédant plusieurs allèles) dérivant d'un site chromosomique unique. Une fois localisés les uns par rapport aux autres, les marqueurs vont permettre de localiser des gènes d'intérêt, de nouveaux marqueurs ou de rechercher les régions génomiques associées à des caractères d'intérêt ou délétères phénotypiques (cartographie) (Devaux, 2016).

La dernière génération de marqueurs génétiques qui a supplanté les autres pour la cartographie chez le Chien s'appelle SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Les marqueurs SNP correspondent à des mutations ponctuelles isolées : il s'agit du polymorphisme d'un seul nucléotide (FAO, 2008). Ce polymorphisme est mis en évidence par un séquençage de l'ADN ou par l'utilisation de puces à SNP en une fois (www.illumina.com). Les SNP définissent des locus uniques dans le génome et ils sont polymorphes (bialléliques).

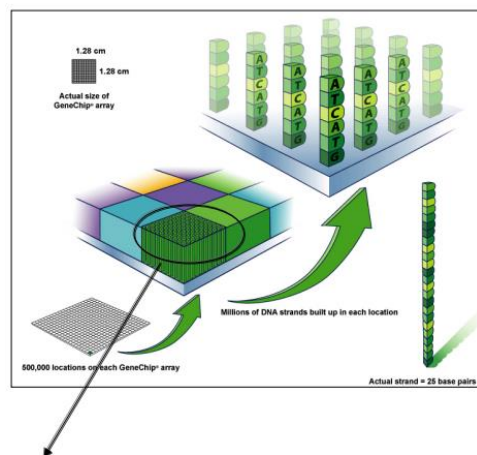
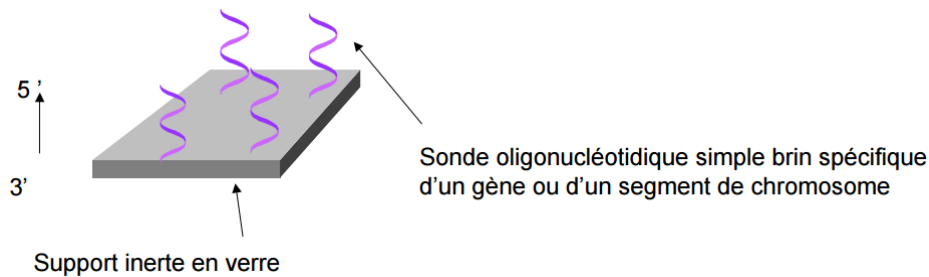
En raison de leur grand nombre dans le génome des Mammifères, les SNP constituent des marqueurs de choix pour les études d'association (comparaison de cohortes cas / témoins). De plus, les SNP situés dans des régions codantes et dans les régions régulatrices des gènes sont particulièrement intéressants pour la cartographie des maladies multifactorielles (étude d'association de gènes candidats impliqués dans ces maladies).

b. Les puces à SNP

Les puces à marqueurs SNP sont de petites surfaces solides sur lesquelles un grand nombre de sondes (enchaînement d'oligonucléotides spécifique d'un gène ou d'un segment de chromosome) ont été fixées (*Figure 8*). On distingue :

- les puces « pangénomiques » qui couvrent l'ensemble du génome.
- les puces « à façon » qui ciblent une fonction biologique, une maladie ou une région particulière du génome.

Figure 8 : Schémas d'une puce à ADN (Letourneur, 2011).



Zone de qq μ m² contenant des millions de copies d'une même sonde

Le principe biochimique des puces à SNP est celui de l'hybridation complémentaire ADN/ADN.

La puce à SNP est recouverte de petits oligonucléotides, chacun spécifique d'un SNP, avec une grande densité.

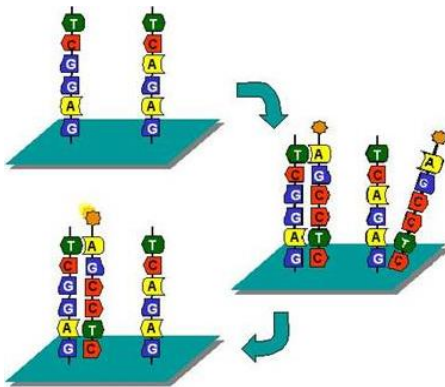
Plusieurs technologies différentes sont utilisées pour hybrider et révéler l'ADN de l'individu que l'on va mettre en contact avec les oligonucléotides de la puce.

Par exemple, la méthode suivante peut être utilisée (Figure 9):

L'ADN à exploiter est :

- fragmenté par chauffage.
- marqué avec un fluorochrome puis hybridé avec l'ADN fixé sur la puce (les petits oligonucléotides). Seuls les fragments de l'ADN à exploiter qui trouvent la séquence exactement complémentaire aux petits oligonucléotides de la puce sont retenus.
- après lavage pour éliminer l'ADN fluorescent en excès, on analyse les oligonucléotides qui ont retenu de la fluorescence. La quantification du signal d'hybridation pour chaque sonde se fait par un scanner : l'intensité de fluorescence mesurée par le scanner permet une mesure de l'abondance relative de chacun des fragments d'ADN présents dans l'échantillon à exploiter.

Figure 9 : Un des principes des puces à SNP (site Université Pierre et Marie Curie).



L'ADN analysé est marqué par un fluorochrome.

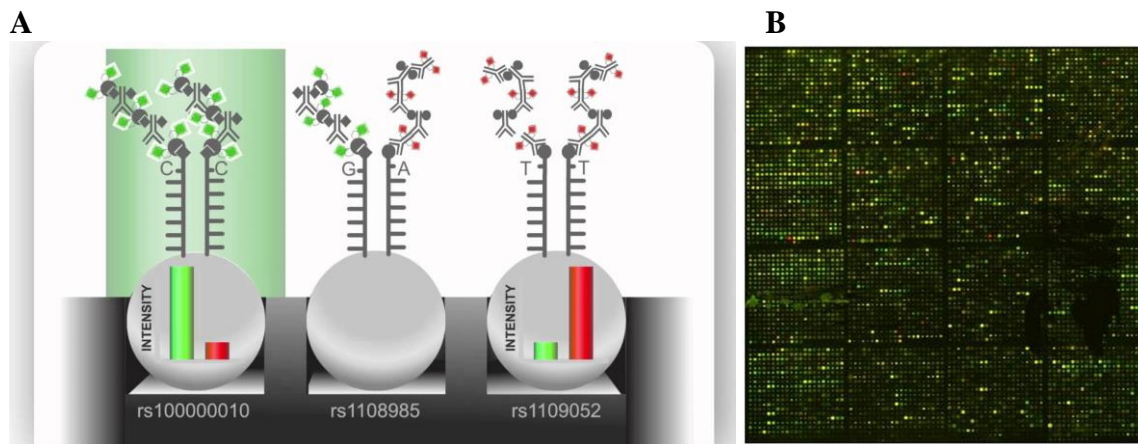
Ici, seules deux formes de sondes ont été représentées

- TCGGAG
- TCAGAG

Le sujet qui a fourni l'ADN ne porte que la forme G et pas A, il est homozygote G/G.

Une autre méthode, employée par la société leader dans le domaine des puces à marqueurs SNP (la société Illumina : www.illumina.com) consiste à hybrider l'ADN non marqué de l'individu sur la puce et ensuite à réaliser une extension d'un nucléotide avec des désoxyribonucléotides marqués par fluorescence (Figure 10).

Figure 10 : Hybridation et révélation d'une puce à SNP (www.illumina.com).



A : trois marqueurs SNP sont représentés (rs). Les oligonucléotides sont fixés sur des billes, chacune prisonnière d'un puit sur la puce. Le dernier nucléotide représenté est marqué par un fluorochrome vert ou rouge.

Pour le premier SNP (rs100000010) l'individu est homozygote C/C, on ne verra qu'un signal vert. Pour le deuxième SNP (rs1108985) l'individu est hétérozygote G/A, on verra un signal jaune (rouge + vert). Pour le troisième SNP (rs1109052) l'individu est homozygote T/T, on verra un signal rouge.

B : photo d'une puce SNP révélée, montrant la fluorescence verte, jaune ou rouge.

Une puce à SNP pouvant contenir plusieurs dizaines de milliers d'oligonucléotides, cela permet d'explorer rapidement l'ensemble du génome. La puce SNP canine employée actuellement contient 170 000 SNP (CanineHD BeadChip array : www.illumina.com et Annexe 1).

Les puces à SNP présentent donc de nombreux avantages malgré certains inconvénients (Tableau 4).

Tableau 4 : Avantages et inconvénients de puces à SNP (Kaplan et Delpéch, 2007 ; Devaux, 2016).

Intérêts	Limites
Pas de mise en culture des cellules à analyser Analyse l'ADN de tout type de tissus. Technique hautement résolutive (< 150 Kb) Analyse pangénomique qui ne nécessite pas d'avoir une idée préalable des chromosomes impliqués.	Anomalies chromosomiques équilibrées non détectables. Seuil de sensibilité faible. Plateau technique onéreux. Coût (entre 150 et 250 euros par chien).

c. Le séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN, consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné.

Les premières techniques de séquençage ont été développées en parallèle au milieu des années 1970. Il s'agissait des techniques de :

- Sanger (Grande-Bretagne)
- Maxam et Gilbert (Etats-Unis)

Toutes deux ont été récompensées d'un prix Nobel de chimie en 1980.

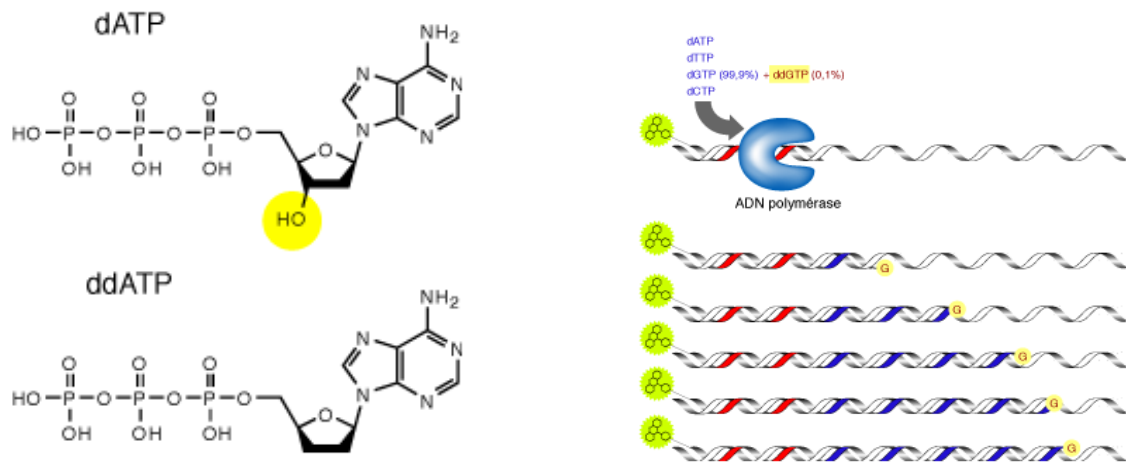
Le premier organisme a été séquençé en 1977. Il s'agissait du virus bactériophage ϕ X174, possédant un ADN simple brin.

L'apparition des séquenceurs automatiques a notamment permis l'automatisation de ces technologies et a contribué à la finalisation du séquençage du génome humain en 2003.

Seule la méthode de Sanger est encore utilisée à l'heure actuelle.

Elle est basée sur l'utilisation de nucléotides modifiés ou didésoxy-nucléotides (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP). L'ADN à séquençer est dénaturé pour être sous forme simple brin puis on utilise une amorce et une ADN polymérase pour synthétiser le brin complémentaire du fragment à séquençer (l'amorce est spécifique de ce fragment). Les nucléotides modifiés ne possèdent pas un groupement -OH nécessaire à la polymérisation, donc une fois qu'ils sont intégrés par l'enzyme ADN polymérase dans la formation du brin, la réplification du brin s'arrête. On ajoute au mélange réactionnel des nucléotides modifiés et des nucléotides normaux. Il se forme donc de nombreux fragments d'ADN, tous interrompus à un endroit différent, du fait de l'incorporation aléatoire d'un nucléotide modifié (*Figure 11*).

Figure 11 : Formule d'un nucléotide modifié et présentation de son mode d'action lors de la polymérisation (site Bio Web).



Les quatre nucléotides modifiés sont marqués chacun par un fluorochrome différent. Le mélange est ensuite soumis à une électrophorèse dans un capillaire afin de séparer les brins en fonction de leur taille. Lors de leur migration ces derniers passent devant un laser qui détecte la fluorescence (Figure 12). En lisant les pics successifs de fluorescence on peut reconstituer la séquence du morceau d'ADN initial (Figure 13 ; et Kaplan et Delpech, 2007).

Figure 12 : Principe de la méthode de séquençage de Sanger (site Parlons Science et Curiosité).

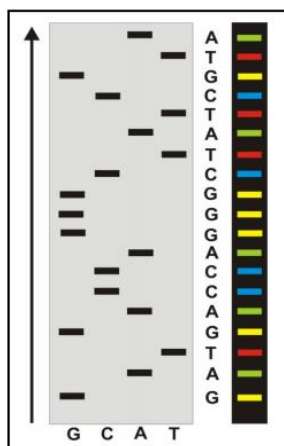


Figure 1A (gauche) : Électrophorèse en gel standard.
Figure 1B (droite) : Séquençage à l'aide de fluorophores.

A gauche : électrophorèse en gel standard :

La migration s'effectue à partir de quatre puits contenant chacun un type de nucléotide modifié.

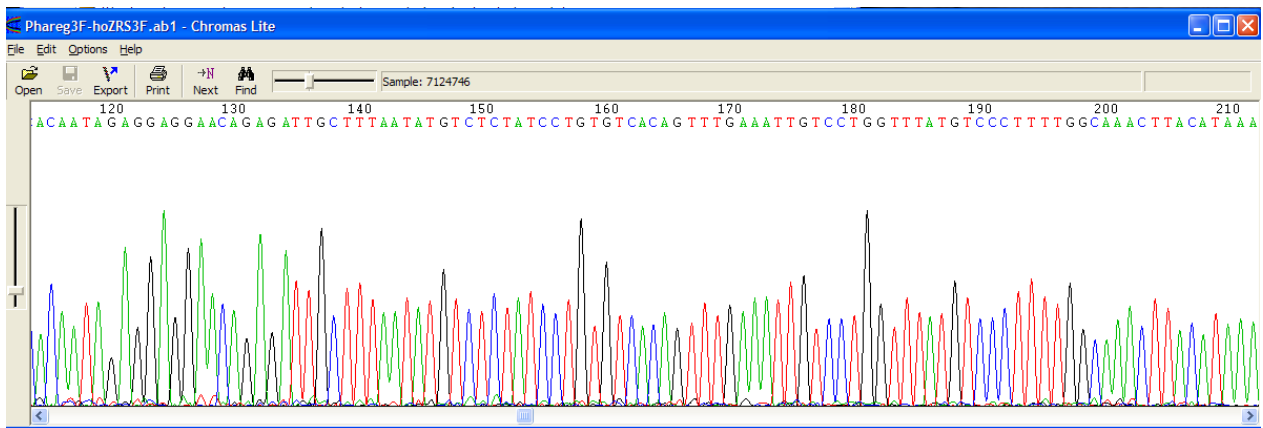
Les brins migrent et s'arrêtent selon leur taille (et poids moléculaire). Le dernier nucléotide du brin correspond au nucléotide modifié du puit correspondant. La séquence complète peut alors être reconstituée.

A droite : électrophorèse avec utilisation de fluorochromes :

Chaque nucléotide modifié est marqué par un fluorochrome (vert pour ddATP, rouge pour ddTTP, jaune pour ddGTP et bleu pour ddCTP).

Les brins migrent et s'arrêtent selon leur taille (et poids moléculaire). L'enchaînement des couleurs permet de reconstituer la séquence complète.

Figure 13 : Résultat d'un séquençage Sanger avec fluorochromes (Marie Abitbol, données personnelles).



Aujourd'hui, la plupart des séquençages sont réalisés par des séquenceurs industriels entièrement automatisés. Ceux-ci utilisent la technique de Sanger avec fluorochromes et permettent de séquençer jusqu'à 1000 bases.

Depuis 2008, le développement de séquenceurs de nouvelle génération (*Next Generation Sequencing* ou NGS) a permis d'améliorer encore les rendements. La technologie employée par ces séquenceurs est totalement différente de celle de Sanger. Ces séquenceurs permettent de séquençer de courts fragments (en général une trentaine de nucléotides) mais génèrent des millions de séquences en même temps. Les coûts de séquençage ont ainsi énormément baissé et le temps d'analyse également (Metzker, 2010).

Tableau 5 : Comparaison séquenceur classique et séquenceur de nouvelle génération (Kaplan et Delpech, 2007).

Séquenceur classique	Séquenceur nouvelle génération
Analyse de 96 échantillons en même temps	Analyse de plusieurs millions échantillons en même temps
Fragments produits de taille élevée : 650 à 900 pb	Fragments produits de taille réduite : 35 à 400 pb
Nécessité d'une certaine quantité d'ADN	Peu d'ADN nécessaire

2. Les stratégies générales d'identification de gènes et de mutations

Pour identifier des gènes ou des mutations, plusieurs approches sont possibles. On distingue les stratégies appelées « gènes candidat » des stratégies dites « pangénomiques ».

Les approches pangénomiques ne font aucune hypothèse sur le gène recherché et l'identifient grâce à sa position dans le génome. Ces approches pangénomiques utilisent des marqueurs génétiques. Il s'agit de génotyper des individus présentant le phénotype d'intérêt et des individus contrôles, pour un grand nombre de marqueurs répartis sur tous les chromosomes. Selon le type de relation qui existe entre les individus génotypés (familles ou cohortes cas/contrôles) on utilise deux stratégies d'analyse des données de génotypage différentes : les études de liaison, sont réalisées lorsque l'on a génotypé une/des famille(s) alors que les études d'association sont utilisées lorsque l'on a génotypé deux cohortes d'individus atteints et contrôles, sans relations familiales.

a. Les analyses de liaison

Le principe des analyses de liaison est celui de la cartographie génétique (Kaplan et Delpech, 2007 ; Ruysen-Witrand, 2016). On cherche à établir les distances génétiques entre des locus (en général la mutation que l'on recherche et un marqueur) en exploitant le pourcentage de recombinaisons à la méiose (capacité des allèles à se réassocier lors des *crossing over*).

La cartographie génétique est basée sur le principe que deux locus situés sur le même chromosome maintiendront d'autant plus fréquemment leur association après la méiose, que la distance physique les séparant est faible, ainsi :

- deux locus liés (= physiquement proches) ségrègent ensemble lors de la méiose,
- deux locus indépendants (= éloignés) ségrègent indépendamment lors de la méiose.

La distance génétique (notée D) entre deux locus se calcule à partir de la fréquence de recombinaison entre ces locus suite à la méiose (notée θ).

L'unité est le centimorgan (noté cM). Un cM correspond à 1% de produits recombinés soit un «segment» de chromatine sur lequel la probabilité de *crossing over* par méiose est de 1% (Kaplan et Delpech, 2007).

Quand $\theta = 0,5$, les locus sont dits indépendants génétiquement : on ne peut pas déterminer la distance génétique les séparant.

Ceci peut signifier que les deux locus sont sur des chromosomes différents ou très éloignés sur le même chromosome.

Quand $\theta < 0,5$, les marqueurs sont liés génétiquement.

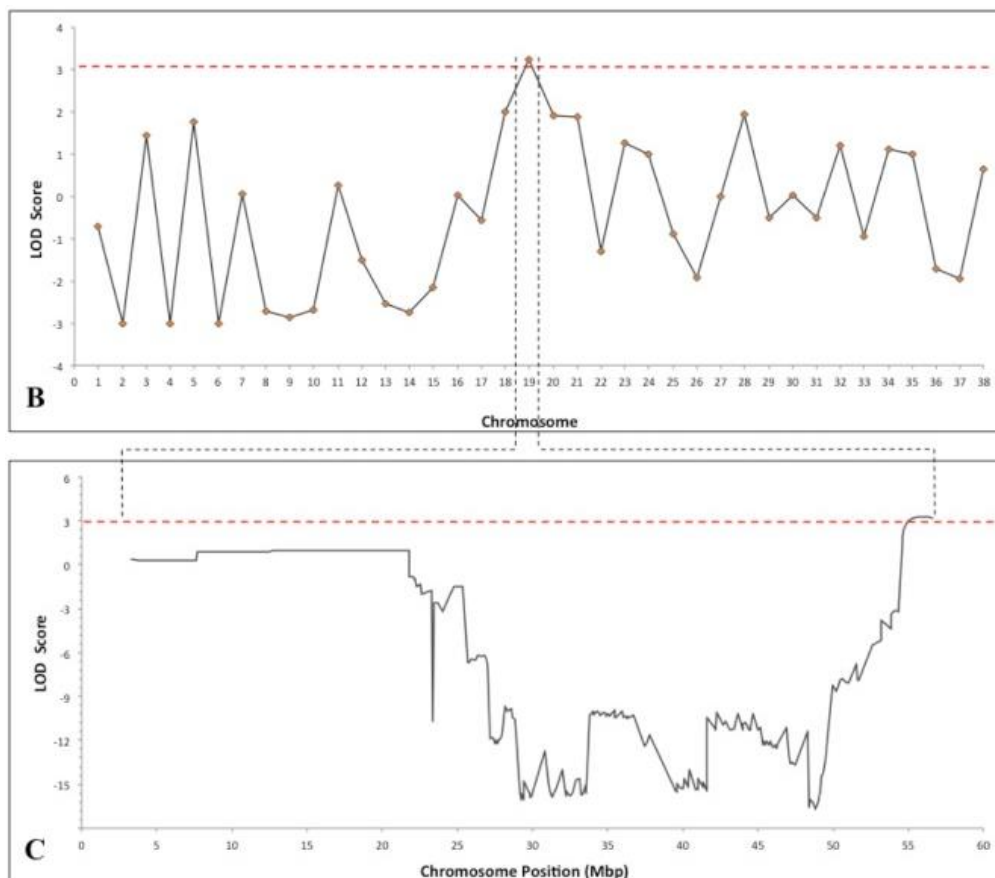
Ceci signifie que les locus sont proches sur le même chromosome: la probabilité d'avoir un *crossing over* entre les deux locus est d'autant plus faible qu'ils sont proches.

Le LOD score (noté Z) est un indicateur statistique servant à estimer la probabilité de liaison de deux locus (le gène/la mutation recherché(e) et un marqueur connu) dans des familles où l'on a génotypé des individus atteints et des individus contrôles.

Cette méthode d'analyse de liaison est fréquemment utilisée pour des études sur différentes familles de petite taille.

Lorsque l'on a génotypé la/les famille(s) avec plusieurs marqueurs connus, on utilise la méthode des LOD score multipoint : on réalise des courbes de LOD scores calculés entre le gène/la mutation recherché(e) et tous les marqueurs connus dans la même région chromosomique. Le pic le plus élevé de LOD score sur la courbe correspond au locus le plus probable du gène/ de la mutation recherché(e) (*Figure 14*). La méthode étant statistique, on calcule les distances avec des intervalles de confiance. La compilation des données pour tous les chromosomes permet d'avoir une courbe de LOD score pangénomique sur tout le génome (*Figure 14*).

Figure 14 : Exemple de courbe de Lod score multipoint pour le glaucome à angle fermé chez le Basset Hound (Ahram et al., 2015).



B : Courbe de LOD score pangénomique pour le glaucome à angle fermé chez le Basset Hound. On note un pic de LOD score sur le chromosome 19.

C : Courbe de LOD score multipoint du chromosome 19 pour le glaucome à angle fermé chez le Basset Hound.

La valeur du seuil statistique de 3 est indiquée en pointillés.

Mbp : méga paires de bases.

L'une des limites principale des analyses de liaison est qu'il s'agit de méthodes paramétriques : il est nécessaire de connaître le mode de transmission de la mutation recherchée.

b. Les études d'association

Les études d'association reposent sur la comparaison des fréquences des allèles d'un marqueur chez des sujets témoins et des sujets cas (individus non apparentés si possible). On génotype un certain nombre de marqueurs et on compare la fréquence des allèles pour chacun de ces marqueurs entre les deux groupes, à l'aide d'un test du Chi2 (Ruysen-Witrand, 2016). Les marqueurs de choix pour ces études sont les SNP, facilement génotypables à l'aide des puces à SNP.

L'étude d'association cherche à mettre en évidence un déséquilibre de liaison entre les allèles d'un marqueur et les allèles du locus de la maladie/du caractère recherché(e).

Un déséquilibre de liaison entre deux locus est défini par l'existence d'une combinaison d'allèles à ces locus plus fréquente que celle attendue sous l'hypothèse d'indépendance des locus (Kaplan et Delpech, 2007).

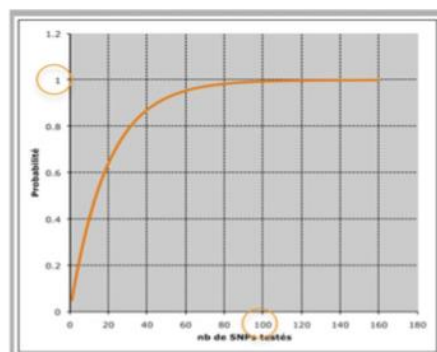
Ainsi, la méthode consiste à génotyper un maximum de marqueurs génétiques de type SNP (170 000 chez le chien) chez un grand nombre de sujets présentant le caractère étudié et un grand nombre de sujets témoins (Dina, 2016).

La méthode, appelée GWAS (*Genome Wide Association Study*) consiste en des études d'association entre un allèle donné d'un SNP et le phénotype "atteint" ou "indemne". Elle repose donc sur le déséquilibre de liaison génétique (LD = « linkage disequilibrium » en anglais) qui existe au sein du génome canin entre un allèle d'un marqueur génétique (SNP) et un variant génétique potentiellement impliqué dans le phénotype étudié.

L'association d'un SNP avec le caractère étudié est testée par un test du Chi2 au risque statistique 5%. Une association sera réputée significative quand il n'y a que 5% de chances que cette affirmation soit fausse. En d'autres termes il y a 5% de chances que l'association soit trouvée positive par hasard (Vasseur, 2010).

Le problème est que plus le nombre de SNP étudiés augmente, plus le risque que l'association mise en évidence soit due au hasard est grand : pour deux SNP le risque est de 10%, pour 3 SNP il est de 11,4%, et à partir de 100 SNP le risque est quasiment de 100% (*Figure 15*).

Figure 15 : Courbe du risque de mettre en évidence une association due au hasard en fonction du nombre de SNP étudiés (Vasseur, 2010).



Une méthode classique pour prendre en compte ce problème est de diminuer le seuil de significativité individuel : c'est le principe de la correction de Bonferroni qui prend en compte le nombre de SNP testés (Dina, 2016).

La méthode GWAS aura donc tendance à ne pouvoir détecter que les effets génétiques importants. C'est un phénomène que l'on peut présenter comme un "bruit de fond statistique" (Figure 16). Une manière de contourner ce problème est de travailler sur des effectifs importants de cas et de témoins. En effet pour un même effet biologique ou physiologique testé, si la probabilité associée à la significativité du test statistique est de 0.05 avec 100 cas et 100 témoins elle peut être de 0,001 avec deux fois plus de sujets.

Figure 16 : Illustration du « bruit de fond statistique » en cas de méthodes GWAS (Vasseur, 2010).



La méthode GWAS représente une méthode puissante d'identification de locus impliqués dans des maladies mendéliennes mais aussi dans des caractères complexes. C'est la méthode de choix pour rechercher des variants génétiques impliqués dans des maladies multifactorielles.

Chez le Chien, il a de plus été montré que le déséquilibre de liaison global au sein de chacune des races canines était grand. Cela signifie que chez les chiens de race, peu de marqueurs génétiques et peu de chiens suffisent pour identifier des régions chromosomiques en cause dans des caractères d'intérêt (Lindblad-Toh *et al.*, 2005). La spécificité de la génomique canine sera abordée en détail dans le paragraphe 3.

Par ailleurs, les tests statistiques d'association peuvent être biaisés en cas d'effet de stratification. Cela se produit lorsque la population initiale supposée homogène est en réalité un mélange de deux ou plusieurs sous-populations aux caractéristiques très différentes. Le facteur sous-population peut alors jouer le rôle de facteur de confusion. Il existe néanmoins des méthodes d'analyse pour s'en affranchir (Ruysse-Witrand, 2016).

Une fois la région chromosomique identifiée (par étude de liaison ou d'association), l'inventaire des gènes présents dans la région est réalisé à l'aide des bases de données de génomique. Le génome du Chien a été séquencé en 2005 (Lindblad-Toh *et al.*, 2005) et la séquence annotée est disponible (<http://www.ensembl.org>). Il convient ensuite d'examiner chacun des gènes pour établir une liste de priorité en fonction du profil d'expression de chacun des gènes (si on s'intéresse à un phénotype de pelage, on s'intéressera aux gènes exprimés dans la peau et dans le follicule pileux par exemple), et en fonction de leurs rôles supposés ou connus. Une liste de gènes candidats est ainsi dressée. Chaque gène candidat est ensuite séquencé chez un individu atteint et un individu contrôle, afin de rechercher des variants de séquence. Chaque variant est ensuite analysé afin de déterminer son impact sur l'ARN/la protéine codée et une étude de population permet de vérifier que le génotype muté n'est retrouvé que chez les individus atteints. Pour terminer l'étude, une validation fonctionnelle de la mutation identifiée peut être entreprise. Il s'agit d'une étape parfois longue et complexe, qui n'est pas toujours réalisée lors des études de génétique canine.

c. Stratégies de séquençage à haut débit *Whole Exome Sequencing*, *RNA-Seq* et *Whole Genome Sequencing*

La révolution du séquençage de nouvelle génération (NGS) a ouvert la voie à de nouvelles approches pour rechercher des mutations.

La stratégie la plus large consiste à séquencer, de façon massive, tout le génome d'un individu atteint (*Whole Genome Sequencing*, *WGS*), et de le comparer à celui d'un panel d'individus contrôles également séquencés. Le nombre de variants identifiés à l'issue du séquençage peut être colossal et seul un panel d'un grand nombre de contrôles (de différentes races dans le cas du chien) permet de filtrer les variants qui ne sont que des polymorphismes sans rapport avec le phénotype étudié. Cette approche a déjà été utilisée avec succès chez le chien (*Sayyab et al.*, 2016).

En partant du principe que les séquences codantes ne représentent qu'une faible partie du génome mais concentrent 85% des mutations potentiellement responsables des maladies, des méthodes permettant de "capturer" l'ensemble des séquences codantes ("*Whole Exome*") et d'en déterminer la séquence ("*Whole Exome Sequencing*") ont été développées. Ces méthodes WES permettent d'identifier en théorie la quasi-totalité des variations de séquences qui existent au niveau des séquences codantes entre des sujets atteints et des sujets indemnes (Ruyssen-Witrand, 2016 ; Vasseur, 2010). Le WES a été utilisé avec succès chez le Chien (par exemple pour le glaucome à angle fermé chez le Basset Hound (*Ahram et al.*, 2015)).

Enfin, il est également possible d'extraire tous les ARN d'un tissu d'un individu atteint pour les séquencer. Cette approche, semblable au WES, mais qui permet en plus d'identifier des mutations affectant l'épissage, a été appelée RNA-Seq. Elle a déjà permis d'identifier des mutations chez le Chien (pour exemple : (*Waluk et al.*, 2016)).

d. Approche gène-candidat

Cette stratégie consiste à rechercher et analyser les variants génétiques dans des gènes dont la fonction ou la position fait d'eux des candidats pour le phénotype étudié. La question posée étant : « *le variant génétique est-il plus fréquent chez les sujets présentant le caractère que chez les témoins ?* » (Ruyssen-Witrand, 2016).

Elle repose sur une bonne connaissance :

- de la physiologie et de la fonction du gène « mis en examen »,
- et de ses interactions avec les autres partenaires impliqués dans la même voie métabolique qui pourrait être incriminée dans le phénotype étudié.

Une fois les variants génétiques identifiés (en général par séquençage direct de l'ADN de sujets atteints et de sujets témoins) il reste à conclure sur chacun quant à son rôle (ou son absence de rôle) dans le caractère étudié. Cette stratégie repose sur les connaissances acquises du rôle du gène dans une autre espèce ou sur la position du gène, dans une région orthologue, chez une autre espèce. Il s'agit d'une stratégie simple mais qui ne permet pas d'identifier de nouveaux gènes, contrairement aux stratégies pangénomiques.

Les intérêts et les limites de chacune de ces stratégies sont regroupés dans le *Tableau 6*.

Tableau 6 : Intérêts et limites des différentes stratégies d'identification de mutations.

Stratégie d'approche	Intérêts	Limites
Pangénomique étude de liaison	Ne nécessite aucune hypothèse sur le gène recherché. Réalizable sur des familles de petite taille.	Nécessité de connaître le mode de transmission de la mutation recherchée. Nécessité de connaître la pénétrance.
Pangénomique GWAS	Utilisation de marqueurs (SNP) facilement génotypables grâce aux puces à SNP. Méthode applicable aux maladies mendéliennes et multifactorielles. Ne nécessite aucune hypothèse sur le gène recherché.	Présence de « bruit de fond statistique » en cas d'effectifs cas/témoins peu importants. Caractérisation des variants rares peu probable. Faible puissance en cas d'hétérogénéité génétique.
WGS	Séquençage de l'ensemble du génome. Utilisation possible de plusieurs races de chiens pour former les individus contrôles d'une même étude.	Nécessité d'un grand nombre d'individus contrôles. Analyse des données très lourde.
WES	Caractérisation des variants rares possible.	Mise en évidence de variations de séquences uniquement au niveau des séquences codantes.
RNA-Seq	Caractérisation des variants rares possible. Permet d'identifier des mutations affectant l'épissage.	Mise en évidence de variations de séquences uniquement au niveau des séquences codantes.
Gène candidat	Simple	Nécessité d'une bonne connaissance des fonctions des gènes. Nécessité d'une bonne connaissance des régions chromosomiques conservées entre espèces (conservations de synténies). Analyse que des gènes connus dont la fonction est connue et qui présente un rapport à priori évident avec le caractère : pas de découverte de nouveaux gènes possible.

3. Particularités du génome canin et conséquences sur l'identification de locus d'intérêt chez le Chien

Le génome du Chien est le cinquième génome de mammifère entièrement séquencé après ceux de l'Homme, de la Souris, du Rat et du Chimpanzé. Ce séquençage a été finalisé en 2005 (Lindblad-Toh *et al.*, 2005) à partir de l'ADN d'une chienne Boxer (appelée Tasha) sélectionnée parmi beaucoup d'autres chiens de diverses races pour son faible niveau d'hétérozygotie.

Il a alors été mis en évidence que le génome canin était constitué d'environ 20 000 gènes avec une taille globale plus faible que celle du génome humain : 2,4 Giga bases (Gb) pour le Chien comparé à 2,9 Gb pour l'Homme. Cette différence est probablement liée au plus faible pourcentage de séquences répétées dans le génome canin (34% chez le Chien comparé à 46% chez l'Homme).

De plus, l'hypothèse émise après le séquençage du génome de la Souris selon laquelle 5% des éléments fonctionnels du génome serait commun aux mammifères a été renforcée par le séquençage du génome canin (Lindblad-Toh *et al.*, 2005).

L'étude de Lindblad-Toh *et al* en 2005 a également démontré qu'il existait un SNP toutes les 900 paires de bases (1/900 bp) en moyenne chez le chien.

Le Chien est alors apparu comme un modèle pertinent pour l'étude des maladies héréditaires et la pathologie comparée.

La particularité majeure de l'espèce canine réside dans son nombre important de races, chacune sélectionnée par l'Homme. Chaque race présente ses caractéristiques propres : d'esthétiques, d'aptitudes, de comportement mais aussi de sensibilité aux maladies héréditaires.

Dans le cas d'une étude réalisée au sein d'une race, si un gène présente plusieurs variants différents causant un même caractère ou si le caractère étudié est polygénique, l'analyse sera complexe et la puissance statistique restreinte (Vaysse, 2011.). Cette situation est cependant un cas moins fréquent chez le Chien que chez l'Homme car la structure de la population canine implique le plus souvent un fort effet fondateur (les races sont toutes issues d'un petit nombre d'individus de départ et les croisements entre races sont très rares, ainsi on peut supposer que chez un ancêtre commun à tous les malades s'est produite une mutation responsable de la maladie observée).

De plus, il est beaucoup plus facile de travailler sur des familles de plusieurs générations chez le Chien que chez l'Homme en raison de la possibilité de réaliser à la demande de nouveaux croisements.

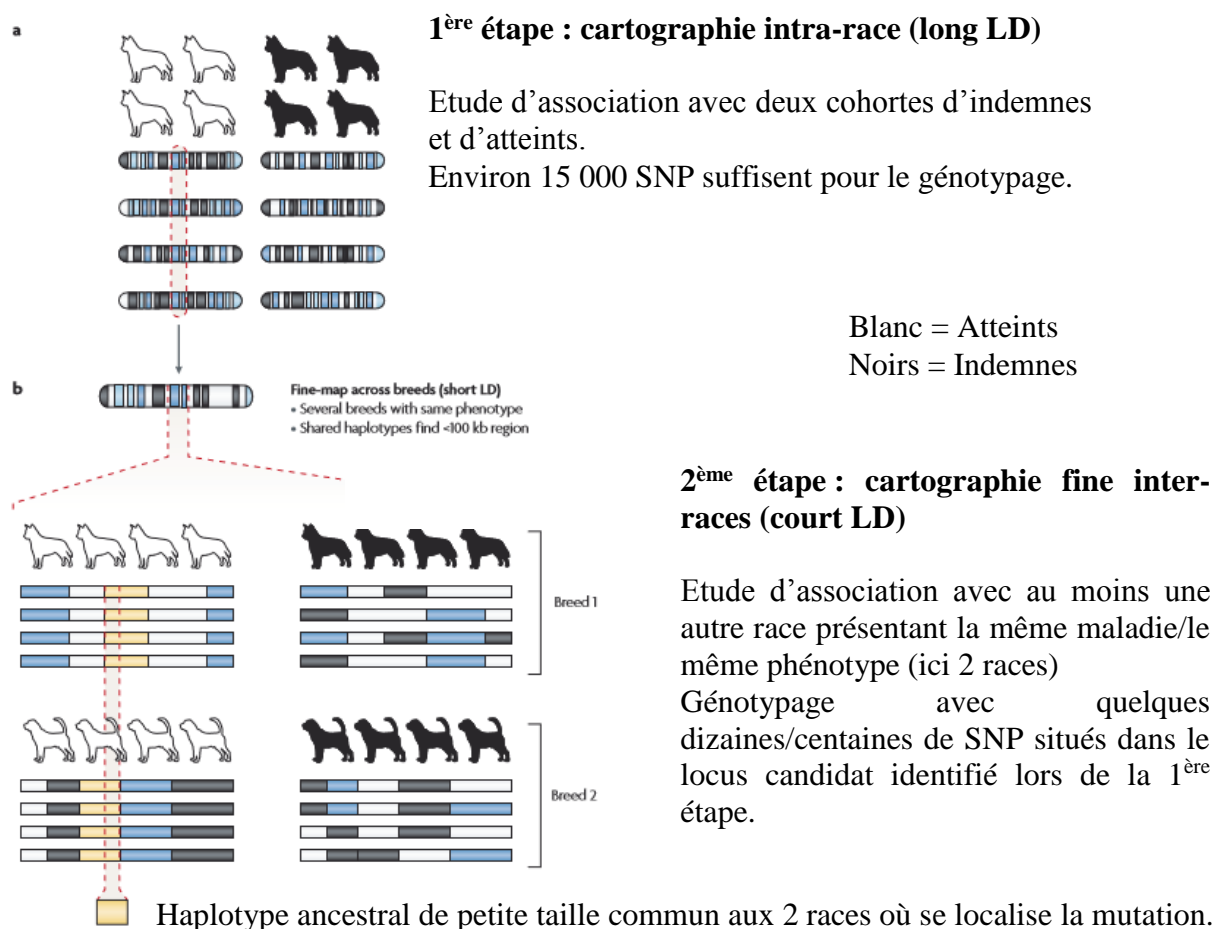
Enfin, l'espèce canine présente plusieurs avantages par rapport aux souris (espèce de référence d'alors). Le Chien développe des maladies génétiques spontanées (et non induites comme c'est souvent le cas chez la Souris) et présente souvent les mêmes symptômes que l'Homme (ce qui n'est pas toujours le cas de la souris). En plus, le Chien partage le même environnement que son maître: alimentation, exposition à des produits carcinogènes et stress, ce qui est intéressant pour analyser la part de l'environnement et de la génétique (Wayne et Ostrander, 2007).

En ce qui concerne les études d'association, le modèle canin est extrêmement adapté car les déséquilibres de liaison génétiques (LD : *linkage disequilibrium*) observés au sein des races canines sont 50 fois supérieurs à ceux observés en génétique humaine (Lindblad-Toh *et al.*, 2005).

Le séquençage du génome du Chien a également mis en évidence que le LD au sein d'une race pourraient aller jusqu'à plusieurs Mb alors que le LD inter-races ne dépasseraient pas la dizaine de kb (Lindblad-Toh *et al.*, 2005). Cette différence serait le reflet de deux éléments importants de l'histoire du Chien : la domestication puis la sélection pour la création de nouvelles races.

Ces découvertes sur les déséquilibres de liaison inter- et intra-races ont permis la mise au point d'une méthode spécifique à l'espèce canine de cartographie de mutations/locus en deux étapes (Figure 17 ; Karlsson et Lindblad-Toh, 2008 ; Shearin et Ostrander, 2010). Dans un premier temps, la cartographie se réalise dans une race donnée avec généralement utilisation de deux cohortes (parfois restreintes à quelques individus) d'indemnes et atteints (pour une maladie ou pour un caractère d'intérêt) suivis d'un génotypage avec puces à SNP. Cette cartographie initiale permet l'identification du locus candidat. Comme nous l'avons indiqué, le LD à l'intérieur d'une race étant grand, la première étape de cartographie permet d'identifier une large région (le locus candidat). La seconde étape de cartographie fine nécessite l'utilisation d'une ou plusieurs autres races de chiens présentant toutes la même maladie/le même caractère. En effet, l'haplotype ancestral commun (même combinaison d'allèles présents sur une chromatide et transmis en bloc au cours des générations car dérivant d'un ancêtre commun) aux différentes races est de petite taille et le LD entre les races étant faible, cela permet d'être plus précis et de raccourcir la taille du locus candidat, afin d'avoir moins de gènes à étudier pour identifier la mutation causale.

Figure 17 : Illustration de la cartographie en deux étapes lors d'études d'association chez l'espèce canine (Karlsson et Lindblad-Toh, 2008).



B. Les anomalies vertébrales recensées chez les mammifères, déterminisme génétique

Les anomalies vertébrales, quelle que soit leur localisation sur la colonne, ont déjà fait l'objet de recherches génétiques chez différentes espèces : l'Homme, la Souris, les animaux de rente et les animaux domestiques.

Dans le cas de l'Homme et de la Souris, les deux espèces les plus étudiées, ces recherches ont pu aboutir à une localisation des gènes impliqués dans le déterminisme génétique des anomalies vertébrales.

1. Déterminisme génétique des anomalies vertébrales chez l'Homme

La base de données des maladies héréditaires humaines OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man® : <http://www.omim.org/>) a été utilisée pour recenser les gènes et locus impliqués dans les anomalies vertébrales héréditaires de l'Homme.

En utilisant les mots clés « Hemivertebra AND thoracic » et « Vertebra AND abnormalities », nous avons obtenus cent soixante-deux résultats de gènes et locus identifiés à ce jour.

Parmi ces 162 gènes et locus,

- trois gènes et locus sont impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales sur l'ensemble de la colonne (*Tableau 7*) ;
- 25 gènes et locus sont impliqués dans l'apparition d'anomalies du crâne (craniosténose, dysmorphie faciale ou malformations du crâne) (*Annexe 2*),
- et 25 gènes et locus sont impliqués dans l'apparition d'anomalies des côtes (syndrome *Short-Rib Thoracic Dysplasia* (SRTD), syndrome *CranioEctodermal Dysplasia* (CED) et syndrome *Spondylocostal Dysostosis* (SCDO)) (*Annexe 3*).

Tableau 7 : Tableau des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales chez l'Homme (d'après OMIM®).

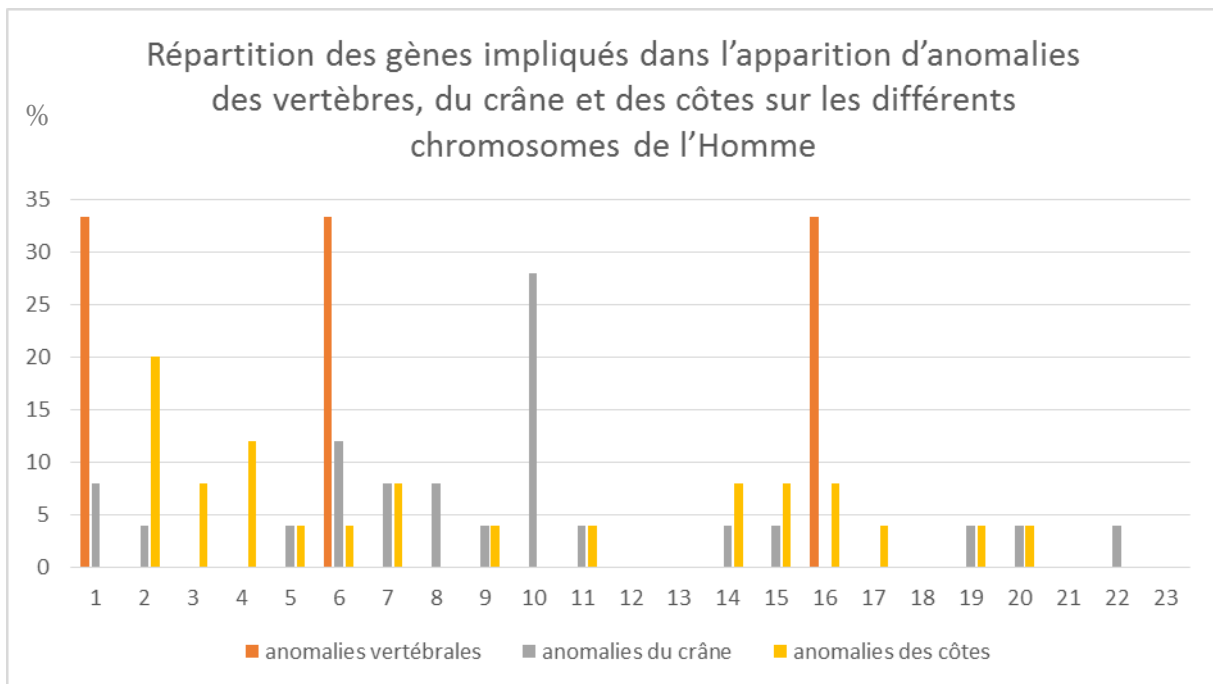
Syndrome / Clinique	Localisation Locus / Gène	Mode de transmission	Gène canin et région chromosomique canine correspondants	Numéro OMIM gène/locus
<ul style="list-style-type: none"> - anomalies squelettiques (hémivertèbres, anomalies des côtes, pectus excavatum) - dysmorphie crâniofaciale (brachycéphales, faces plates) - syndrome de retard mental - anomalies congénitales (fente palatine, déficit en hormone de croissance) 	1q24.1 <i>TMCO1</i> (<i>Transmembrane And Coiled-Coil Domains 1</i>)	Autosomique récessif	<i>TMCO1</i> Chromosome 38 : 17,579,696-17,630,212	614123
<ul style="list-style-type: none"> - anomalies de la colonne vertébrale (agénésie sacrale, ossification anormale de tous les corps vertébraux) - canal notochordal persistant au cours du développement => spina bifida cystica (SBC) ou spina bifida occulta (SBO) 	6q27 <i>T</i> (<i>Brachyury Transcription Factor</i>)	Autosomique - dominant pour anomalies du canal notochordal - récessif pour anomalies de la colonne vertébrale	<i>T</i> Chromosome 1 : 54,183,495-54,192,331	601397
Syndrome de duplication caudale : apparition de duplications des différents organes dans la région caudale (dont la partie caudale de la colonne vertébrale)	16p13.3 <i>AXIN1</i> (<i>Axin 1</i>)	*	<i>AXIN1</i> Chromosome 6 : 40,158,250-40,218,389	603816

* Mode de transmission non connu au jour du permis d'imprimer de ce manuscrit

En ce qui concerne la localisation de ces gènes (*Figure 18*), il a été mis en évidence que

- les gènes identifiés comme impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales sur l'ensemble de la colonne sont répartis sur les chromosomes 1, 6 et 16,
- les gènes identifiés comme impliqués dans l'apparition d'anomalies du crâne sont majoritairement présents sur les chromosomes 6 et 10 (40% des 25 gènes identifiés),
- et les gènes identifiés comme impliqués dans l'apparition d'anomalies des côtes sont majoritairement présents sur les chromosomes 2 et 4 (32 % des 25 gènes identifié).

Figure 18 : Répartition des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies des vertèbres, du crâne et des côtes sur les différents chromosomes de l'Homme.



2. Déterminisme génétique des anomalies vertébrales chez la souris

Le portail de génomique de la Souris MGI® (Mouse Genome Informatics® : <http://www.informatics.jax.org/>) nous a permis de rechercher les gènes et locus impliqués dans les anomalies vertébrales dans cette espèce.

En utilisant les mots clés « Hemivertebrae AND Thoracic » et « Butterfly vertebra AND Thoracic » nous avons obtenus trois cents cinq résultats de gènes et locus identifiés à ce jour.

Sur ces 305 gènes et locus,

- 195 gènes et locus sont impliqués dans des anomalies de morphologie des vertèbres,
- 43 gènes et locus sont impliqués dans des anomalies du nombre de vertèbres,
- 88 gènes et locus sont impliqués dans des anomalies du crâne (craniosténose, dysmorphie faciale ou malformations du crâne),
- et 165 gènes et locus sont impliqués dans des anomalies des côtes (nombre anormal, morphologie anormale, fusion).

Le *Tableau 8* regroupe l'ensemble des gènes identifiés chez la Souris impliqués dans l'apparition :

- d'anomalies vertébrales thoraciques,
- d'anomalies vertébrales touchant l'ensemble de la colonne mais présentes en grand nombre chez le Bouledogue Français au niveau thoracique,
- d'anomalies de développement faisant partie des hypothèses physiopathologiques pouvant expliquer l'apparition des anomalies vertébrales thoraciques du Bouledogue Français (cf I-E).

Tableau 8 : Tableau des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales et d'anomalies de développement vertébral chez la Souris (d'après MGI®).

Nom gène Syndrome / Clinique	Localisation Locus / Gène	Gène équivalent chez le Chien et chromosome	Numéro MGI gène/locus
<i>Meox 1 : mesenchyme homeobox 1</i> Hémivertèbres, fusions de côtes et vertèbres, anomalies de développement des côtes et vertèbres.	Chromosome 11, 65.48 cM	<i>MEOX1</i> Chromosome 9 : 19,620,430-19,639,908	103220
<i>Pofut 1 : protein O-fucosyltransferase 1</i> Malformations des somites (fusion de côtes, hémivertèbres, vertèbres de petite taille et morphologie anormale de la colonne vertébrale), du système vasculaire, du cœur et du système nerveux.	Chromosome 2, 75.41 cM, cytobande H2	<i>POFUT1</i> Chromosome 24 : 21,608,905-21,636,579	2153207
<i>Ror 2 : receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2</i> Anomalies squelettiques (fusion de côtes, anomalies des disques intervertébraux, morphologie anormale des vertèbres thoraciques et caudales, fusion des vertèbres caudales, hypoplasie des corps vertébraux), cardiaques et respiratoires.	Chromosome 13, 27.68 cM, cytobande B3	<i>ROR2</i> Chromosome 1 : 95,235,633-95,281,771	1347521
<i>Acan : aggregan</i> Morphologie anormale des vertèbres, des côtes et des chondrocytes, cartilage de croissance anormal, colonne vertébrale courte et absence de vertèbres caudales.	Chromosome 7, 44.88 cM	<i>ACAN</i> Chromosome 3 : 51,995,115-52,032,255	99602
<i>Arntl : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i> Morphologie anormale des côtes, du cartilage costal, des vertèbres et de la colonne vertébrale, disques intervertébraux calcifiés, hausse du nombre d'ostéoblastes, fusion des vertèbres thoraciques et sacrée.	Chromosome 7, 59.17 cM, cytobande F2-F3	<i>ARNTL</i> Chromosome 21 : 36,293,722-36,323,489	1096381

Nom gène Syndrome / Clinique	Localisation Locus / Gène	Gène équivalent chez le Chien et chromosome	Numéro MGI gène/locus
<i>Asxl 2 : additional sex combs like 2</i> Morphologie anormale des vertèbres thoraciques, lombaires et sacrées, vertèbres scindées en deux.	Chromosome 12, 1.81 cM	<i>ASXL2</i> Chromosome 17 : 19,922,541-20,044,611	1922552
<i>Chat : choline acetyltransferase</i> Cyphose.	Chromosome 14, 19.40 cM	<i>CHAT</i> Chromosome 28 : 1,480,274-1,528,776	88392
<i>Clec 3b : C-type lectin domain family 3, member b</i> Lordose, cyphose, morphologie anormale des vertèbres et des disques intervertébraux, développement anormal des corps vertébraux et des disques intervertébraux.	Chromosome 9, 73.91 cM, cytobande F1-F3	<i>CLEC3B</i> Chromosome 20 : 43,324,157-43,332,217	104540
<i>Glg 1 : golgi apparatus protein 1</i> Morphologie anormale des vertèbres caudales et des disques intervertébraux, physiologie anormale des chondrocytes.	Chromosome 8, 57.98 cM	<i>GLG1</i> Chromosome 5 : 76,020,735-76,171,572	104967
<i>Gli 2 : GLI-Kruppel family member GLI2</i> Morphologie anormale des os du crâne, des os longs, des côtes et des corps vertébraux, absence de disques intervertébraux, cartilage de développement anormal, incurvation de la colonne anormale, baisse du nombre de chondrocytes.	Chromosome 1, 52.17 cM, cytobande E2-E4	<i>GLI2</i> Chromosome 19 : 29,130,227-29,383,616	95758
<i>Hox c6 : homeobox C6</i> Vertèbres thoraciques anormales.	Chromosome 15, 58.06 cM, cytobande E2	<i>HOXC6</i> Chromosome 27 : 1,234,689-1,236,137	96197

Nom gène Syndrome / Clinique	Localisation Locus / Gène	Gène équivalent chez le Chien et chromosome	Numéro MGI gène/locus
<i>Jun</i> : <i>jun proto-oncogene</i> Scoliose, cyphose, fusion des arcs vertébraux.	Chromosome 4, 43.34 cM, cytobande C5- C7	<i>JUN</i> Chromosome 5 : 50,967,818-50,968,843	96646
<i>Ky</i> : <i>kyphoscoliosis peptidase</i> Cyphose, scoliose, absence ou morphologie anormale du noyau pulpeux, dégénérescence des disques intervertébraux, morphologie anormale des vertèbres thoraciques.	Chromosome 9, 54.54 cM	<i>KY</i> Chromosome 23 : 31,322,037-31,371,013	96709
<i>Lasp 1</i> : <i>LIM and SH3 protein 1</i> Scoliose, morphologie anormale des disques intervertébraux et du sternum, développement anormal des arcs vertébraux, pas de processus épineux, corps vertébraux courts, spina bifida occulta, baisse du nombre de vertèbres lombaires.	Chromosome 11, 61.10 cM, cytobande C-D	<i>LASPI</i> Chromosome 9 : 23,345,024-23,385,295	109656
<i>Musk</i> : <i>muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase</i> Cyphose	Chromosome 4, 31.87 cM	Gène <i>ENSCAFG00000032331</i> Chromosome 11 : 65,552,328-65,572,085	103581
<i>Nfix</i> : <i>nuclear factor I/X</i> Morphologie anormale des os du crâne, des corps vertébraux et des disques intervertébraux (voir dégénération), lordose, cyphose, scoliose, insuffisance d'ossification et de minéralisation des os, os peu denses.	Chromosome 8, 41.02 cM, cytobande C1- C2	<i>NFIX</i> Chromosome 20 : 49,117,396-49,186,623	97311
<i>Rab 23</i> : <i>RAB23, member RAS oncogene family</i> Morphologie anormale du squelette axial, développement anormal des arcs vertébraux, spina bifida occulta, anomalie du tibia et du tarse.	Chromosome 1, 12.80 cM	<i>RAB23</i> Chromosome 12 : 24,388,120-24,421,842	99833

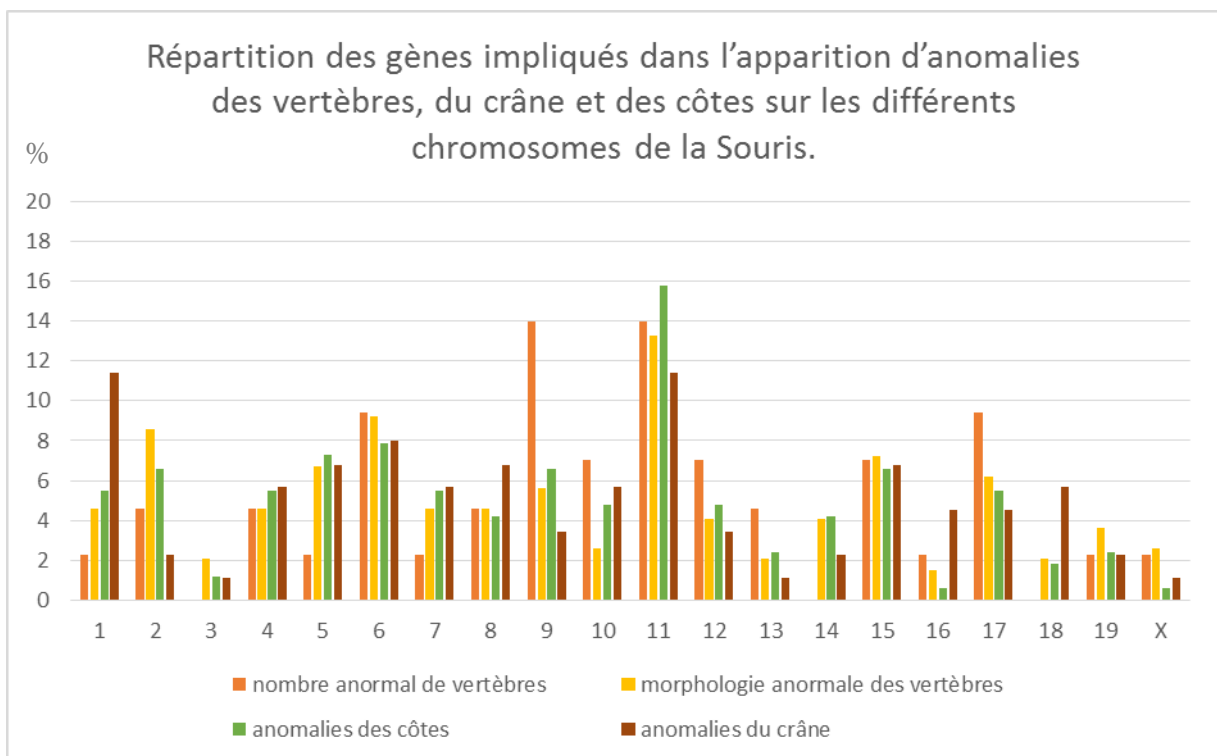
Nom gène Syndrome / Clinique	Localisation Locus / Gène	Gène équivalent chez le Chien et chromosome	Numéro MGI gène/locus
<p><i>Tbx 18 : T-box18</i></p> <p>Morphologie anormale des côtes, de l'os occipital, des vertèbres thoraciques et lombaires, des arcs vertébraux, développement vertébral anormal, fusion des côtes, disques intervertébraux de taille réduite.</p>	<p>Chromosome 9, 47.06 cM, cytobande E3.2</p>	<p><i>TBX18</i> Chromosome 12 : 44,901,083-44,929,205</p>	<p>1923615</p>
<p><i>Traf 4 : TNF receptor associated factor 4</i></p> <p>Morphologie anormale des cartilages trachéaux, des côtes, des corps vertébraux, de la colonne vertébrale et des disques intervertébraux, cyphose, scoliose, spina bifida occulta, fusion des côtes.</p>	<p>Chromosome 11, 46.74 cM, cytobande B5-C</p>	<p><i>TRAF4</i> Chromosome 9 : 42,933,750-42,939,520</p>	<p>1202880</p>

En ce qui concerne la localisation de ces gènes (*Figure 19*), il a été mis en évidence que :

- les gènes identifiés comme impliqués dans l'apparition d'anomalies de morphologie des vertèbres sont répartis sur l'ensemble des chromosomes 1 à 19 et sur le chromosome X. Quarante-cinq pour cent de ces gènes sont présents sur les cinq chromosomes suivants : 11-6-2-15 et 5.
- les gènes identifiés comme impliqués dans l'apparition d'anomalies de nombre de vertèbres sont répartis de façon assez uniforme sur l'ensemble des chromosomes à l'exception des chromosomes 3-14-18 et Y.
- les gènes identifiés comme impliqués dans l'apparition d'anomalies du crâne sont répartis sur l'ensemble des chromosomes 1 à 19 et sur le chromosome X. Cinquante et un pour cent de ces gènes sont répartis sur les six chromosomes suivants : 1-11-6-5-8 et 15.
- les gènes identifiés comme impliqués dans l'apparition d'anomalies des côtes sont répartis sur l'ensemble des chromosomes 1 à 19 et sur le chromosome X. Cinquante et un pour cent de ces gènes sont répartis sur les six chromosomes suivants : 11-6-5-2-9 et 15.

On remarque donc que chez la Souris les chromosomes 11-6-15 et 5 sont porteurs de nombreux gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies des vertèbres, du crâne et des côtes (*Figure 19*).

Figure 19 : Répartition des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies des vertèbres, du crâne et des côtes sur les différents chromosomes de la Souris.



3. Déterminisme génétique des anomalies vertébrales chez les animaux de rente et les animaux domestiques et sauvages

Nous avons utilisé la base de données des caractères héréditaires des mammifères autres que l'Homme et la Souris OMIA® (Online Mendelian Inheritance In Animals® : <http://omia.angis.org.au/home/>) pour rechercher les gènes impliqués dans le déterminisme des anomalies vertébrales chez les animaux de rente, de compagnie et sauvages.

En utilisant les mots clés « Vertebra AND thoracic », « Hemivertebra » et « Butterfly vertebra », nous avons obtenus vingt-huit résultats de gènes et locus identifiés à ce jour.

Parmi ces 28 gènes et locus,

- cinq gènes et locus sont impliqués dans des anomalies vertébrales chez les bovins (*Tableau 9*).
- cinq gènes et locus sont impliqués dans des anomalies vertébrales chez les chiens (*Tableau 10*).
- quatre gènes et locus sont impliqués dans des anomalies vertébrales chez les chats (*Tableau 11*).

Tableau 9 : Tableau des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales chez les bovins (*Bos taurus*) (d'après OMIA®).

Syndrome / Clinique	Localisation	Mode de transmission	Numéro OMIM	Numéro OMIA	Gène canin correspondant et chromosome
<p>Gène <i>SLC35A3</i> : <i>solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member A3</i></p> <p>Syndrome CVM : <i>Complex vertebral malformation</i> : Raccourcissement des parties cervicales et thoraciques de la colonne vertébrale et arthrogrypose symétrique dans les membres antérieurs et à l'occasion dans les pattes postérieures.</p>	Chromosome 3 : 43,400,346- 43,444,844	Autosomique récessif	605632	OMIA 001340- 9913	<i>SLC35A3</i> Chromosome 6 : 49,954,148- 49,999,480
<p>Gène <i>COL2A1</i> : <i>collagen type II alpha 1</i></p> <p>« Dexter type bulldog » : Nanisme, retard de croissance disproportionné caractérisé par une dysplasie aponévrotique et le raccourcissement de la colonne vertébrale et du squelette abaxial.</p>	Chromosome 5 : 32,450,298- 32,481,276	Autosomique dominant	120140	OMIA 001926- 9913	<i>COL2A1</i> Chromosome 27 : 6,756,994- 6,787,846
<p>Gène <i>F11</i> : <i>coagulation factor XI</i></p> <p>Syndrome CVM : <i>Complex vertebral malformation</i></p>	Chromosome 27: 15,350,931- 15,370,080	Autosomique récessif	264900	OMIA 000363- 9913	<i>F11</i> Chromosome 16 : 44,466,300- 44,487,120
<p>Gène <i>FANCI</i> : <i>Fanconi anemia complementation group I</i></p> <p>Poids corporel fortement réduite, retard de croissance, nombreuses malformations vertébrales entraînant une réduction significative de la colonne vertébrale et des membres longs et minces.</p>	Chromosome 21: 21,137,918- 21,198,618	Autosomique récessif	611360	OMIA 000151- 9913	<i>FANCI</i> Chromosome 3 : 52,282,997- 52,357,226
<p>Gène <i>T</i> : <i>T brachyury transcription factor</i></p> <p>Déformations et dysfonctionnements neurologiques : de très légers (seulement des déformations de la queue) à sévère (paraparésie).</p>	Chromosome 9 : 102,666,696- 102,676,022	Autosomique partiellement dominant	601397	OMIA 001951- 9913	<i>T</i> Chromosome 1 : 54,183,495- 54,192,331

Tableau 10 : Tableau des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales chez le Chien (*Canis lupus familiaris*) (d'après OMIA®).

Syndrome / Clinique	Localisation	Mode de transmission	Numéro OMIM	Numéro OMIA
Gène <i>GLB1</i> : galactosidase, beta 1 Radiographies avec ossification endochondrale anormale des épiphyses vertébrales.	Chromosome 23 : 3,732,115- 3,817,936	Autosomique récessif	611458	OMIA 000402-9615
Gène <i>HES7</i> : hes family bHLH transcription factor 7 Raccourcissement tronculaire, hémivertèbres et anomalies des côtes.	Chromosome 5 : 32,944,052- 32,947,711	Autosomique récessif	608059	OMIA 001944-9615
Gène <i>ITGA10</i> : integrin, alpha 10 Changements radiographiques : augmentation de la largeur des métaphyses distales du radius et du cubitus, retard d'ossification des os cuboïde du carpe et réduction de la longueur des corps vertébraux.	Chromosome 17 : 58,698,392- 58,711,794	Autosomique récessif	604042	OMIA 001886-9615
Gène <i>NKX2-8</i> : NK2 homeobox 8 Malformations de la moelle épinière chez un Berger Allemand, un Dalmatien et un Braque de Weimar. Malformations des corps vertébraux et des côtes associées à des anomalies de la moelle épinière avec ou sans spina bifida chez un Pékinois.	Chromosome 8 : 15,149,347- 15,151,149	Autosomique récessif	603245	OMIA 000938-9615
Gène <i>SLC13A1</i> : solute carrier family 13 member 1 A la radiographie : épiphyses reflétant la conversion aberrante du cartilage à l'os, vertèbres souvent becquée à leur surface ventrale.	Chromosome 14 : 60,685,527- 60,762,012	Autosomique récessif	606193	OMIA 001315-9615

Tableau 11 : Tableau des gènes impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales chez le Chat (*Felis catus*) (d'après OMIA®).

Syndrome / Clinique	Localisation	Mode de transmission	Numéro OMIM	Numéro OMIA	Gène canin correspondant et chromosome
<p>Gène <i>ARSB</i> : <i>arylsulfatase B</i></p> <p>Homozygotes pour la mutation L476P : Nanisme, dysmorphie faciale due à la dysplasie épiphysaire (visages larges, nez raccourcis, petites oreilles), flexibilité réduite du rachis cervical et lombaire, parésie des membres postérieurs ou paralysie due à la compression de la moelle épinière avant 8 mois. Sur les radiographies, ostéopénie généralisée et sévère dysplasie épiphysaire des vertèbres.</p>	Chromosome A1 : 143,227,105- 143,396,805	Autosomique récessif	611542	OMIA 000666-9685	<i>ARSB</i> Chromosome 3 : 27,870,151- 28,039,083
<p>Gène <i>IDUA</i> : <i>iduronidase, alpha-L-</i></p> <p>Larges faces planes, grandes têtes, petites oreilles, peau épaisse sur le cou dorsal, large vertèbres cervicales, subluxation de la hanche, démarche anormale, opacification de la cornée et certains ont un souffle cardiaque d'insuffisance mitrale.</p>	Chromosome B1 : 204,833,270- 204,846,891	Autosomique récessif	252800	OMIA 000664-9685	<i>IDUA</i> Chromosome 3 : 91,522,035- 91,534,575

4. Avancées génétiques chez le Bouledogue Français

Une étude publiée en 2016 (Schlensker et Distl, 2016) s'est intéressée à l'héritabilité des hémivertèbres chez le Bouledogue Français.

L'étude radiographique a été menée chez 105 Bouledogues Français et l'étude des pedigrees a permis de collecter des informations sur 809 animaux. Les résultats ont montré des héritabilités de :

- 0,58 (+/- 0,15) pour le nombre d'hémivertèbres,
- 0,53 (+/- 0,16) pour la sévérité des hémivertèbres (classement en quatre groupes selon la dissymétrie entre la longueur des corps vertébraux droit et gauche),
- 0,35 (+/- 0,19) pour le nombre de vertèbres coccygiennes.

De plus l'étude a révélé une corrélation entre le nombre important de vertèbres coccygiennes (queue de taille moyenne à longue) et le faible nombre et le faible degré de sévérité des hémivertèbres.

Ainsi l'hypothèse qu'une sélection des Bouledogues Français sur le caractère phénotypique « queue en tirebouchon » (correspondant anatomiquement à des hémivertèbres coccygiennes) ait augmenté le risque d'apparition d'hémivertèbres (en particulier thoraciques) est envisageable.

Cette hypothèse avait déjà été mise en avant lors d'une étude sur des Pointers Allemands à poils courts (Kramer *et al.*, 1982) et a été démontrée chez les chats Bobtail Japonais en 2015 (Pollard *et al.*, 2015).

Cette dernière étude (Pollard *et al.*, 2015) a révélé :

- le caractère autosomique dominant de la transmission du phénotype « queue Bobtail » chez les chats Bobtail Japonais,
- l'association entre le faible nombre de vertèbres coccygiennes et la présence d'anomalies vertébrales (formule vertébrale anormale, présence d'hémivertèbres caudales et présence de vertèbres transitionnelles) chez les chats Bobtail Japonais.

DEUXIÈME PARTIE :
Étude expérimentale

I. Matériel et méthodes

A. Animaux

1. Sujets

Soixante dix neuf chiens ont été inclus dans l'étude.

Ces derniers constituaient une sous-cohorte issue d'une large cohorte de 658 Bouledogues Français recrutés de façon volontaire pour une étude portant sur la recherche d'associations entre la survenue de troubles nerveux médullaires et la présence d'anomalies vertébrales thoraciques ou de certains paramètres de leur environnement (Moreno, 2014).

2. Clichés radiographiques

Les clichés radiographiques du rachis thoracique, ont permis le classement des chiens en trois grandes catégories :

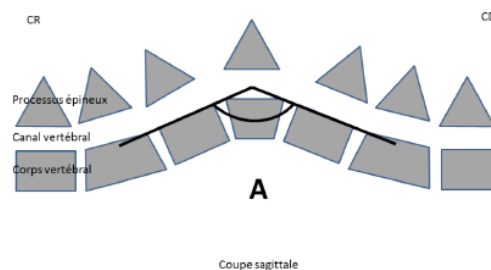
- « Indemne » : aucune anomalie vertébrale thoracique congénitale
- « Atteint » : présence d'au moins une anomalie vertébrale thoracique congénitale
- « Atteint et à surveiller cliniquement » : atteints à fort risque d'apparition de signes cliniques et donc de nécessité d'opération. Cette hypothèse était basée sur la présence de signes « d'instabilité » (spondylose intervertébrale et subluxation) et sur le degré d'angulation du rachis. Ce terme était donc subjectif et laissé à l'appréciation du clinicien lors de la lecture des clichés.

Les clichés radiographiques ont été réalisés par le vétérinaire traitant sans préparation et selon des incidences latéro-latérale et dorso-ventrale. Les clichés ont ensuite été envoyés à l'EnvA sur support argentique ou numérique. À cette occasion, le vétérinaire attestait avoir vérifié l'identité du chien, et que l'animal était indemne de troubles neurologiques au moment de l'examen

A l'EnvA, les anomalies vertébrales ont été identifiées, comptabilisées et localisées. Leurs conséquences ont ensuite été envisagées : spondylose, fusion inter-épineuse, subluxation, déformation angulaire du rachis (Krumeich, 2011).

L'angulation de la colonne vertébrale sur le site de la principale anomalie a ensuite été mesurée selon la méthode indiquée par la *Figure 20* suivante :

Figure 20 : Méthode de mesure de l'angulation de la principale anomalie (Krumeich, 2011).



3. Méthode de recrutement

Les propriétaires des différents animaux ont été contactés par téléphone (coordonnées obtenues à partir des données utilisées pour l'étude de Moreno (2014) et à partir de l'annuaire téléphonique).

Dans le cas où les propriétaires acceptaient de participer à l'étude, ils choisissaient le mode de prélèvement d'ADN de leur animal : prise de sang ou brosette buccale. Dans le premier cas un rendez-vous chez le vétérinaire traitant était nécessaire, alors que dans le second cas le propriétaire pouvait réaliser le prélèvement lui-même. Les animaux n'ont été inclus dans l'étude que lorsque la fiche de consentement était signée par le propriétaire.

Tableau 12 : Eléments envoyés aux propriétaires des chiens selon le type de prélèvement ADN choisi.

Prélèvement sanguin	Prélèvement buccal
Lettre d'information au propriétaire	Lettre d'information au propriétaire
Lettre d'information pour le vétérinaire traitant	Notice et instructions pour le prélèvement buccal
Certificat de prélèvement et fiche de consentement	Certificat de prélèvement et fiche de consentement
Deux tubes EDTA de 5mL par chien	Quatre brosettes buccales par chien
Une enveloppe retour déjà affranchie et timbrée pour les prélèvements, le pedigree et le certificat.	Une enveloppe retour déjà affranchie et timbrée pour les prélèvements, le pedigree et le certificat.

Les documents complets sont présentés en Annexe 4.

4. Critères d'inclusion

Les chiens recrutés pour notre étude devaient respecter les critères d'inclusion de l'étude de Moreno (2014) et qui correspondaient à ceux définis dans la thèse intitulée « *L'étude épidémiologique des anomalies radiographiques des vertébrales thoraciques du Bouledogue Français* » (Krumeich, 2011) :

- l'animal ne devait pas présenter le moindre symptôme neurologique le jour de la réalisation des clichés radiographiques ni en avoir présenté antérieurement à cette date (le vétérinaire réalisant les clichés radiographiques confirmait ce point);
- l'animal ne devait pas avoir été sédaté ou anesthésié lors de la réalisation des clichés radiographiques. En effet, des différences de niveaux de contraction musculaire entre animaux vigiles et non vigiles risquaient d'induire un biais dans la mesure des angles de déformation du rachis ;
- les clichés radiographiques devaient être identifiés de manière infalsifiable de manière à permettre la production d'un compte-rendu nominatif certifiant la présence ou l'absence d'anomalies vertébrales pour un chien donné ;
- les clichés radiographiques devaient être latéralisés et ne pas présenter de rotation rendant l'interprétation difficile.

De plus, les chiens n'ont été inclus dans notre étude que sous réserve du respect des conditions supplémentaires suivantes :

- les animaux « atteints » ne devaient pas être apparentés au premier degré. Ce critère n'a pas pu être appliqué aux chiens « indemnes » en raison du faible nombre de ces derniers dans l'échantillon de départ ;
- le propriétaire de l'animal devait avoir renvoyé par la poste les échantillons de sang ou les brochettes buccales accompagnés du pedigree de l'animal, du certificat de prélèvement et de la fiche de consentement.

B. Arbres généalogiques

Les données de pedigree ont été collectées auprès des propriétaires en même temps que les échantillons d'ADN.

Les arbres généalogiques, constitués à partir des pedigrees de chien inclus dans l'étude, ont été dessinés à l'aide du logiciel Genopro (<http://www.genopro.com/fr/>).

C. Extractions des ADNs

L'ADN des chiens inclus dans l'étude a été envoyé directement par les propriétaires ou vétérinaires à l'EnvA sous forme d'échantillons sanguins ou de brochettes buccales.

1. Extraction de l'ADN des échantillons sanguins

Le sang a été prélevé dans des tubes avec anticoagulant EDTA (Éthylène Diamine Tétracétique).

Ce sang fut ensuite transféré dans un tube de 50 mL.

Dans chacun de ces tubes a été ajouté 5 volumes de SLR (Solution de Lyse des globules Rouges). La SLR est constituée d'un mélange de 10 mmol/L de TRIS (Trishydroxyméthylaminométhane), 5 mmol/l de chlorure de magnésium(MgCl₂), et de 10 mmol/l de chlorure de sodium (NaCl).

Les tubes ont été ensuite placés pendant cinq minutes à température ambiante sur un agitateur à rouleaux.

Puis les échantillons ont été centrifugés à 1500 tours par minutes à 4°C pendant 10 minutes.

Le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire de globules blancs a été récupéré.

Ce culot a permis l'extraction de l'ADN avec l'automate Maxwell® Promega (Madison, Wisconsin, USA : fiche d'utilisation en Annexe 5) en se conformant aux recommandations du fabricant.

Les ADNs en solutions ont ensuite été conservés au réfrigérateur à +4°C.

2. Extraction de l'ADN des brochettes buccales

L'ADN a été extrait à l'aide de l'automate Maxwell de Promega (Madison, Wisconsin, USA) en suivant les recommandations du fabricant.

3. Concentration des ADN

La concentration des ADN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop 2000).

D. Génotypage

Les chiens ont été génotypés à l'aide de la puce haute densité canine Illumina HDCanine Bead Chip (www.illumina.com).

Après extraction et mesure de la concentration des ADN, ces derniers ont été envoyés au laboratoire LABOGENA® pour le génotypage.

E. Analyses statistiques

Les fréquences alléliques ont été comparées à l'aide d'un test du Chi² et une correction de Bonferroni pour les tests multiples a été appliquée. Le logiciel PLINK a été utilisé (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

II. Résultats

A. Arbres généalogiques

Les pedigrees de l'ensemble des chiens Bouledogue Français inclus dans l'étude ont été obtenus en même temps que les prélèvements ADN.

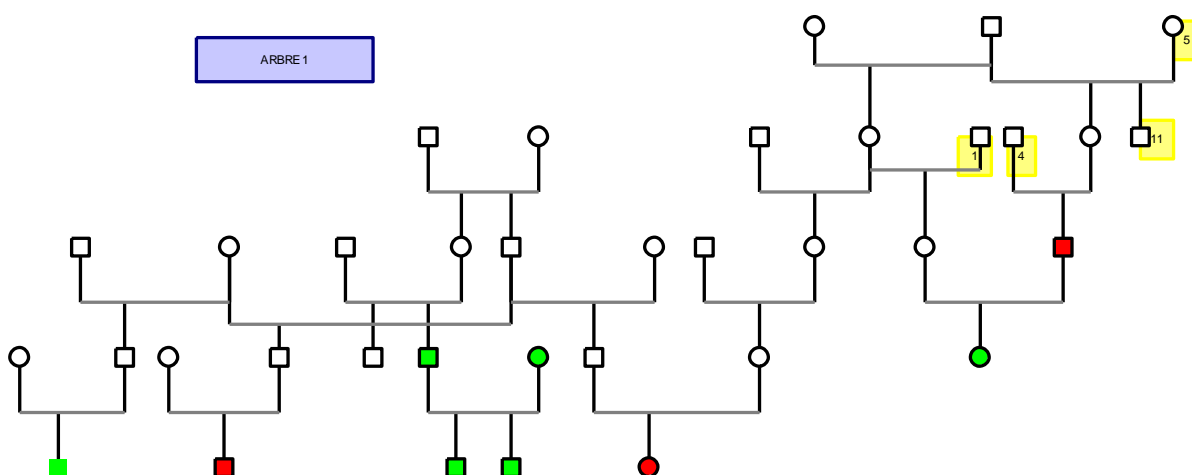
A partir de ces documents, cinq arbres généalogiques ont pu être dessinés avec le logiciel Genopro (<http://www.genopro.com/fr/>) (*Figure 21*). L'utilisation de la base de données de Moreno de 658 Bouledogues Français (qui indiquait le statut des chiens vis-à-vis de la présence ou non d'anomalies vertébrales thoraciques) a permis de compléter ces arbres pour le statut de certains ancêtres ou de certains descendants des chiens inclus dans notre étude.

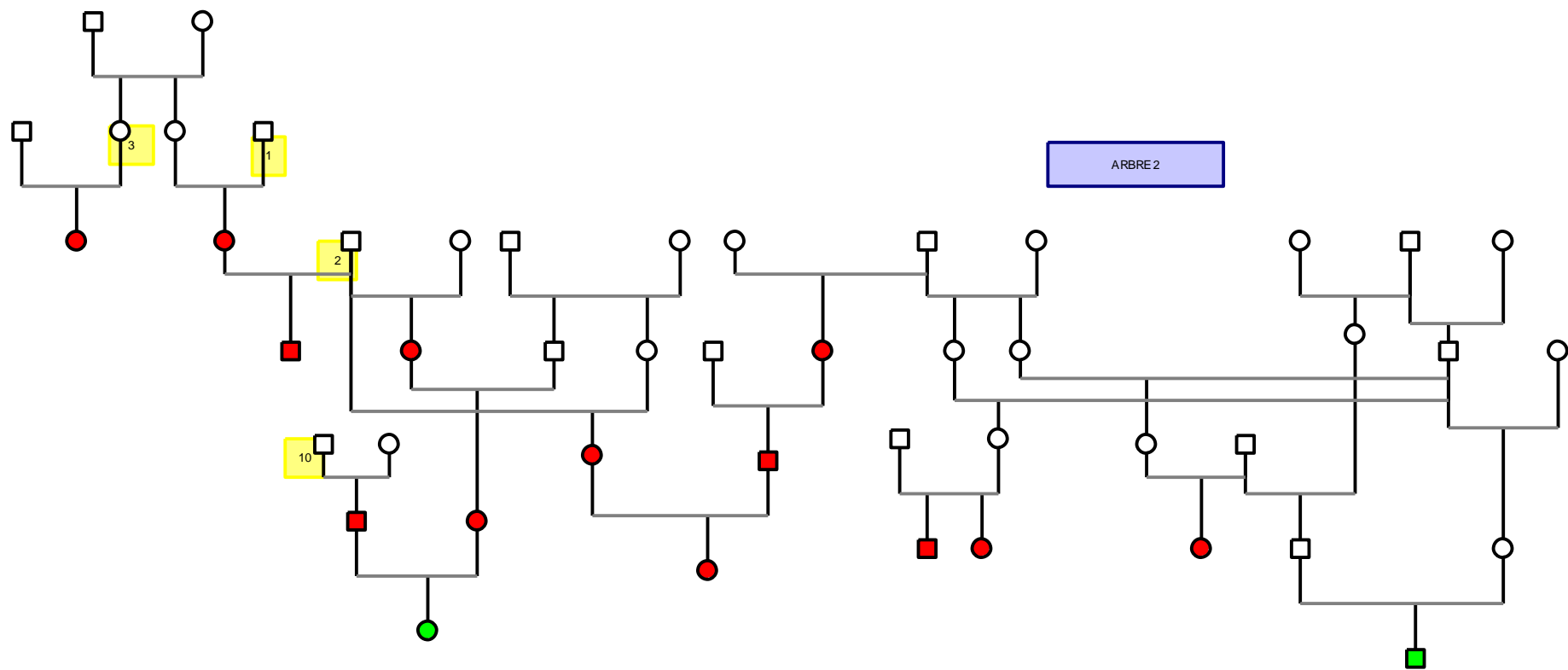
Sur les arbres généalogiques figurent en couleur les statuts « indemnes » (vert) ou « atteints » (rouge) d'anomalies vertébrales thoraciques (*Figure 21*). Certains reproducteurs Bouledogue Français ayant été très utilisés pour les croisements, nous avons, dans un souci de simplification des arbres, annoté ces animaux par un numéro (par exemple le chien 2 intervenant dans les arbres 2-3 et 4 correspond au même individu).

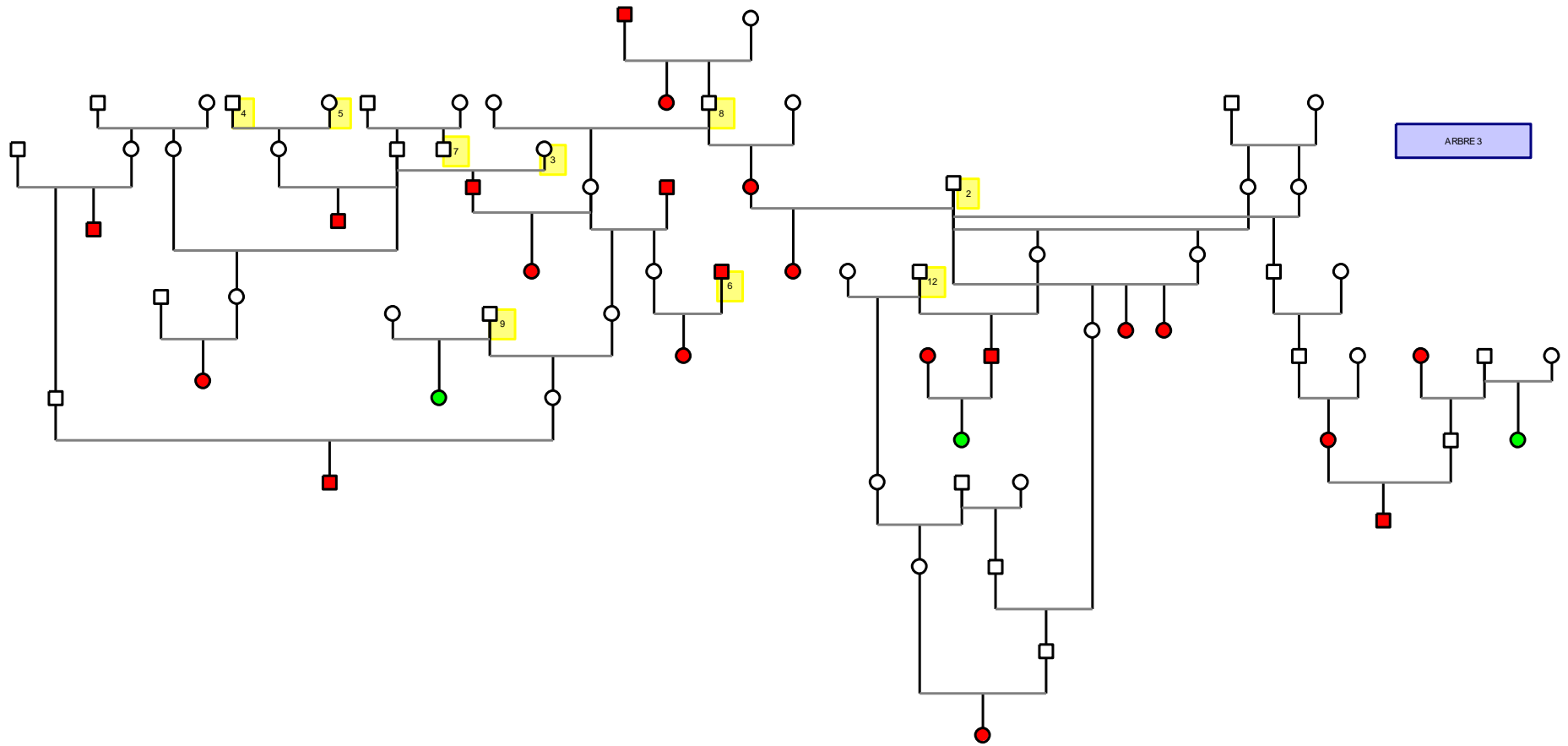
Ces arbres indiquaient qu'il semblait bien exister une transmission héréditaire des anomalies vertébrales, mais dont le mode n'était pas simple. Les individus atteints pouvaient être issus de deux parents atteints, d'un parent atteint et un parent indemne ou de deux parents de statut indéterminé. Les individus indemnes pouvaient être issus de deux parents indemnes, d'un parent atteint ou de deux parents atteints. Notons que le nombre de chiens dépistés n'a pas permis de conclure de façon définitive quant à un mode de transmission, mais que l'hypothèse la plus probable était le mode de transmission complexe ou polygénique.

De plus, la réalisation de ces arbres nous a permis de choisir parmi les ADN des chiens Bouledogue Français reçus, ceux à inclure dans l'étude génétique : les chiens atteints sélectionnés devaient être les moins apparentés possible et les familles présentant à la fois des chiens atteints et indemnes ont toutes été conservées.

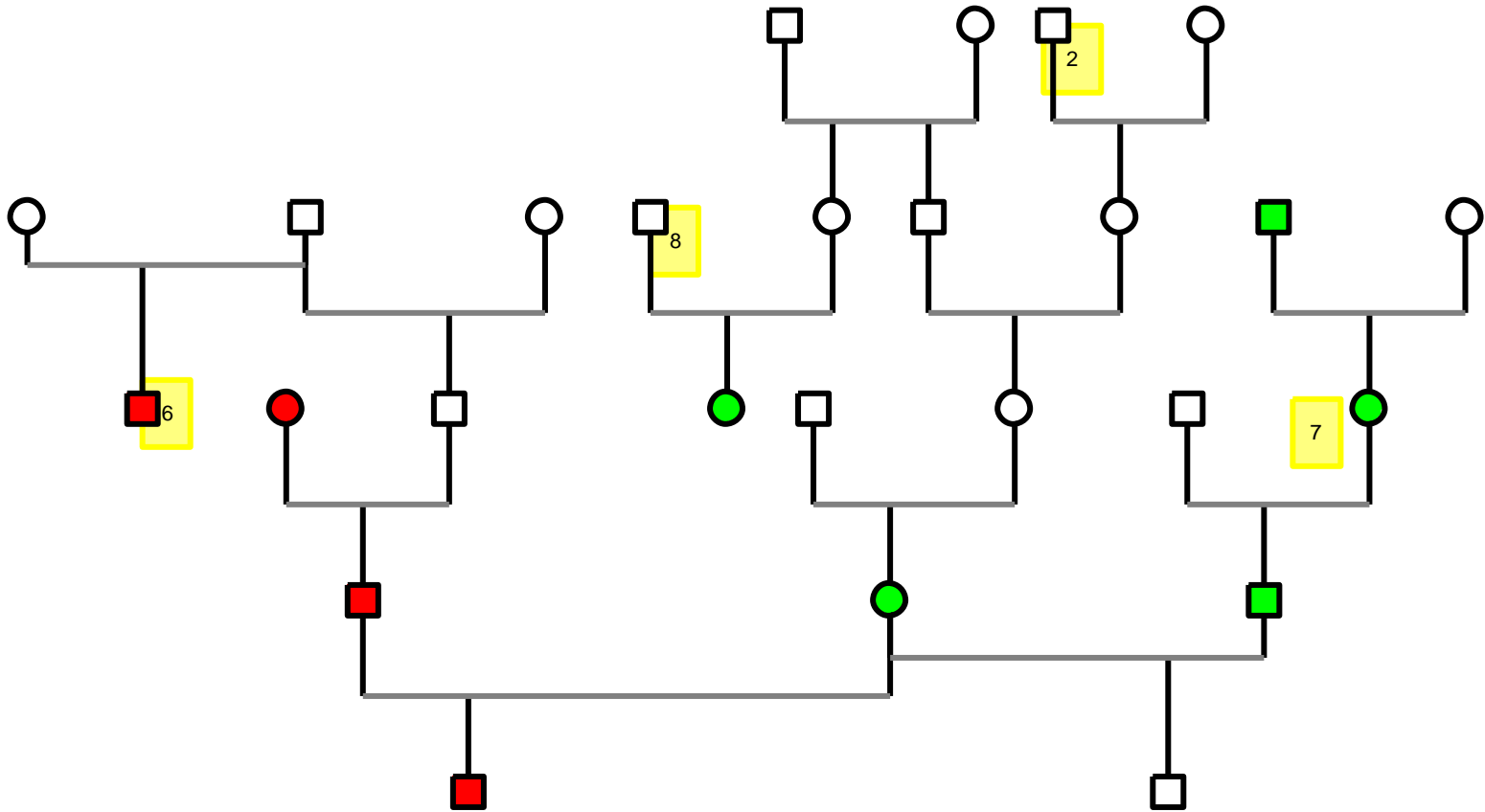
Figure 21 : Arbres généalogiques dessinés avec le logiciel Genopro.

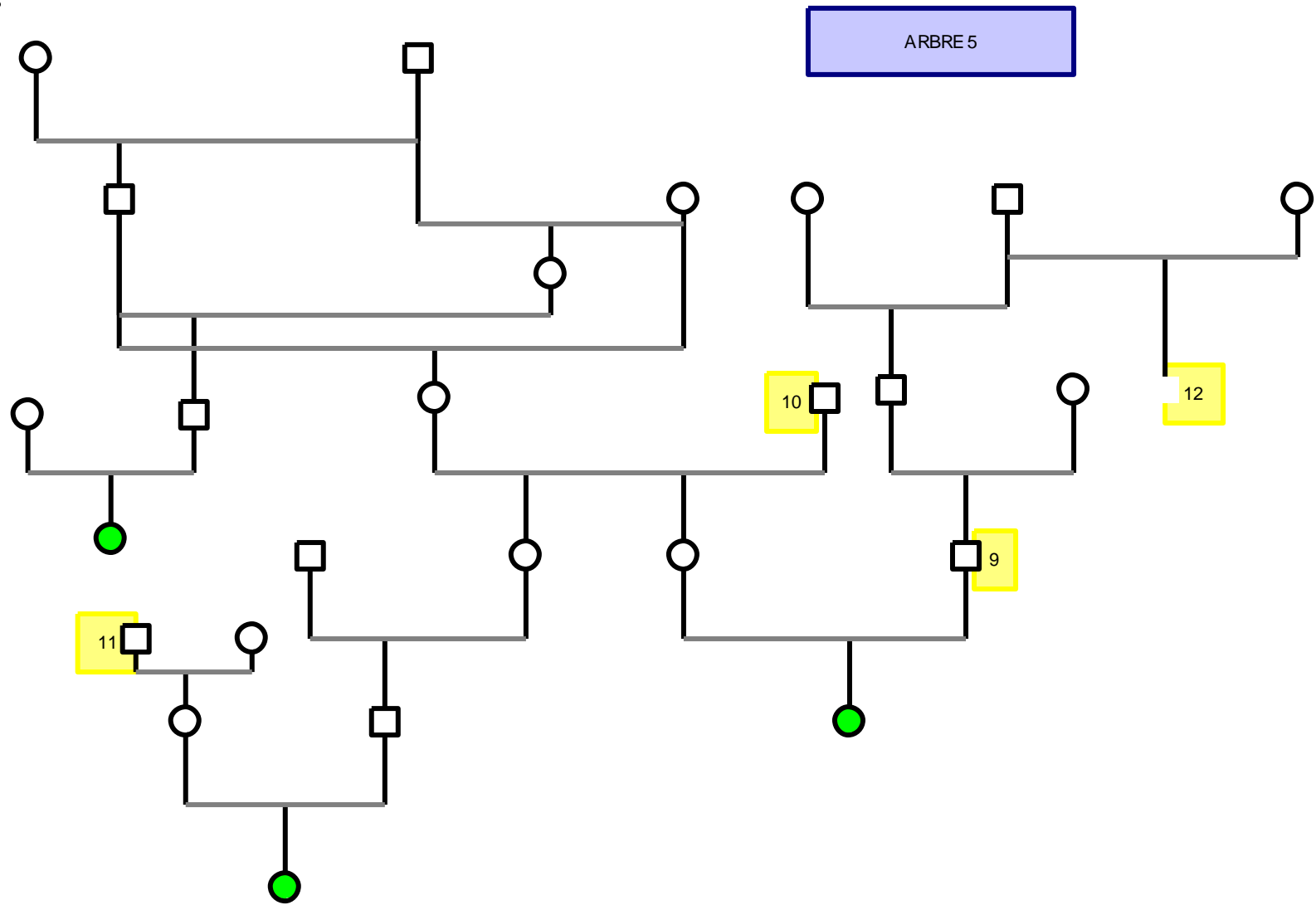






ARBRE 4





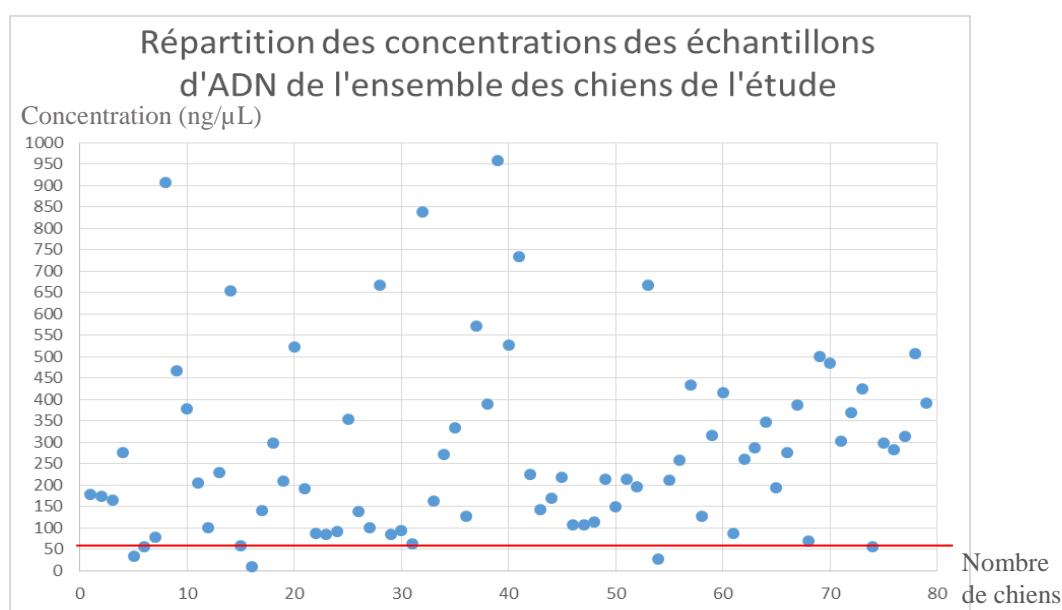
B. Extraction et concentration des ADN

Après extraction à partir des brossettes buccales ou des échantillons sanguins, la concentration des ADN a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop 2000 afin de savoir si le génotypage avec la puce SNP (puce haute densité canine Illumina HDCanine Bead Chip) serait possible.

L'objectif était d'avoir des concentrations d'ADN en nanogrammes (ng) par microlitres (μL) supérieures à 50, en sachant que le génotypage peut quand même être réalisé pour des valeurs de concentrations aux alentours de 10 ng/ μL .

Seuls les échantillons d'ADN de trois chiens ont présenté une valeur de concentration inférieure à 50 ng/ μL . La plus faible valeur obtenue était de 8,6 ng/ μL donc compatible avec le génotypage.

Figure 22 : Graphique de la répartition des concentrations des échantillons d'ADN de l'ensemble des chiens Bouledogue Français inclus dans l'étude.



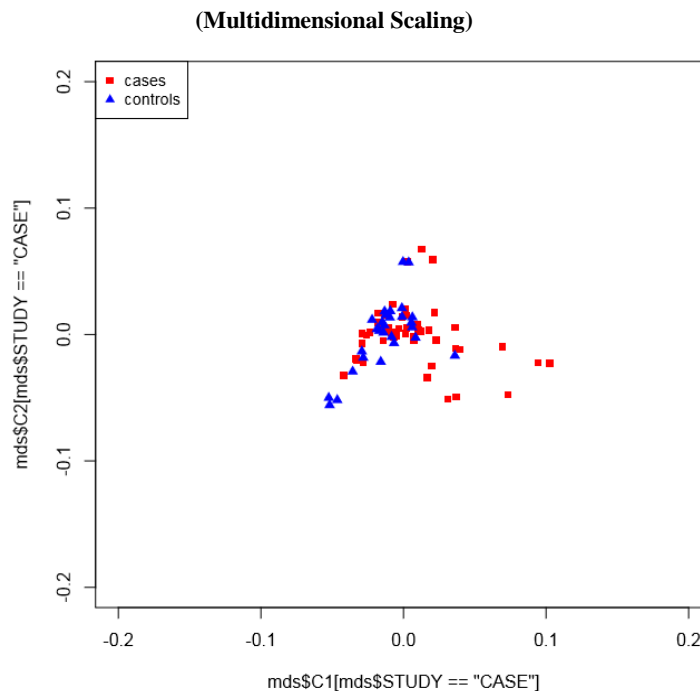
C. Mise en évidence de l'absence d'effet de stratification

L'effet de stratification (ou effet de structure) correspond à la possibilité que la population, supposée homogène, utilisée pour conduire une étude génétique d'association, soit en réalité un mélange de deux ou plusieurs sous-populations aux caractéristiques génétiques différentes. Dans ce cas, les résultats des tests statistiques d'association « marqueur SNP-locus de la maladie » pourraient être biaisés et conclure à tort à une association, du fait d'une origine génétique différentes des chiens atteints et contrôles.

Avant toute analyse des résultats obtenus dans une étude d'association pangénomique, il est donc nécessaire de montrer l'absence d'effet de stratification.

La *Figure 23* montre que les individus cas et les individus contrôles de notre étude n'étaient pas issus de lignées ou sous-populations différentes génétiquement, ce qui prouve l'absence de stratification.

Figure 23 : Figure de stratification cas-contrôle de notre étude par la méthode de «multidimensional-scaling».



Les individus contrôles sont représentés par des triangles, les individus atteints sont représentés par des carrés. La méthode « multidimensional-scaling », ou mds, détecte les dimensions sous-jacentes qui expliquent la distance génétique observée entre les individus. Ici les deux groupes de contrôles et d'atteints se superposent, montrant l'absence de structure sous-jacente de notre cohorte de chiens.

D. Résultats de l'analyse point par point : le Manhattan Plot

L'analyse des données de génotypage a débuté par une analyse point par point, c'est à dire que chaque marqueur SNP a été analysé individuellement.

Pour chaque SNP, un test d'association a été réalisé afin d'obtenir la signification statistique de l'association entre le SNP et le/les locus recherchés (p-value). Puis selon le nombre de SNP étudiés, les valeurs de p-value doivent être corrigées, le plus souvent avec la correction de Bonferroni.

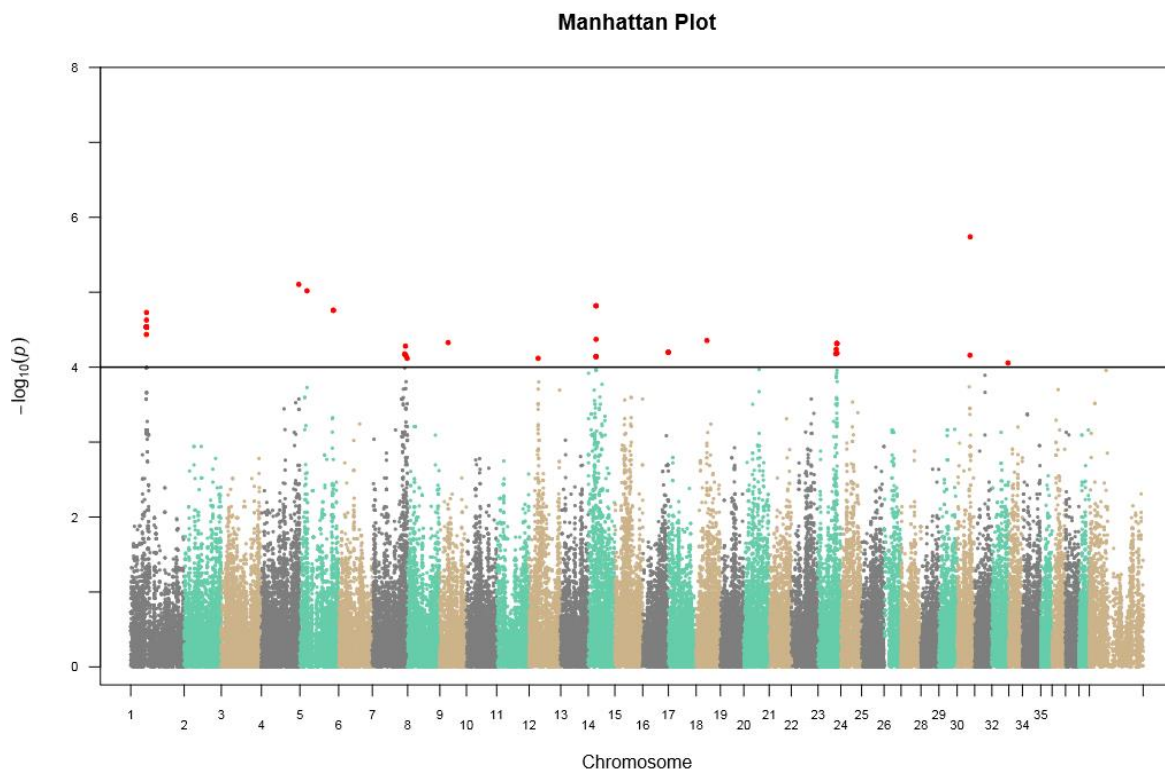
Habituellement, on considère que l'association statistique entre un SNP et le locus en cause dans le phénotype étudié est significative si la p-value est inférieure ou égale à 5×10^{-8} (Ehret, 2010).

Le Manhattan plot est une représentation graphique de ces p-values.

Les p-values de chaque SNP sont représentées selon leur position sur les chromosomes (axe des abscisses). L'axe des ordonnées correspond aux valeurs du $-\log_{10}$ (pour une représentation plus simple et plus aisée de lecture) des p-values.

Dans notre étude, le seuil d'intérêt avant correction de Bonferroni (valeur pour laquelle l'association statistique entre le SNP et la présence d'anomalies vertébrales thoraciques a été considérée comme significative) a été choisi arbitrairement pour une puissance statistique (p-value) de 10^{-4} soit un $-\log_{10}(p)$ égal à 4, aucun SNP n'ayant une p-value inférieure ou égale à 5×10^{-8} (Figure 24).

Figure 24 : Résultats du Manhattan Plot (avant correction de Bonferroni).



L'axe des abscisses représente les chromosomes canins. L'axe des ordonnées correspond aux valeurs de $-\log_{10}$ des p-values.

Il ressortait, avant correction de Bonferroni, 30 marqueurs SNP répartis sur 9 chromosomes (Figure 25):

- le chromosome 1 : 16 marqueurs,
- le chromosome 4 : 1 marqueur,
- le chromosome 5 : 3 marqueurs,
- le chromosome 7 : 1 marqueur,
- le chromosome 9 : 1 marqueur,
- le chromosome 14 : 3 marqueurs,
- le chromosome 18 : 1 marqueur,
- le chromosome 23 : 3 marqueurs,
- le chromosome 30 : 1 marqueur.

Figure 25 : Recensement des 30 marqueurs SNP mis en évidence lors de l'analyse point par point avec leur signification statistique de l'association avec les anomalies vertébrales avant (3^{ème} colonne) puis après (5^{ème} colonne) correction de Bonferroni.

CHR	SNP	UNADJ	GC	BONF	HOLM	SIDAK_SS	SIDAK_SD	FDR_BH	FDR_BY
30	BICF2S23051015	1.822e-06	2.001e-05	0.2039	0.2039	0.1845	0.1845	0.1488	1
4	TIGRP2P67951_rs8598793	7.862e-06	6.505e-05	0.8801	0.8801	0.5853	0.5853	0.1488	1
5	BICF2P466134	9.574e-06	7.626e-05	1	1	0.6576	0.6576	0.1488	1
14	TIGRP2P188158_rs8610663	1.518e-05	0.0001106	1	1	0.8171	0.8171	0.1488	1
14	BICF2P1153075	1.518e-05	0.0001106	1	1	0.8171	0.8171	0.1488	1
5	BICF2P1243400	1.741e-05	0.0001236	1	1	0.8576	0.8576	0.1488	1
5	BICF2P423013	1.741e-05	0.0001236	1	1	0.8576	0.8576	0.1488	1
1	BICF2G630720705	1.864e-05	0.0001305	1	1	0.8759	0.8759	0.1488	1
1	BICF2G630720578	2.353e-05	0.0001576	1	1	0.9282	0.9282	0.1488	1
1	BICF2G630720273	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720663	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720278	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2P1208557	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720576	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720740	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720734	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2S23742997	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720228	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720587	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720387	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720727	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720283	2.925e-05	0.0001879	1	1	0.9622	0.9622	0.1488	1
1	BICF2G630720335	3.664e-05	0.0002253	1	1	0.9835	0.9834	0.1783	1
14	BICF2P441455	4.251e-05	0.0002541	1	1	0.9914	0.9914	0.1864	1
18	BICF2S23316783	4.407e-05	0.0002616	1	1	0.9928	0.9928	0.1864	1
9	BICF2S23441603	4.704e-05	0.0002757	1	1	0.9948	0.9948	0.1864	1
23	BICF2S23226074	4.828e-05	0.0002816	1	1	0.9955	0.9955	0.1864	1
23	TIGRP2P307171_rs9077745	4.828e-05	0.0002816	1	1	0.9955	0.9955	0.1864	1
23	BICF2P1159996	4.828e-05	0.0002816	1	1	0.9955	0.9955	0.1864	1
7	BICF2P1250807	5.24e-05	0.0003008	1	1	0.9972	0.9972	0.1876	1

On constate néanmoins que suite à la correction de Bonferroni, **aucun des 30 marqueurs n'étaient significativement associé à la présence d'anomalies vertébrales thoraciques** : la meilleure puissance statistique obtenue après correction était de 0,2 (Figure 25).

E. Recherche de gènes candidats

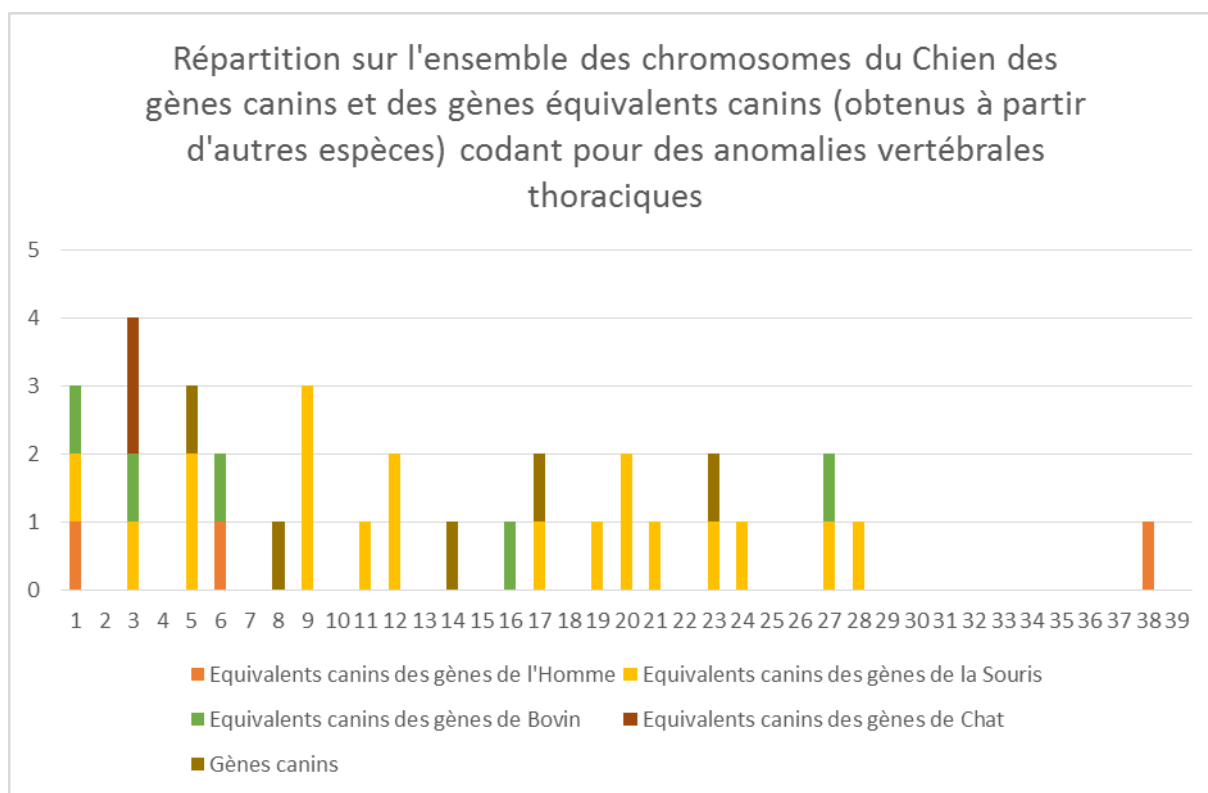
1. Exploitation de bases de données bibliographiques et génomiques

Les bases de données OMIM, OMIA et MGI, nous ont permis d'établir une liste (non exhaustive bien que la plus complète possible) des principaux gènes reconnus comme responsables de l'apparition d'anomalies vertébrales thoraciques chez l'homme, la souris, le chien, le chat et le bovin (cf IB).

Grâce à la base de données de séquences et d'annotations des génomes Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), nous avons pu lister l'ensemble des gènes canins homologues de ceux mis en évidence chez les autres espèces.

Nous avons pu mettre en évidence que les 34 gènes recensés étaient assez uniformément répartis sur 19 des 39 chromosomes du chien (Figure 26), avec une légère concentration sur les chromosomes 1-3-5 et 9 (41% des 34 gènes).

Figure 26 : Graphique de la répartition chromosomique des gènes canins et des gènes équivalents canins (obtenus à partir d'autres espèces) responsables d'anomalies vertébrales thoraciques.



Notons que l'analyse point par point, avant correction de Bonferroni avait mis en évidence 30 marqueurs dont 16 se trouvaient sur le chromosome 1, trois sur le chromosome 5 et un sur le chromosome 9 (Figure 25).

2. Analyse de la localisation des marqueurs situés sur les chromosomes 1-5-14 et 23 et identifiés avant correction de Bonferroni

Bien que lors de notre étude d'association aucun des marqueurs SNP ne soit ressorti comme significativement associé à la présence d'anomalies vertébrales thoraciques, nous nous sommes intéressés à la localisation des marqueurs identifiés avant correction de Bonferroni et situés sur les chromosomes canins 1-5-14 et 23.

Nous avons comparé les localisations de ces marqueurs avec celles des gènes canins ou homologues canins (obtenus à partir des gènes d'autres espèces : Homme, Souris, bovins et Chats (cf IB)) impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales thoraciques, d'anomalies du crâne ou d'anomalies des côtes (Tableau 13).

Tableau 13 : Recensement des localisations sur les chromosomes canins 1-5-14-23 des différents marqueurs identifiés lors de l'étude d'association (avant correction de Bonferroni), et comparaison avec les localisations des gènes canins ou homologues canins impliqués dans l'apparition d'anomalies vertébrales thoraciques ou d'anomalies du crâne ou des côtes.

Marqueurs SNP du chromosome 1 :

Nom du marqueur SNP	Position du marqueur sur le chromosome canin (en Mégabases)
BICF2G630720705	39 399 578
BICF2G630720578	39 285 814
BICF2G630720273	38 970 874
BICF2G630720663	39 372 135
BICF2G630720278	38 987 395
BICF2P1285557	39 424 677
BICF2G630720576	39 282 317
BICF2G630720740	39 445 003
BICF2G630720734	39 439 125
BICF2S23742997	39 100 429
BICF2G630720228	38 919 288
BICF2G630720587	39 307 065
BICF2G630720387	39 128 625
BICF2G630720727	39 414 671
BICF2G630720283	39 016 557
BICF2G630720335	39 089 356

Marqueurs SNP du chromosome 5 :

Nom du marqueur SNP	Position du marqueur sur le chromosome canin (en Mégabases)
BICF2P466134	19 433 509
BICF2P1243400	79 804 595
BICF2P423013	79 831 289

Marqueurs SNP du chromosome 14 :

Nom du marqueur SNP	Position du marqueur sur le chromosome canin (en Mégabases)
TIGRP2P188158_rs8610663	20 807 114
BICF2P1153075	20 798 577
BICF2P441455	20 871 429

Marqueurs SNP du chromosome 23 :

Nom du marqueur SNP	Position du marqueur sur le chromosome canin (en Mégabases)
BICF2S23226074	46 506 799
TIGRP2P307171_rs9077745	46 407 220
BICF2P1159996	46 448 289

Nom du gène canin ou homologue canin impliqué dans l'apparition d'anomalies vertébrales	Position du gène sur le chromosome canin (en Mégabases)
<i>T</i> (équivalent du gène humain et bovin <i>T</i> : <i>Brachyury Transcription Factor</i>)	Chr 1 Environ 54 185 000
<i>ROR2</i> (équivalent du gène de la souris <i>Ror 2</i> : <i>receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2</i>)	Chr 1 Environ 95 250 000
<i>GLG1</i> (équivalent du gène de la souris <i>Glg 1</i> : <i>golgi apparatus protein 1</i>)	Chr 5 Environ 76 100 000
<i>JUN</i> (équivalent du gène de la souris <i>Jun</i> : <i>jun proto-oncogene</i>)	Chr 5 Environ 50 968 000
Gène canin <i>HES7</i> : <i>hes family bHLH transcription factor 7</i>	Chr 5 Environ 39 945 000
Gène canin <i>SLC13A1</i> : <i>solute carrier family 13 member 1</i>	Chr 14 Environ 60 700 000
<i>KY</i> (équivalent du gène de la souris <i>Ky</i> : <i>kyphoscoliosis peptidase</i>)	Chr 23 Environ 31 350 000
Gène canin <i>GLB1</i> : <i>galactosidase, beta 1</i>	Chr 23 Environ 3 750 000

Nom du gène canin équivalent d'un gène humain impliqué dans l'apparition d'anomalies du crâne ou des côtes	Position du gène sur les chromosomes canins (en Mégabases)
<i>ERF</i> (Craniosynostose forme 4)	Chr 1 Environ 112 120 000
<i>GJA1</i> (<i>Craniometaphyseal Dysplasia</i> = CMDR)	Chr1 Environ 60 800 000
<i>DYNC2H1</i> (<i>Short-rib thoracic dysplasia</i> forme 3)	Chr 5 28 500 000
<i>IFT140</i> (<i>Short-rib thoracic dysplasia</i> forme 9)	Chr 6 Environ 39 300 000
<i>DLL3</i> (<i>Spondylocostal Dysostosis</i> forme 1)	Chr 1 Environ 113 740 000
<i>HES7</i> (<i>Spondylocostal Dysostosis</i> forme 4)	Chr 5 Environ 32 945 000

Nous avons constaté qu'**aucun des gènes canins ou homologues canins que nous avons recensés ne se trouvait à proximité d'un marqueur identifié lors de l'étude d'association avant correction de Bonferroni.**

III. Discussion

A. Critique de la méthode de recrutement des Bouledogues Français et de la collecte des échantillons

Lors de la sélection des Bouledogues Français à inclure dans notre étude nous avons répartis les chiens en deux grands groupes :

- celui des « indemnes » autrement dit les chiens ne présentant aucune anomalie vertébrale thoracique,
- celui des « atteints » composé des chiens présentant au moins une anomalie vertébrale thoracique.

Si la définition du premier groupe était claire, celle du second groupe apparaissait comme ambiguë. En effet, d'après la définition ci-dessus, un Bouledogue Français présentant une unique anomalie mineure et un chien avec une dizaine d'anomalies majeures étaient tous les deux considérés comme « atteints ». De même, toutes les « anomalies » ont été regroupées.

Afin d'obtenir une cohorte de cas la plus homogène possible nous avons donc choisi de sélectionner les chiens présentant le plus d'anomalies vertébrales possible. Néanmoins, nous n'avons pas discriminé les animaux selon le type d'anomalies vertébrales qu'ils présentaient.

Il est alors possible de se demander si nos résultats de génotypage n'auraient pas été plus probants si nous avions choisi de sélectionner des chiens présentant uniquement un ou deux types d'anomalies vertébrales bien précis (par exemple uniquement des hémivertèbres et des vertèbres en ailes papillon).

De plus, lors du choix des Bouledogues Français inclus dans notre étude, nous avons posé comme condition initiale que les animaux « atteints » ne devaient pas être apparentés au premier degré (à savoir parent/enfant ou frère/sœur) afin d'augmenter la puissance de détection de locus lors de l'analyse des résultats du génotypage.

Ce critère n'a pas pu être appliqué aux chiens « indemnes » en raison du faible nombre de ces derniers dans l'échantillon de départ (l'étude Krumeich (2011) ayant mis en évidence que moins de 8% des Bouledogues Français ne présentaient pas d'anomalies vertébrales thoraciques). Néanmoins ce cas n'a concerné que deux chiens (un parent/enfant et aucun frère/sœur) sur les 27 « indemnes » de notre étude.

B. Impact du mode de transmission sur les résultats obtenus

Les arbres généalogiques réalisés (cf partie IIA) nous ont permis de conclure à un mode de transmission probablement de type aléatoire polygénique.

Lors de maladie polygénique, deux grandes situations sont envisageables d'un point de vue génétique :

- l'existence d'un locus dit « majeur » qui explique pour plus de 50% de la variance phénotypique et l'existence d'un faible nombre de locus dits « mineurs » dont l'effet est moindre. Dans ce cas, il est très probable qu'une étude d'association permette de mettre en évidence le locus « majeur ».
- L'existence d'un nombre élevé de locus « mineurs » répartis sur l'ensemble du génome. Il est alors rare qu'une étude d'association parvienne à faire ressortir statistiquement un ou plusieurs de ces locus.

Dans notre étude, on peut se demander, au vu de la sélection drastique exercée pour se conformer au standard officiel de la race, si cette même sélection n'aurait pas conduit à l'accumulation de multiples allèles défavorables. Les anomalies vertébrales thoraciques chez le Bouledogue Français apparaîtraient alors comme le résultat de la combinaison d'un nombre important d'allèles dont la mise en évidence par une étude d'association nécessiterait un nombre de chiens génotypés très élevé.

C. Critique des résultats de l'analyse point par point

Lors de notre étude, 30 marqueurs SNP étaient ressortis lors de l'analyse point par point avant correction de Bonferroni, lorsque nous avons utilisé comme seuil de significativité statistique 10^{-4} . Néanmoins, après correction, plus aucun SNP ne présentait une association statistique significative avec la présence d'anomalies vertébrales thoraciques. Nous avons donc obtenu uniquement du "bruit de fond statistique".

Ceci peut s'expliquer par divers éléments :

- le faible effectif de Bouledogues Français recrutés pour notre étude.

En effet, bien que par rapport à de nombreuses publications génétiques du monde vétérinaire, notre cohorte de 79 chiens semble conséquente (par exemple, 47 chats Bobtail Japonais dans l'étude de Pollard *et al.* en 2015, 10 veaux dans l'étude de Moritomo *et al.* en 1995 ou 35 bouvillons dans l'étude de Shaw en 1992), cet effectif n'est pas suffisant pour obtenir des résultats probants lors d'une étude d'association portant sur une affection non monogénique. La méthode de génotypage avec une puce à SNP ne met en évidence que des effets génétiques importants (c'est-à-dire des marqueurs SNP présentant une association très fortement significative avec la maladie étudiée), le reste se présentant sous la forme de « bruit de fond statistique ». La seule manière de limiter cet effet « bruit de fond » est d'augmenter les effectifs des cohortes de cas et témoins : pour un même effet biologique ou physiologique testé, si la probabilité associée à la significativité du test statistique est de 0.05 avec 100 patients et 100 témoins elle peut être de 0.001 avec deux fois plus de sujets. (Vasseur, 2010). C'est la raison pour laquelle, ce type d'études regroupe des cohortes pouvant atteindre plusieurs centaines à plusieurs milliers individus lorsqu'elles sont menées sur des patients humains (Dina, 2016).

- la faible proportion d'indemnes dans l'ensemble de notre cohorte.

L'étude réalisée par Krumeich en 2011 a mis en évidence que 90,8% des Bouledogues Français étaient atteints d'anomalies vertébrales thoraciques. Ainsi la proportion de chiens indemnes dans notre cohorte (27/79 soit 34%) n'est pas représentative de la réalité dans la population française de Bouledogue Français.

Néanmoins, dans une étude d'association avec génotypage pour des marqueurs SNP, l'idéal est d'avoir une proportion de témoins d'environ 50% (Karlsson *et al.*, 2007 et Lindblad-Toh *et al.*, 2005).

- le fait d'avoir une maladie de type polygénique (cf arbres généalogiques de la partie IIA).

En effet, lors d'une étude d'association portant sur une maladie de type monogénique, le "bruit de fond" perturbe moins que lors d'une étude sur une maladie de type polygénique.

Karlsson *et al.*, en 2007 ont montré que pour les maladies héréditaires canines de type monogéniques, une étude d'association avec génotypage par puce SNP ne nécessitait en moyenne que 20 chiens indemnes et 20 chiens atteints si le caractère était récessif ; 50 indemnes et 50 atteints si le caractère était dominant. En revanche, en ce qui concernait les maladies polygéniques, le nombre de chiens nécessaires pour avoir une probabilité élevée de mettre en évidence les locus responsables passait de 100 indemnes et 100 atteints à 500 indemnes et 500 atteints selon les études (Karlsson *et al.*, 2007 ; Lindblad-Toh *et al.*, 2005). Par exemple, lors de l'étude de 2011 sur la maladie valvulaire dégénérative mitrale (MVD mitrale) chez le Cavalier King Charles (Madsen *et al.*, 2011), l'utilisation de 139 chiens atteints et 102 chiens contrôles ont été nécessaires pour identifier les deux locus impliqués dans la MVD mitrale.

Compte tenu du caractère polygénique très probable des anomalies vertébrales thoraciques du Bouledogue Français (héritabilité forte mais transmission non mendélienne), un minimum de 100 chiens atteints et 100 chiens contrôles semble donc nécessaire pour espérer obtenir un résultat significatif à l'aide de la stratégie de criblage pangénomique par marqueurs SNP, seule stratégie utilisable à ce jour pour cartographier des locus impliqués dans des caractères complexes.

CONCLUSION

Chaque race canine est issue d'un petit noyau de reproducteurs sélectionnés, à l'origine, sur des critères utilitaires, comportementaux ou esthétiques. La sélection, à chaque génération, des reproducteurs participant à l'élaboration de la génération suivante et l'utilisation de la consanguinité, afin d'accélérer la fixation de caractères désirables, ont abouti à l'homogénéité des races canines. Le Bouledogue Français ne fait pas exception à la règle. La recherche de caractéristiques esthétiques particulières dans cette race a conduit, de façon involontaire, à l'obtention d'individus présentant des défauts vertébraux.

Aujourd'hui plus de 90% des individus de cette race, en France, présente des anomalies vertébrales thoraciques (Krumeich, 2011), et une origine génétique de ces anomalies semble plus qu'évidente (Schlensker et Distl, 2016).

Cette première étude génétique menée sur une cohorte de 79 Bouledogue Français, apporte plusieurs éléments de compréhension du déterminisme génétique des anomalies vertébrales thoraciques chez le Bouledogue Français.

Tout d'abord, l'analyse des arbres généalogiques de chiens atteints et indemnes a permis de montrer qu'il existait très probablement une transmission de type héréditaire des anomalies vertébrales thoraciques, et que la composante génétique de l'affection devait être de type polygénique (ce qui est en accord avec les résultats de l'étude menée en 2016 par Schlensker et Distl).

Les anomalies vertébrales thoraciques chez le Bouledogue Français seraient donc le résultat de la combinaison d'un nombre important d'allèles, sélectionnées de manière involontaire par les éleveurs.

Nous avons ensuite effectué une étude d'association pangénomique à l'aide de marqueurs SNP, qui a permis d'identifier avant correction de Bonferroni, 30 marqueurs SNP associés aux anomalies vertébrales dans notre cohorte, et répartis sur neuf chromosomes (en particulier les chromosomes 1,5,14 et 23).

Néanmoins, après correction statistique, aucun des 30 marqueurs initialement identifiés ne s'est révélé significativement associé à la présence d'anomalies vertébrales thoraciques.

Le manque de puissance statistique de notre étude peut s'expliquer par différents facteurs : le nombre de chiens limités, la faible proportion d'animaux indemnes et le mode de transmission de type polygénique.

Enfin, nous avons réalisé une exploitation de diverses bases de données bibliographiques et génomiques afin de dresser une liste de gènes candidats pour les anomalies vertébrales thoraciques du Bouledogue Français.

Pour ces raisons, nous poursuivrons notre étude par le génotypage d'une deuxième cohorte de 32 chiens Bouledogue Français atteints et 16 chiens Bouledogue Français indemnes, toujours à l'aide de la puce Illumina à marqueurs SNP, afin de renforcer le pouvoir de détection de locus associés aux anomalies vertébrales thoraciques. La cohorte élargie permettra également

une analyse des génotypes en classant les individus en fonction du type d'anomalie vertébrale et non plus uniquement selon le nombre total d'anomalies.

Notons que la liste des gènes candidats établie à l'issue de ce travail pourra être exploitée si un ou plusieurs locus venaient à être identifiés lors de la seconde étude d'association.

Le but de ce travail était de rechercher le mode de transmission des anomalies vertébrales thoraciques du Bouledogue Français et de rechercher les locus en cause afin de pouvoir, à terme, proposer un moyen de dépistage et de contrôle de ces anomalies dans la population des chiens de la race en France. Avant que ce travail ait totalement abouti, nous pouvons donc, dans un premier temps, conseiller aux éleveurs de Bouledogue Français de faire dépister radiographiquement leurs reproducteurs et d'éviter la reproduction des individus les plus sévèrement atteints (nombre important de vertèbres anormales ou conséquences délétères pour le chien).

BIBLIOGRAPHIE

1. AHAM DF, GROZDANIC SD, KECOVA H, HENKES A, COLLIN RWJ, KUEHN MH (2015). Variants in Nebulin (NEB) Are Linked to the Development of Familial Primary Angle Closure Glaucoma in Basset Hounds. *PloS One*, **10**, e0126660.
2. BAILEY CS, MORGAN JP (1992). Congenital spinal malformations. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **22**, 985–1015.
3. BAILEY CS (1975). An embryological approach to the clinical significance of congenital vertebral and spinal cord abnormalities. *J Am Anim Hosp Assoc*, 426–434.
4. Bio Web : cours de bio en ligne. Catégorie Génétique Méthode Sanger. [en ligne]. [<http://www.jpboseret.eu/biologie/index.php/genetique/methode-de-sanger>]. (Consulté le 28/06/16).
5. CAUDAL V. (2012). Malformations vertébrales et hernies discales chez le bouledogue français: étude tomодensitométrique sur 54 cas (Thèse d'exercice). Université de Nantes. Unité de Formation et de Recherche de Médecine et des Techniques Médicales, France.
6. DEVAUX F. Cartographies génétiques et localisation des gènes. Cours ENS BMG1-L2 UPMC. [en ligne]. [http://genetique.snv.jussieu.fr/OLD%20SITE/documents%202010/LV203_2010/cours%207%208%20BMG1%20Devaux.pdf]. (Consulté le 30/06/2016).
7. DEWEY C.W (2013). Surgery of the Thoracolumbar Spine. In : Horn C.V, Johnson A.L. (editors). *Small Animal Surgery*. 4th ed., St Louis, Elsevier-Mosby, 1508-1528.
8. DINA C. Etudes d'association pangénomiques ou études d'association génome entier ou Genome Wide Association Studies. Cours université de Nantes. [en ligne]. [http://www.sfnct.org/sn/PDF/epart/assoc/CJN/2014_lille/02-dina.pdf]. (Consulté le 30/06/16).
9. DONE SH, DREW RA, ROBINS GM, LANE JG (1975). Hemivertebra in the dog: clinical and pathological observations. *Vet. Rec.*, **96**, 313–317.
10. EHRET GB (2010). Genome-wide association studies: contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.*, **12**, 17–25.
11. FAO (Commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture, Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) (2008). L'état des ressources zoogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde, Partie 4 Section C. Rome. [en ligne]. [<http://www.fao.org/docrep/011/a1250f/a1250f00.htm>]. (Consulté le 30/06/16).
12. GRANDJEAN D., HAYMANN F., ANDRE C., BACQUE H., BEDOSSA T., BOOGAERTS C., *et al* (2010). Encyclopédie du chien. Royal Canin, France.

13. KAPLAN KM, SPIVAK JM, BENDO JA (2005). Embryology of the spine and associated congenital abnormalities. *Spine J. Off. J. North Am. Spine Soc.*, **5**, 564–576.
14. KAPLAN JC., DELPECH M. (2007). Chapitre 8 : Les polymorphismes du DNA. *In : Biologie moléculaire et médecine*. 3rd ed., Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 223-238.
15. KAPLAN JC., DELPECH M. (2007). Chapitre 9 : Génomique. *In : Biologie moléculaire et médecine*. 3rd ed., Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 239-292.
16. KAPLAN JC., DELPECH M. (2007). Chapitre 11 : Le diagnostic génotypique. *In : Biologie moléculaire et médecine*. 3rd ed., Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 335-362.
17. KAPLAN JC., DELPECH M. (2007). Chapitre 25 : Détermination de la séquence d'un acide nucléique. *In : Biologie moléculaire et médecine*. 3rd ed., Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 689-698.
18. KAPLAN JC., DELPECH M. (2007). Chapitre 26 : Analyse du génome et de ses modifications. *In : Biologie moléculaire et médecine*. 3rd ed., Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 699- 720.
19. KARLSSON EK, BARANOWSKA I, WADE CM, SALMON HILLBERTZ NHC, ZODY MC, ANDERSON N, *et al.* (2007). Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat. Genet.*, **39**, 1321–1328.
20. KARLSSON EK, LINDBLAD-TOH K (2008). Leader of the pack: gene mapping in dogs and other model organisms. *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 713–725.
21. KEALY JK, MCALLISTER H, GRAHAM JP (2011). Diagnostic radiology and ultrasonography of the dog and cat., 5th ed. Elsevier Saunders, St Louis.
22. KRAMER JW, SCHIFFER SP, SANDE RD, RANTANEN NW, WHITENER EK (1982). Characterization of heritable thoracic hemivertebra of the German shorthaired pointer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **181**, 814–815.
23. KRUMEICH N. (2011). Etude épidémiologique des anomalies radiographiques vertébrales thoraciques du Bouledogue français (Thèse de doctorat). École nationale vétérinaire d'Alfort, EnvA, France.
24. LETOURNEUR F. (2011). Les puces à ADN. Cours Université Paris Descartes, Ecole thématique « Génomique et Modélisation ». [en ligne]. [<http://www.math-info.univ-paris5.fr/~rozen/Analyse-Genome-Tumoral/Exposes%202011/Letourneur.pdf>] (Consulté le 01/07/16).
25. LINDBLAD-TOH K, WADE CM, MIKKELSEN TS, KARLSSON EK, JAFFE DB, KAMAL M, *et al.* (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, **438**, 803–819.
26. Logiciel Genopro®. (2016). <http://www.genopro.com/fr/>
27. Logiciel PLINK®. (2014). <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>

28. MADSEN MB, OLSEN LH, HÄGGSTRÖM J, HÖGLUND K, LJUNGVALL I, FALK T, *et al.* (2011). Identification of 2 loci associated with development of myxomatous mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniels. *J. Hered.*, **102 Suppl 1**, S62-67.
29. METZKER ML (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 31-46.
30. MGI®. Mouse Genome Informatics®. [en ligne]. [<http://www.informatics.jax.org/>]. (Consulté le 30/06/16).
31. MORENO T. (2014). Détermination d'associations entre la survenue de troubles neurologiques médullaires et la présence d'anomalies vertébrales thoraciques ou de certains paramètres de leur environnement, dans une cohorte de bouledogues français (Thèse de doctorat). École nationale vétérinaire d'Alfort, EnvA, France.
32. MORITOMO Y, KOGA O, MIYAMOTO H, TSUDA T (1995). Congenital anophthalmia with caudal vertebral anomalies in Japanese Brown cattle. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.*, **57**, 693-696.
33. OMIA®. Online Mendelian Inheritance In Animals®. [en ligne]. [<http://omia.angis.org.au/home/>]. (Consulté le 30/06/16).
34. OMIM®. Online Mendelian Inheritance in Man®. [en ligne]. [<http://www.omim.org/>]. (Consulté le 30/06/16).
35. Parlons Science et Curiosité. Séquençage de Sanger. [en ligne]. [<https://explorecuriosite.org/Portals/2/themes/biotechnology/Sanger%20Sequencing%20BackgroundFR.pdf>]. (Consulté le 28/06/16).
36. PLATT SR, OLBY N. (2004). BSAVA manual of canine and feline neurology. British Small Animal Veterinary Association. ed.
37. POLLARD RE, KOEHNE AL, PETERSON CB, LYONS LA (2015). Japanese Bobtail: vertebral morphology and genetic characterization of an established cat breed. *J. Feline Med. Surg.*, **17**, 719–726.
38. RICHARD S (2001). Etude biomécanique in vitro des principales stabilisations lombosacrées en post-opératoire immédiat chez le chien (Thèse de doctorat). École nationale vétérinaire d'Alfort, EnvA, France.
39. RUYSSSEN-WITRAND A. DU Maladies Systémiques et Auto-Immunes Facteurs génétiques: méthodes d'investigation et connaissances actuelles. Cours CHU de Toulouse Rhumatologie. [en ligne]. [[file:///C:/Users/user/Downloads/Facteurs%20g%C3%A9n%C3%A9tiques%20m%C3%A9thodes%20d%E2%80%99investigation%20et%20connaissances%20actuelles%20DU%20Maladies%20Syst%C3%A9miques%20et%20Auto-Immunes%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/Facteurs%20g%C3%A9n%C3%A9tiques%20m%C3%A9thodes%20d%E2%80%99investigation%20et%20connaissances%20actuelles%20DU%20Maladies%20Syst%C3%A9miques%20et%20Auto-Immunes%20(2).pdf)]. (Consulté le 30/06/16).

40. RYAN R, GUTIERREZ-QUINTANA R, TER HARR G, DE DECKER S (2017). Prevalence of thoracic vertebral malformations in French bulldogs, Pugs and English bulldogs with and without associated neurological deficits. *The Veterinary Journal*, **221**, 25-29.
41. SAYYAB S, VILUMA A, BERGVALL K, BRUNBERG E, JAGANNATHAN V, LEEB T, *et al.* (2016). Whole Genome Sequencing of a Canine Family Trio Reveals a FAM83G Variant Associated with Hereditary Footpad Hyperkeratosis. *G3 Bethesda Md*, **6**, 521–527.
42. SCHLENSKER E, DISTL O (2016). Heritability of hemivertebrae in the French bulldog using an animal threshold model. *Vet. J. Lond. Engl. 1997*, **207**, 188–189.
43. SHAW JM (1992). Hemivertebra in a crossbred heifer. *Vet. Rec.*, **130**, 538–539.
44. SHEARIN AL, OSTRANDER EA (2010). Leading the way: canine models of genomics and disease. *Dis. Model. Mech.*, **3**, 27–34.
45. Site ensembl®. [en ligne] (Mise à jour en Juillet 2016). [<http://www.ensembl.org/index.html>]. (Consulté le 06/09/16).
46. Site Illumina®. [en ligne] (Mise à jour le 15/08/16). [www.illumina.com] (Consulté le 06/09/16).
47. Site officiel du club de race des bouledogues français. [en ligne] (Mise à jour le 25/06/16). [<http://www.cbf-asso.org/>] (Consulté le 30/06/16).
48. Site Université Pierre et Marie Curie. Partie Génétique, SNP et puces à ADN. [en ligne]. [http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/polymorphisme/snp.html]. (Consulté le 01/07/16).
49. SONEL B, YALÇIN P, OZTÜRK EA, BÖKESÖY I (2001). Butterfly vertebra: a case report. *Clin. Imaging*, **25**, 206–208.
50. VASSEUR F. (2010). Les maladies génétiques "complexes". Cours CHRU de Lille. [en ligne]. [http://campus.cerimes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique_5/site/html/cours.pdf]. (Consulté le 30/06/16).
51. VAYSSE A. (2011). Identification des signatures génétiques de la sélection chez le chien. Génétique animale. Université Rennes 1. [en ligne]. [<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00676015/document>]. (Consulté le 12/09/16).
52. WALUK D, ZUR G, KAUFMANN R, WELLE MM, JAGANNATHAN V, DRÖGEMÜLLER C, *et al.* (2016). A Splice Defect in the EDA Gene in Dogs with an X-Linked Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia (XLHED) Phenotype. *G3 Bethesda Md*, **6**(9), 2949-2954.
53. WAYNE RK, OSTRANDER EA (2007). Lessons learned from the dog genome. *Trends Genet. TIG*, **23**, 557–567.

54. WESTWORTH DR, STURGES BK (2010). Congenital spinal malformations in small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **40**, 951–981.

55. ZIMMERMAN MC, VUONO-HAWKINS M, PARSONS JR, CARTER FM, GUTTELING E, LEE CK, *et al.* (1992). The mechanical properties of the canine lumbar disc and motion segment. *Spine*, **17**, 213–220.

ANNEXES

Annexe 1

Documentation technique d'illumina sur la puce canine 170K.

Data Sheet: DNA Genotyping



CanineHD BeadChip

More than 170,000 evenly spaced and validated SNPs derived from the CanFam2.0 assembly.

CanineHD BeadChip Highlights

- **Unrivaled Call Rates and Accuracy:**
> 99% average call rates and 99.99% reproducibility
- **Comprehensive and Uniform Coverage:**
Genome-wide coverage using over 170,000 evenly spaced markers placed on the CanFam2.0 reference sequence
- **Simple Workflow:**
PCR-free protocol with the powerful Infinium HD Assay
- **High-Throughput Format:**
Up to 12 samples can be interrogated in parallel

Introduction

Dogs are arguably man's greatest invention¹, originally domesticated from grey wolves as long as 100,000 years ago. Selective breeding over the last few centuries has led to an incredible amount of biological diversity among modern domestic dog breeds, as they display a wide range of physical traits and behaviors². However, breeding methods and recent bottlenecks experienced in the domestic dog have unintentionally resulted in a high prevalence of specific diseases, including cancers, heart disease, epilepsy, and hip dysplasia.² Since humans and canines share a number of common diseases, the domestic dog has been an increasingly important model for understanding the genetic component of human disease.² Recent discoveries have also shown that selective breeding has led to large haplotype blocks being carried into the canine genomes. These large genomic regions are ideal for canine genome-wide association studies, where far fewer markers are required to identify genetic disease associations compared human studies. The unique breeding history of the domestic dog offers the research community a powerful opportunity for unraveling the genetic basis of disease, behavioral and morphological traits, and mammalian variation.

In 2005, researchers at the Broad Institute completed the current assembly of the canine genome, CanFam2.0.³ The Canine Genome Sequencing Project produced a high-quality draft sequence of a female boxer named Tasha. The assembly of Tasha's genome was used to compare sequence data of other key breeds.² From these efforts over 2.5 million high quality SNPs have been identified.

The CanineHD Genotyping BeadChip contains more than 170,000 markers placed on the CanFam2.0 reference sequence. Illumina has developed the BeadChip in collaboration with the LUPA Consortium, which includes 22 European universities and other partners such as the Broad Institute. Featuring highly polymorphic SNP content and providing uniform genomic coverage, the CanineHD BeadChip enables the interrogation of genetic variation in any domestic dog breed. Importantly, this BeadChip presents an average of greater than 70 markers per megabase (Mb), providing ample SNP density for robust

within-breed association and copy number variation (CNV) studies. In addition, across-breed haplotypes in dogs range between 10-100kb, suggesting that genetic risk factors may be shared across breeds. The dense CanineHD marker set increases the ability to detect across-breed trait and risk factor signals.

The combination of Illumina's proprietary assay technologies, unconstrained locus selection, and high-throughput format presents the most comprehensive solution for whole-genome studies in the domestic dog.

SNP selection strategy

The SNP content featured on the CanineHD BeadChip was selected from the Dog Genome Project 2.5 million SNP set. In addition, 1696 SNPs were identified using a hybridization-based targeted resequencing method of SNP discovery within gaps in the SNP map. SNPs were selected from a diverse set of breeds and picked to represent as many different breeds as possible, while maintaining coverage of ~70 SNPs per Mb. This content selection strategy empowers confident disease mapping in all dog breeds, as can be seen by the successful validation in 26 diverse breeds. (Table 2).

High-Quality Data

The CanineHD BeadChip is powered by the proven Infinium HD Assay, providing the industry's highest call rates, flexible content, and precise CNV detection. The SNPs on the CanineHD BeadChip were subjected to rigorous functional testing across all 26 breeds to ensure strong performance using the Infinium HD Assay. Whole-genome

Figure 1: CanineHD BeadChip



The CanineHD Genotyping BeadChip features more than 170,000 evenly-spaced SNPs across the entire dog genome.

Data Sheet: DNA Genotyping

association studies are successful, in part, due to high call rates and accurately called genotypes. Since complex disease traits often have relatively small gene effects, potential associations may be missed if the assayed SNP in linkage disequilibrium with the disease SNP has a low call rate or incorrect genotype call. Illumina ensures that every CanineHD BeadChip offers > 99% call rate on samples meeting the recommended input requirements. This includes samples that were collected from buccal swabs.

Table 1 shows the results from Illumina's internal validation of the CanineHD BeadChip. During development of the BeadChip, loci were identified and retained that appear to have an adjacent or third polymorphism (e.g., deletion or third allele) among the breeds sampled. Although these loci yield lower call rates when compared to the other loci on the panel, they were retained because they may provide biologically relevant information for traits of interest and for future improvements in the genome build.

More than 90% of the SNPs on the CanineHD BeadChip are polymorphic across the samples that were interrogated for product quality testing (Table 2). The average minor allele frequency (MAF) across all 26 breeds is 0.23, while the breed-specific MAFs range from 0.13 to 0.21 (Table 2).

Illumina Solutions for Genotyping

The high-quality data and low per-sample cost of the CanineHD BeadChip are part of the powerful Illumina Whole-Genome Genotyping Solution. In addition, optional automation and the Laboratory Information Management System (LIMS) lower costs by eliminating errors associated with manual processing. Illumina genotyping products can be accessed via Illumina Fast Track Genotyping Services or one's own

iScan system. Illumina solutions provide industry-leading levels of accuracy, flexibility, and affordability.

References

1. Coren S (2008) *The Modern Dog: A Joyful Exploration of How We Live with Dogs Today*. Free Press 268pp.
2. Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelson TS, Karlsson EK, Jaffe DE, et al. (2005) Genome Sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438(3): 803-819.
3. Chase K, Carrier DR, Adler FR, Janik T, Ostrander EA, et al. (2002) Genetic basis for systems of skeletal quantitative traits: principal component analysis of the canid skeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9930-9935.
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/dog/>

Additional Information

To learn more about Illumina's genotyping solutions, please visit www.illumina.com.

Table 1: CanineHD BeadChip Performance Data and Specifications

Parameter	Percent	Product Specification
Average Call Rate	99.80%	> 99%
Reproducibility	> 99.9%	> 99.9%
Mendelian Inconsistencies	0.002%	< 0.1%

Results based on 435 DNA samples including 18 replicates and 27 Inros across 172,115 loci.

Figure 2: CanineHD BeadChip Probe Spacing

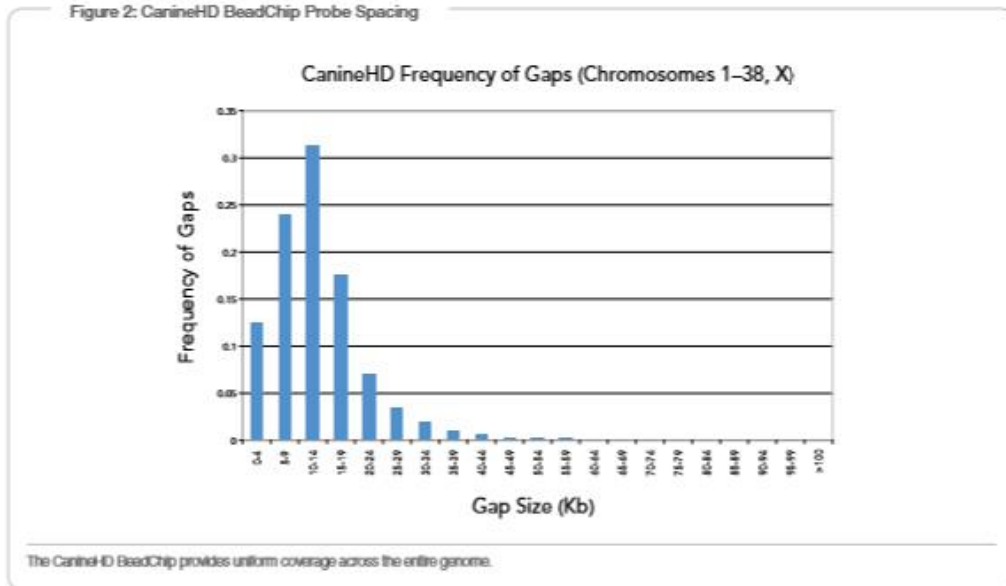


Table 2: Diversity of Breeds Used to Evaluate CanineHD BeadChip

Breed	# of DNA samples	Call Rate**	Polymorphic Loci (MAF ≥ 0.05)	Average MAF
Beagle	10	99.80	115,254	0.17
Belgian Tervuren	16	99.83	104,987	0.17
Bernese Mountain Dog	12	99.82	90,276	0.15
Border Collie	9	99.79	122,895	0.18
Brittany Spaniel	12	99.83	115,629	0.19
Cocker Spaniel	14	99.79	113,082	0.18
Dachshund	12	99.78	118,943	0.20
Dalmatian	7	99.82	113,425	0.17
Elkhound	12	99.80	115,411	0.19
English Bulldog	12	99.84	86,573	0.14
English Setter	12	99.82	106,909	0.17
Eurasian	12	99.76	106,752	0.17
Finnish Spitz	12	99.78	96,674	0.16
German Shepherd	12	99.74	93,864	0.15
Golden Retriever	15	99.77	114,278	0.18
Greenland Sled Dog	12	99.77	85,193	0.13
Greyhound	11	99.84	97,562	0.16
Jack Russell Terrier	12	99.81	126,387	0.21
Labrador Retriever	14	99.81	119,140	0.19
Nova Scotia Duck Tolling Retriever	40	99.81	108,811	0.17
Poodles	11	99.80	122,433	0.21
Rottweiler	12	99.83	95,217	0.15
Shar Pei	11	99.75	109,599	0.18
Standard Poodle	12	99.81	120,422	0.20
Weimaraner	26	99.79	94,108	0.15
Yorkshire Terrier	12	99.82	116,526	0.19
Total among all breeds	352	99.80	143,889	0.23

* Call rates across sample set include loci that appear to have deletion or third polymorphism.

† The CanineHD BeadChip was also validated with 12 samples of Akita (f-co), indicating approximately 1400 markers that appeared to segregate. This resulted in a call rate of 98.81.



Data Sheet: DNA Genotyping

Ordering Information

Catalog No.	Product	DESCRIPTION
WG-440-1001	CanineHD Whole Genome Genotyping Kit (for 48 Samples)	Each package contains four BeadChips and reagents for processing 48 samples.
WG-440-1002	CanineHD Whole Genome Genotyping Kit (for 288 Samples)	Each package contains 24 BeadChips and reagents for processing 288 samples.
WG-440-1003	CanineHD Whole Genome Genotyping Kit (for 1152 Samples)	Each package contains 96 BeadChips and reagents for processing 1152 samples.
FT-310-1236	CanineHD FastTrack Service Project	Illumina's FastTrack Services requires a minimum of 94 samples and 1.5 µg of DNA for each sample.

Each CanineHD Genotyping BeadChip can process twelve samples in parallel and assay 172,155 markers per sample

Illumina, Inc. • 9885 Towne Centre Drive, San Diego, CA 92121 USA • 1.800.809.4566 toll-free • 1.858.202.4566 tel • techsupport@illumina.com • illumina.com

FOR RESEARCH USE ONLY

© 2010 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, IlluminaCt, Solexa, Making Sense Out of Life, Oligator, Sentrix, GoldenGate, GoldenGate Indexing, DASL, BeadArray, Array of Arrays, Infinium, BeadExpress, VeraCode, IntelliHyb, iScan, CSP+o, GenomeStudio, Genetic Energy, HiSeq, and HiScan are registered trademarks or trademarks of Illumina, Inc. All other brands and names contained herein are the property of their respective owners. Pub. No. 370-2009-018 Current as of 11 November 2009



Annexe 2

Tableau des 25 gènes et locus impliqués dans l'apparition d'anomalies du crâne chez l'Homme (d'après OMIM®).

Syndrome / Clinique		Localisation Locus / Gène	Mode de transmission	Numéro OMIM gène/locus
Dysostose cléido-crânienne (CCD) Mutation du gène <i>RUNX2</i>		6p21.1	Autosomique dominant	600211
Dysmorphie faciale : Syndrome ICF 4 formes	ICF 1 Mutation du gène <i>DNMT3B</i>	20q11.21	Autosomique récessif	602900
	ICF 2 Mutation du gène <i>ZBTB24</i>	6q21	Autosomique récessif	614064
	ICF 3 Mutation du gène <i>CDCA7</i>	2q31.1	*	609937
	ICF 4 Mutation du gène <i>HELLS</i>	10q23.33	Autosomique récessif	603946
Crâniosynostose (CRS) 6 formes	CRS 1 Mutation du gène <i>TWIST1</i>	7p21.1	Autosomique dominant	601622
	CRS 2 Mutation du gène <i>MSX2</i>	5q35.2	Autosomique dominant	123101
	CRS 3 Mutation du gène <i>TCF12</i>	15q21.3	Autosomique dominant	600480
	CRS 4 Mutation du gène <i>ERF</i>	19q13.2	Autosomique dominant	611888
	CRS 5 Mutation du gène <i>ALX4</i>	11p11.2	Autosomique dominant	605420
	CRS 6 Mutation du gène <i>ZIC1</i>	3q24	Autosomique dominant	600470
Trigonocéphalie (TRIGNO) 2 formes	TRIGNO 1 Mutation du gène <i>FGFR1</i>	8p11.23	Autosomique dominant	136350
	TRIGNO 2 Mutation du gène <i>FREMI</i>	9p22.3	Autosomique dominant	608944

Syndrome / Clinique		Localisation Locus / Gène	Mode de transmission	Numéro OMIM gène/locus
Syndrome CDAGS (Craniosynostosis, Anal Anomalies, And Porokeratosis Cap Syndrome)		22q12-q13	Autosomique récessif	603116
Saethre-Chotzen Syndrome Mutations des gènes <i>FGFR2</i> et <i>TWIST1</i>		7p21.1 10q26.13	Autosomique dominant Autosomique dominant	601622 176943
Craniometaphyseal Dysplasia = CMDR Mutation du gène <i>GJA1</i>		6q22.31	Autosomique récessif	121014
Jackson-Weiss Syndrome = JWS Mutations des gènes <i>FGFR1</i> et <i>FGFR2</i>		8p11.23 10q26.13	Autosomique dominant Autosomique dominant	136350 176943
Crouzon Syndrome Mutation du gène <i>FGFR2</i>		10q26.13	Autosomique dominant	176943
Bent Bone Dysplasia Syndrome = BBDS Mutation du gène <i>FGFR2</i>		10q26.13	Autosomique dominant	176943
Apert Syndrome Mutation du gène <i>FGFR2</i>		10q26.13	Autosomique dominant	176943
Pfeiffer Syndrome Mutations des gènes <i>FGFR1</i> et <i>FGFR2</i>		8p11.23 10q26.13	Autosomique dominant Autosomique dominant	136350 176943
Dysmorphie cranio-faciale	Syndrome PMRED (Psychomotor Retardation, Epilepsy, And Craniofacial Dysmorphism) Mutation du gène <i>SNIP1</i>	1p34.3	Autosomique récessif	608241
	Syndrome CFSMR (Craniofacial Dysmorphism, Skeletal Anomalies, And Mental Retardation Syndrome) Mutation du gène <i>TMCO1</i>	1q24.1	Autosomique récessif	614123
	Syndrome JDSCD (Multiple Joint Dislocations, Short Stature, And Craniofacial Dysmorphism With Or Without Congenital Heart Defects) Mutation du gène <i>B3GAT3</i>	11q12.3	Autosomique récessif	606374

* Mode de transmission non connu au jour du permis d'imprimer de ce manuscrit

Annexe 3

Tableau des 25 gènes et locus impliqués dans l'apparition d'anomalies des côtes chez l'Homme (d'après OMIM®).

	Syndrome / Clinique	Localisation Locus / Gène	Mode de transmission	Numéro OMIM gène/locus
Short-rib thoracic dysplasia (SRTD) 16 formes	SRDT 1	15q13	Autosomique récessif	208500
	SRDT 2 Mutation du gène <i>IFT80</i>	3q25.33	Autosomique récessif	611177
	SRDT 3 Mutation du gène <i>DYNC2H1</i> Mutation digénique et bi-allélique mutation des gènes <i>DYNC2H1</i> et <i>NEK1</i>	11q22.3	Autosomique récessif Digénique récessif	603297
	SRDT 4 Mutation du gène <i>TTC21B</i>	2q24.3	Autosomique récessif	612014
	SRDT 5 Mutation du gène <i>WDR19</i>	4p14	Autosomique récessif	608151
	SRDT 6 Mutation du gène <i>NEK1</i> Mutation digénique et bi-allélique mutation des gènes <i>NEK1</i> et <i>DYNC2H1</i>	4q33	Autosomique récessif Digénique récessif	604588
	SRDT 7 Mutation du gène <i>WDR35</i>	2p24.1	Autosomique récessif	613602
	SRDT 8 Mutation du gène <i>WDR60</i>	7q36.3	Autosomique récessif	615462
	SRDT 9 Mutation du gène <i>IFT140</i>	16p13.3	Autosomique récessif	614620
	SRDT 10 Mutation du gène <i>IFT172</i>	2p23.3	Autosomique récessif	607386
	SRDT 11 Mutation du gène <i>WDR34</i>	9q34.11	Autosomique récessif	613363
	SRDT 12 ou Syndrome de Beemer-Langer	**		

Syndrome / Clinique		Localisation Locus / Gène	Mode de transmission	Numéro OMIM gène/locus
Short-rib thoracic dysplasia (SRTD) 16 formes	SRDT 13 Mutation du gène <i>CEP120</i>	5q23.2	Autosomique récessif	613446
	SRDT 14 Mutation du gène <i>KIAA0586</i>	14q23.1	Autosomique récessif	610178
	SRDT 15 Mutation du gène <i>DYNC2LI1</i>	2p21	Autosomique récessif	617086
	SRDT 16 Mutation du gène <i>IFT52</i>	20q13.12	Autosomique récessif	617094
Cranioectodermal dysplasia (CED) 4 formes	CED 1 Mutation du gène <i>IFT122</i>	3q21.3-q22.1	Autosomique récessif	606045
	CED 2 Mutation du gène <i>WDR35</i>	2p24.1	Autosomique récessif	613602
	CED 3 Mutation du gène <i>IFT43</i>	14q24.3	Autosomique récessif	614068
	CED 4 Mutation du gène <i>WDR19</i>	4p14	Autosomique récessif	608151
Spondylocostal Dysostosis (SCDO) 6 formes	SCDO 1 Mutation du gène <i>DLL3</i>	19q13.2	Autosomique récessif	602768
	SCDO 2 Mutation du gène <i>MESP2</i>	15q26.1	*	605195
	SCDO 3 Mutation du gène <i>LFNG</i>	7p22.3	*	602576
	SCDO 4 Mutation du gène <i>HES7</i>	17p13.1	Autosomique récessif	608059
	SCDO 5 Mutation du gène <i>TBX6</i>	16p11.2	Autosomique dominant	602427
	SCDO 6 Mutation du gène <i>RIPPLY2</i>	6q14.2	Autosomique récessif	609891

* Mode de transmission non connu au jour du permis d'imprimer de ce manuscrit

**Pas d'information génétique connue au jour du permis d'imprimer de ce manuscrit

Annexe 4

Documents envoyés aux propriétaires de Bouledogues français lors de la collecte des échantillons d'ADN avec dans l'ordre :

- lettre d'information au propriétaire dans le cas d'un choix de prélèvement sanguin.
- Lettre d'information pour le vétérinaire traitant qui fera ce prélèvement.
- Certificat de prélèvement dans le cas d'un choix de prélèvement sanguin et fiche de consentement.
- Lettre d'information au propriétaire dans le cas d'un choix de prélèvement buccal.
- Notice et instructions pour le prélèvement buccal.
- Certificat de prélèvement dans le cas d'un choix de prélèvement buccal et fiche de consentement.

Camille Roux

Etudiante à l'ENVA
7 Avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons-Alfort Cedex
Tel : 06-73-15-68-57
Mail : camille_marie.roux@vet-alfort.fr



Dr Marie Abitbol

UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale
ENVA
Tel : 01-43-96-70-01
Mail : m.abitbol@vet-alfort.fr

Maisons-Alfort, le

Pr Pierre Moissonnier
Chirurgie
ENVA

Objet : Etude génétique des anomalies vertébrales chez le Bouledogue Français

Madame, Monsieur,

Suite à notre conversation téléphonique, je me permets de reprendre contact avec vous par écrit. Je tiens tout d'abord à vous remercier de nouveau pour votre participation à ce projet qui consiste en la recherche du (ou des) gène(s) responsables des anomalies vertébrales thoraciques des bouledogues français.

Comme je vous l'ai expliqué, notre étude nécessite des échantillons de sang de votre chien afin d'en analyser l'ADN. Il est pour cela nécessaire que votre vétérinaire traitant réalise une prise de sang. Je vous rappelle que cet acte peut être effectué lors d'une visite vaccinale ou lors d'une consultation.

Comme convenu lors de notre entretien, je vous joins plusieurs documents :

- 1/ une lettre pour votre vétérinaire traitant qui explique les modalités de la prise de sang.
- 2/ la fiche de prélèvement que vous voudrez bien compléter et me retourner avec les échantillons et le pedigree.
- 3/ l'enveloppe préaffranchie et pré-adressée grâce à laquelle vous pourrez me faire parvenir les échantillons sanguins accompagnés de la fiche et du pedigree de votre chien.

En vous remerciant, par avance, pour votre aide.

Veuillez recevoir l'assurance de mes salutations distinguées.

Camille ROUX

Condition de l'étude : cette étude se fait dans le cadre de la thèse de Doctorat Vétérinaire d'une étudiante en deuxième année d'étude à l'École nationale vétérinaire d'Alfort.

Étudiante : Mlle Camille Roux

Directeur : Dr. Marie Abitbol, Maître de Conférences, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale

Assesseur : Pr. Pierre Moissonnier, Professeur de Chirurgie

Les informations nominatives que vous nous enverrez resteront strictement confidentielles. L'ensemble des informations cliniques et génétiques sera rassemblé de façon anonyme et fera l'objet d'une analyse statistique également anonyme, afin de rechercher l'origine génétique des anomalies vertébrales chez le Bouledogue Français.

Aucune participation financière n'est demandée pour la participation à cette étude.

Sans votre aide active, cette recherche ne pourrait pas aboutir. Nous vous remercions par avance pour votre participation.

Dr. Marie Abitbol : 01-43-96-70-01 et Camille Roux : 06-73-15-68-57

Camille Roux

Etudiante à l'ENVA
7 Avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons-Alfort Cedex
Tel : 06-73-15-68-57
Mail : camille_marie.roux@vet-alfort.fr



Dr Marie Abitbol

UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale
ENVA
Tel : 01-43-96-70-01
Mail : m.abitbol@vet-alfort.fr

Maisons-Alfort, le

Pr Pierre Moissonnier
Chirurgie
ENVA

Objet : Etude génétique des anomalies vertébrales chez le Bouledogue Français

Docteur,

Je suis étudiante vétérinaire de deuxième année à l'ENVA et je réalise ma thèse sur l'étude génétique des anomalies vertébrales thoraciques chez le Bouledogues Français. Plusieurs thèses ont déjà été soutenues à propos de la nature de ces anomalies, de leur prévalence et de leur impact sur le pronostic de l'animal. Je m'occupe de la partie génétique de cette étude : je recherche le (ou les) gène(s) responsable(s) de ces anomalies.

Votre client a eu la gentillesse de participer à l'étude avec son chien. Je sollicite donc maintenant votre aide.

Pour réaliser mon étude génétique, je dois analyser l'ADN de chiens indemnes et de chiens atteints. J'ai pour cela besoin d'échantillons sanguins.

Pourriez-vous réaliser une prise de sang (2 x 5ml) sur ce chien (les 2 tubes EDTA vous sont fournis) ? Bien retourner le tube plusieurs fois après le prélèvement pour éviter la coagulation.

Si cet acte engendre des frais, veuillez remettre une facture et un RIB à votre client qui les joindra à l'envoi des échantillons sanguins. Nous vous rembourserons dans les plus brefs délais.

En vous remerciant, par avance, pour votre aide.

Veuillez recevoir l'assurance de mes salutations distinguées.

Camille ROUX

Condition de l'étude : cette étude se fait dans le cadre de la thèse de Doctorat Vétérinaire d'une étudiante en deuxième année d'étude à l'École nationale vétérinaire d'Alfort.

Étudiante : Mlle Camille Roux

Directeur : Dr. Marie Abitbol, Maître de Conférences, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale

Assesseur : Pr. Pierre Moissonnier, Professeur de Chirurgie

Les informations nominatives que vous nous enverrez resteront strictement confidentielles. L'ensemble des informations cliniques et génétiques sera rassemblé de façon anonyme et fera l'objet d'une analyse statistique également anonyme, afin de rechercher l'origine génétique des anomalies vertébrales chez le Bouledogue Français.

Aucune participation financière n'est demandée pour la participation à cette étude.

Sans votre aide active, cette recherche ne pourrait pas aboutir. Nous vous remercions par avance pour votre participation.

Dr. Marie Abitbol : 01-43-96-70-01 et Camille Roux : 06-73-15-68-57

Recherches génétiques chez le Bouledogue

Dans le cadre de l'**étude génétique portant sur les anomalies vertébrales chez le Bouledogue Français**, nous collectons des échantillons d'ADN.

- remplir le formulaire
- joindre un prélèvement sanguin (**2 x 5ml de sang sur EDTA**, conservé et envoyé à **température ambiante**, dans une enveloppe protégée, en tarif **lettre simple** ou colissimo).

Les docteurs vétérinaires de l'ENVA ainsi que tous les membres du projet **BOULEDOGUE** s'engagent à respecter une **totale confidentialité** sur les informations transmises.

En cas de besoin, vous pouvez contacter le Dr. Marie Abitbol au 01-43-96-70-01
ou par mail : m.abitbol@vet-alfort.fr.

Identité du chien :

(Numéro de dossier ENVA si le chien a été reçu en consultation à l'ENVA :.....)

Nom : Date de naissance :

Sexe : mâle femelle Race : Bouledogue Français N° d'identification :

Coordonnées postales et téléphone du vétérinaire :

Remarques éventuelles :

Vos coordonnées postales et votre téléphone :

Adresse électronique :

Je consens à l'utilisation du prélèvement sanguin de mon chien décrit ci-dessus à des fins de recherche génétique.

- Le prélèvement pourra être utilisé par l'ENVA et ses laboratoires partenaires.

- L'identité du prélèvement restera confidentielle.

Date

Lu et approuvé.

Signature

Nous vous remercions d'envoyer cette fiche accompagnée des prélèvements au :

Dr Marie ABITBOL
UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
7 Avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons Alfort Cedex

Camille Roux

Etudiante à l'ENVA
7 Avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons-Alfort Cedex
Tel : 06-73-15-68-57
Mail : camille_marie.roux@vet-alfort.fr



Dr Marie Abitbol

UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale
ENVA
Tel : 01-43-96-70-01
Mail : m.abitbol@vet-alfort.fr

Maisons-Alfort, le

Pr Pierre Moissonnier
Chirurgie
ENVA

Objet : Etude génétique des anomalies vertébrales chez le Bouledogue Français

Madame, Monsieur,

Suite à notre conversation téléphonique, je me permets de reprendre contact avec vous par écrit. Je tiens tout d'abord à vous remercier de nouveau pour votre participation à ce projet qui consiste en la recherche du (ou des) gène(s) responsables des anomalies vertébrales thoraciques des bouledogues français.

Comme je vous l'ai expliqué, notre étude nécessite des échantillons d'ADN de votre chien. Il est pour cela nécessaire que vous réalisiez des brossettes buccales (raclages buccaux) sur votre chien. Ce prélèvement que vous pouvez réaliser vous même (voir notice jointe) est très rapide et sans douleur pour votre animal.

Comme convenu lors de notre entretien, je vous joins plusieurs documents :

- 1/ la notice pour la réalisation des brossettes buccales et leur envoi.
- 2/ la fiche de prélèvement que vous voudrez bien compléter et me retourner avec les brossettes et un pedigree.
- 3/ l'enveloppe préaffranchie et pré-adressée grâce à laquelle vous pourrez me faire parvenir les brossettes accompagnées de la fiche et du pedigree de votre chien.

En vous remerciant, par avance, pour votre aide.

Veillez recevoir l'assurance de mes salutations distinguées.

Camille ROUX

Condition de l'étude : cette étude se fait dans le cadre de la thèse de Doctorat Vétérinaire d'une étudiante en deuxième année d'étude à l'École nationale vétérinaire d'Alfort.

Étudiante : Mlle Camille Roux

Directeur : Dr. Marie Abitbol, Maître de Conférences, UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale

Assesseur : Pr. Pierre Moissonnier, Professeur de Chirurgie

Les informations nominatives que vous nous enverrez resteront strictement confidentielles. L'ensemble des informations cliniques et génétiques sera rassemblé de façon anonyme et fera l'objet d'une analyse statistique également anonyme, afin de rechercher l'origine génétique des anomalies vertébrales chez le Bouledogue Français.

Aucune participation financière n'est demandée pour la participation à cette étude.

Sans votre aide active, cette recherche ne pourrait pas aboutir. Nous vous remercions par avance pour votre participation.

Dr. Marie Abitbol : 01-43-96-70-01 et Camille Roux : 06-73-15-68-57

Instructions pour l'utilisation
des brossettes buccales
chez le chien

IMPORTANT: il ne doit pas y avoir de nourriture dans la bouche du chien lors du prélèvement. Si nécessaire, attendre 30 minutes après que le chien ait mangé avant de réaliser le prélèvement.

Noter le nom du chien et son identification (numéro de puce ou tatouage) **sur l'emballage** de chaque brossette.
Utiliser **4 brossettes par chien**.

Prélèvement

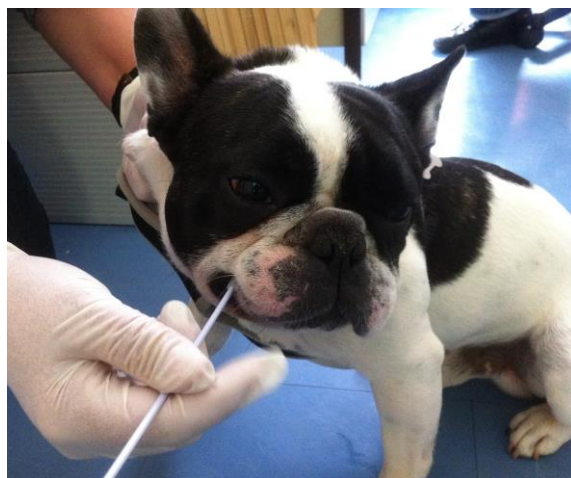
Retirer la brossette de son emballage sans toucher l'extrémité. Relever le bord de la babine du chien puis placer la brossette entre la babine et la gencive. Plaquer une main sur la joue du chien pour maintenir la brossette entre babine et gencive si nécessaire.

Frotter vigoureusement en tournant la brossette, avec la même pression que vous utiliseriez pour vous brosser les dents, pendant 20 à 30 secondes.

Envoi

Laisser les brossettes sécher à l'air libre 2 minutes avant de les replacer dans leurs emballages, **sans les fermer**.

Envoyer à température ambiante, en lettre simple.



Dr. Marie Abitbol, ENVA.



Recherches génétiques chez le Bouledogue

Dans le cadre de l'étude génétique portant sur les anomalies vertébrales chez le Bouledogue Français, nous collectons des échantillons d'ADN.

- remplir le formulaire
- joindre les prélèvements (**4 brochettes buccales**, conservées et envoyées à **température ambiante**, dans une enveloppe simple, en tarif **lettre**).

Les docteurs vétérinaires de l'ENVA ainsi que tous les membres du projet **BOULEDOGUE** s'engagent à respecter une **totale confidentialité** sur les informations transmises.

En cas de besoin, vous pouvez contacter le Dr. Marie Abitbol au 01-43-96-70-01 ou par mail : m.abitbol@vet-alfort.fr.

Identité du chien :

(Numéro de dossier ENVA si le chien a été reçu en consultation à l'ENVA :.....)

Nom : Date de naissance :

Sexe : mâle femelle Race : Bouledogue Français N° d'identification :

Coordonnées postales et téléphone du vétérinaire :

Remarques éventuelles :

Vos coordonnées postales et votre téléphone :

Adresse électronique :

Je consens à l'utilisation du prélèvement sanguin de mon chien décrit ci-dessus à des fins de recherche génétique.

- Le prélèvement pourra être utilisé par l'ENVA et ses laboratoires partenaires.

- L'identité du prélèvement restera confidentielle.

Date

Lu et approuvé.

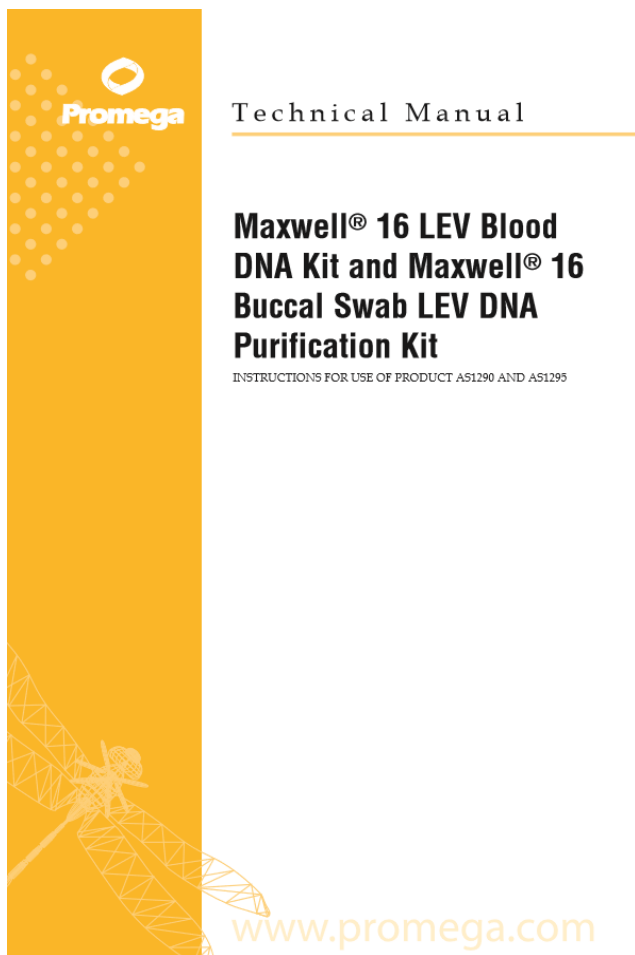
Signature

Nous vous remercions d'envoyer cette fiche accompagnée des prélèvements au :

Dr Marie ABITBOL
UMR955 Génétique Fonctionnelle et Médicale
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
7 Avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons Alfort Cedex

Annexe 5

Fiche d'utilisation de l'automate pour Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit and Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit (extraction ADN)



Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit and Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit

All technical literature is available on the Internet at www.promega.com/bs. Please visit the web site to verify that you are using the most current version of this Technical Manual. Please contact Promega Technical Services if you have questions on use of this system. E-mail: techserv@promega.com

1. Description	1
2. Product Components and Storage Conditions	2
3. Before You Begin	3
A. Preparation of Whole Blood Samples	3
B. Preparation of Buccal Swab Samples	4
C. Maxwell® 16 Cartridge Preparation	5
4. Instrument Run: AS2000 and AS3000 Instruments	6
5. Reference	9
6. Troubleshooting	9
7. Related Products	10

1. Description

The Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit and Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit are used with the Maxwell® 16 Instrument to provide an easy method for efficient, automated purification that concentrates genomic DNA (gDNA) from samples. The Maxwell® 16 Instrument is supplied with preprogrammed purification procedures and is designed for use with the predisposed reagent cartridges, maximizing simplicity and convenience. The instrument can process up to 16 samples in 40 minutes. The purified DNA can be used directly in a variety of downstream applications including PCR and agarose gel electrophoresis.

The Maxwell® 16 Instrument purifies samples using a novel paramagnetic particle, called the MagnaCel™ particle, which provides a mobile solid phase that optimizes sample capture, washing and purification of gDNA. This particle utilizes cellulose-based binding of nucleic acids and provides a higher bind capacity and cleaner eluate than traditional silica-based DNA purification. The Maxwell® 16 Instrument is a magnetic particle-handling instrument that efficiently binds gDNA to the paramagnetic particle in the first well of a prefilled cartridge and mixes during processing. The approach to magnetic capture avoids common problems such as clogged tips or partial reagent transfers that result in suboptimal purification processing by other commonly used automated systems.

Promega Corporation · 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 USA
Toll Free in USA 800-356-9526 · Phone 608-274-4330 · Fax 608-277-2516 · www.promega.com
Printed in USA. Part# TM333
Revised 1/11 Page 1

2. Product Components and Storage Conditions

Product	Size	Cat.#
Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit	48 preps	AS1290

For Laboratory Use. Sufficient for 48 automated isolations from 300µl of whole blood samples. Includes:

- 2 × 1ml Proteinase K (PK) Solution
- 20ml Lysis Buffer
- 48 Maxwell® 16 LEV Cartridges (MCD)
- 50 LEV Plungers
- 50 Elution Tubes (0.5ml)
- 20ml Elution Buffer

Storage Conditions: Store the Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit at 15–30°C.

Product	Size	Cat.#
Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit	48 preps	AS1295

For Laboratory Use. Sufficient for 48 automated isolations from buccal swab samples. Includes:

- 2 × 1ml Proteinase K (PK) Solution
- 20ml Lysis Buffer
- 48 Maxwell® 16 LEV Cartridges (MCD)
- 50 LEV Plungers
- 50 Elution Tubes (0.5ml)
- 20ml Elution Buffer
- 50 Clearing Columns

Storage Conditions: Store the Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit at 15–30°C.

Available Separately (recommended for buccal swab protocol)

Product	Size	Cat.#
Microtubes, 1.5ml	1,000/bag	V1231

Safety Information: The reagent cartridges contain ethanol and isopropanol. These substances should be considered flammable, harmful and irritants.



The Maxwell® 16 reagent cartridges are designed to be used with potentially infectious substances. Users should wear appropriate protection (e.g., gloves and goggles) when handling infectious substances. Users should adhere to their institutional guidelines for the handling and disposal of all infectious substances when used with this system.

3. Before You Begin

Maxwell® 16 Instrument Hardware and Firmware Setup

To use the Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit or Buccal Swab LEV DNA Purification Kit, the Maxwell® 16 Instrument must be configured with LEV hardware. If your Maxwell® 16 Instrument contains standard elution volume (SEV) hardware, it will need to be reconfigured using the Maxwell® 16 LEV Hardware Kit (Cat.# AS1250). Reconfiguring the instrument is simple and easy. Refer to the *Maxwell® 16 Instrument Technical Manual* specific for your instrument for directions.

Materials to Be Supplied by the User

- optional, rotating tube mixer for liquid blood samples
- benchtop vortex mixer
- pipettors and pipette tips for sample transfer into pre-filled reagent cartridges
- 1.5–2.0ml tubes for incubation of samples (e.g., Microtubes, 1.5ml [Cat.# V1231])
- heating block set at 56°C
- microcentrifuge (buccal swab protocol)
- buccal swabs (e.g., Puritan Medical Products Cat.# 25-806 1PD or 25-806 1PC)

3.A. Preparation of Whole Blood Samples (Cat.# AS1290)

Whole Blood Sample Processing Capacity

The total yield of genomic DNA from whole blood samples depends on the sample volume and number of white blood cells/ml. Each cartridge supplied in the Maxwell® 16 LEV Blood DNA Purification Kit is designed to purify genomic DNA from up to 300µl of whole blood, assuming an average number of white blood cells in the range of 4×10^6 to 1.1×10^7 /ml whole blood (values for a normal healthy adult; 1).

Note: Whole blood samples collected in EDTA, ACD or heparin tubes can be used. These samples may be either fresh or frozen. Frozen samples should be thawed before processing. We recommend mixing all blood samples before use. EDTA blood collection tubes are preferred if the purified DNA will be used in downstream amplification assays.

1. Mix all blood samples for at least 5 minutes at room temperature.
2. Prepare and label incubation tubes compatible with heating block.
3. Add 30µl of Proteinase K (PK) Solution to each incubation tube.
4. Add liquid blood (up to 300µl) to each incubation tube.
5. Add 300µl of Lysis Buffer to each incubation tube.
6. Vortex each tube for 10 seconds.
7. Incubate each tube in the heating block (set to 56°C) for 20 minutes. During this incubation, prepare cartridges as described in Section 3.C.
8. Transfer each blood lysate sample from the incubation tube to well #1 of each cartridge. (Well #1 is the well closest to the cartridge label and furthest from the user.)

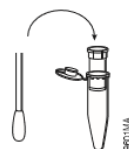
3.B. Preparation of Buccal Swab Samples (Cat.# AS1295)

Buccal Swab Sample Processing Capacity

The total yield of genomic DNA from buccal swab samples depends on the cellular material contained on the swabs. Each cartridge supplied in the Maxwell® 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit is designed to purify genomic DNA from 1 or 2 buccal swabs.

Note: Customers have performed this protocol successfully with samples collected using Pur-Wraps Sterile Polyester Tipped Applicators, Puritan Medical Products Cat.# 25-806 1PD or Pur-Wraps Sterile Cotton Tipped Applicators, Puritan Medical Products Cat.# 25-806 1PC. We also recommend using Promega Microtubes, 1.5ml (Cat.# V1231) for sample preparation.

1. Collect samples with a standard buccal swab collection procedure.
2. Assemble a Clearing Column/microtube for each sample.
3. Cut the head off the applicator stick. Add dried swab head to the Clearing Column/microtube assembly.
4. In a separate tube, mix 300µl Lysis Buffer + 30µl Proteinase K for each sample.
5. Add 330µl of Lysis Buffer/Proteinase K to swab head in the Clearing Column/microtube assembly.
6. Close tube over the Clearing Column and vortex for 10 seconds.



- Note:** If using tubes other than the recommended Cat.# V1231, the tube may not close.
7. Incubate for 20 minutes at 56°C.
 8. Centrifuge the Clearing Column/microtube assembly with swab for 2 minutes at maximum speed.
 9. Remove the Clearing Column with swab head and discard.
 10. Add flowthrough to well #1 of the Maxwell® 16 LEV cartridge (see section 3.C for cartridge preparation).
 11. Process using Maxwell® 16 in LEV Research Mode using the LEV Blood method (see Section 4).
 12. Once the extraction is complete, remove and cap each elution tube. Store appropriately until use.

3.C. Maxwell® 16 Cartridge Preparation

1. Change gloves before handling cartridges, LEV Plungers and Elution Tubes. Place the cartridges to be used in the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack (Cat.# AS1251). Place each cartridge in the rack with the label side facing away from the Elution Tubes. Press down on the cartridge to snap it into position. Carefully peel back the seal so that all plastic comes off the top of the cartridge. Ensure that all sealing tape and any residual adhesive are removed before placing cartridges in the instrument.
2. Place one plunger into well #8 of each cartridge.
3. Place an empty Elution Tube into the Elution Tube position for each cartridge in the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack. Add 50µl of Elution Buffer to the bottom of each Elution Tube.

Notes:

1. If you are processing fewer than 16 samples, center the cartridges on the platform.
2. Specimen or reagent spills on any part of the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack should be cleaned with a detergent-water solution, followed by a bacteriocidal spray or wipe, then water. Do not use bleach on any instrument parts.

Well	Contents	User Adds:
1	Binding Buffer	Sample
2	Paramagnetic Cellulose Particles	
3	Wash Buffer	
4	Wash Buffer	
5	Wash	
6	Wash	
7	Water	
8	Empty	Plunger

Figure 1. Maxwell® 16 LEV DNA Purification Cartridge. This figure shows the contents of a cartridge. In all cases, lysate sample is added to well #1.



Figure 2. Setup and configuration in the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack. Elution Buffer is added to the Elution Tubes as indicated.

4. Instrument Run: AS2000 and AS3000 Instruments

Setup for AS2000 Maxwell® 16 Instruments

Refer to the *Maxwell® 16 Instrument Operating Manual* #TM295 for more detailed information.

To run the “Blood” protocol, you must have Maxwell® 16 firmware version 4.71 or higher installed on your instrument.

1. Turn on the Maxwell® 16 Instrument. The instrument will power up, display the firmware version number, proceed through a self-check and home all moving parts.
2. Verify that the instrument settings indicate an “LEV” hardware configuration and “Rsch” operational mode setting.
3. Select “Run” on the Menu screen, and press the Run/Stop button to start the method.
4. Select “DNA” on the menu screen, then select “OK” at the Verification screen.
5. Select “Blood” on the Menu screen, then select “OK” at the Verification screen. “Blood” Method is used for both kits (Cat.# A51290 and A51295).
6. Open the door when prompted to do so on the screen. Press the Run/Stop button to extend the platform.



Warning: Pinch point hazard.

7. Transfer the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack containing the prepared cartridges on the Maxwell® 16 Instrument platform. Ensure that the rack is placed in the Maxwell® 16 Instrument with the Elution Tubes closest to the door. The rack will only fit in the instrument in this orientation. If you have difficulty fitting the rack on the platform, check that the rack is in the correct orientation. Ensure that the cartridge rack is level on the instrument platform.

Note: Hold the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack by the sides to avoid dislodging cartridges from the rack.

8. Verify that samples were added to well #1 of the cartridges, cartridges are loaded on the instrument, Elution Tubes are present with 50µl of Elution Buffer and LEV Plungers are in well #8.
9. Press the Run/Stop button. The platform will retract. Close the door.



Warning: Pinch point hazard.

10. The Maxwell® 16 Instrument will immediately begin the purification run. The screen will display the steps performed and the approximate time remaining in the run.

Notes:

1. Pressing the Run/Stop button or opening the door will pause the run.
2. If the run is abandoned before completion, the instrument will wash the particles off the plungers and eject the plungers into well #8 of the cartridge. The sample will be lost.

11. When the automated purification run is complete, the LCD screen will display a message that the method has ended.

End of Run

12. Follow on-screen instructions at the end of the method to open door. Verify that plungers are located in well #8 of the cartridge at the end of the run. If plungers are not removed from the magnetic plunger bar, push them down gently by hand to remove them.

13. Press the Run/Stop button to extend the platform out of the instrument.

14. Remove the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack from the instrument. Remove Elution Tubes containing DNA, and close the tubes.



Note: Following the automated purification procedure, the LEV Cartridge Rack will be warm. It will not be too hot to touch. To remove the rack from the instrument platform, hold onto the sides of the rack.



15. Remove the cartridges and plungers from the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack, and discard as hazardous waste. Do not reuse reagent cartridges, LEV Plungers or Elution Tubes.

Setup for AS3000 Maxwell® 16 MDx Instruments

Refer to the *Maxwell® 16 MDx Instrument Technical Manual* #TM320 for detailed information. To run the “Blood” protocol, you must have the Maxwell® 16 Firmware version 1.10 or higher installed on your instrument

1. Turn on the Maxwell® 16 MDx Instrument. The instrument will power up, display the firmware version number, proceed through a self-check and home all moving parts.
2. Verify that the Home screen indicates “LEV” and the LEV hardware is present. Press “Run” to continue.
3. Enter user and PIN, if this option is enabled.
4. At the Protocols screen, select “DNA”.
5. At the Method screen, select “Blood”.
6. On the next screen, verify that the correct user was chosen. The protocol should read “DNA”. Select “Run/Stop” to continue.

4. Instrument Run: AS2000 and AS3000 Instruments (continued)

- Open the door when prompted on the screen, then select "Run/Stop".



Warning: Pinch point hazard.

- Follow on-screen instructions for bar code reader input if this option is enabled.
- Transfer the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack containing the prepared cartridges on the Maxwell® 16 Instrument platform. Ensure that the rack is placed in the Maxwell® 16 Instrument with the Elution Tubes closest to the door. The rack will only fit in the instrument in this orientation. If you have difficulty fitting the rack on the platform, check that the rack is in the correct orientation. Ensure the rack is level on the instrument platform.

Note: Hold the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack by the sides to avoid dislodging cartridges from the rack.
- Verify that samples were added to well #1 of the cartridges, cartridges are loaded on the instrument, Elution Tubes are present with 50µl of Elution Buffer and LEV Plungers are in well #8.
- Press the Run/Stop button. The platform will retract. Close the door.



Warning: Pinch point hazard.

The Maxwell® 16 Instrument will immediately begin the purification run. The screen will display the approximate time remaining in the run.

Notes:

- Pressing the Run/Stop button or opening the door will pause the run.
 - If the run is abandoned before completion, the instrument will wash the particles off the plungers and eject the plungers into well #8 of the cartridge. The samples will be lost.
- When the automated purification run is complete, follow instructions on the screen for data transfer. For detailed instructions, refer to the *Maxwell® 16 MDx Instrument Technical Manual #TM320* and *Maxwell® Sample Track Software Technical Manual #TM314*.

End of Run

- Follow on-screen instructions at the end of the method to open door. Verify that plungers are located in well #8 of the cartridge at the end of the run. If plungers are not removed from the magnetic plunger bar, push them down gently by hand to remove them.

- Press the Run/Stop button to extend the platform out of the instrument.

- Remove the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack from the instrument. Remove Elution Tubes containing DNA, and cap the tubes.



Note: Following the automated purification procedure, the LEV Cartridge Rack will be warm. It will not be too hot to touch. To remove the rack from the instrument platform, hold onto the sides of the rack.



- Remove the cartridges and plungers from the Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack, and discard as hazardous waste. Do not reuse reagent cartridges, LEV Plungers or Elution Tubes.

For the Maxwell® 16 MDx Instrument, ensure samples are removed before the UV light treatment to avoid damage to the nucleic acid.

5. Reference

- Henry, J.B. (2001) *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20th ed., W.B. Saunders Company, 509.

6. Troubleshooting

For questions not addressed here, please contact your local Promega Branch Office or Distributor. Contact information available at: www.promega.com. E-mail: techserv@promega.com

Symptoms	Causes and Comments
Lower than expected A_{260} (lower than expected yield)	<p>Blood that has undergone multiple freeze-thaw cycles may have degraded DNA. Use fresh samples whenever possible, or avoid multiple freeze-thaw cycles.</p> <p>Proteinase K Solution was not added. The lysis and yield are dependent upon complete extraction with proteinase K. If proteinase K was not added in Section 3.A, Step 3, the resulting blood sample will be red. Proteinase K-treated samples turn greenish brown. This can be used as a quick diagnostic method of determining whether or not the proteinase K was added.</p> <p>Whole blood sample contained low white blood cell count. The yield of genomic DNA from blood samples depends on the number of white blood cells present in the sample</p>

6. Troubleshooting

Symptoms	Causes and Comments
Lower than expected A_{260} (lower than expected yield, continued)	Whole blood sample was not mixed before processing. Be sure to mix whole blood samples before processing to ensure that the white blood cells are in suspension. In some cases, total RNA can be copurified with the genomic DNA. To remove copurified RNA, an RNase treatment can be performed. Add 5 μ l of RNase A (Cat.# A7973) per milliliter of Elution Buffer. If yield is low for the buccal swab protocol, your swab may not contain enough cellular material. Examine the buccal swab collection method.

7. Related Products

Product	Size	Cat.#
Maxwell® 16 MDx Instrument	1 each	AS3000
Maxwell® 16 Instrument	1 each	AS2000
Maxwell® 16 LEV Hardware Kit	1 each	AS1250
RNase A Solution, 4mg/ml	1ml	A7973
Microtubes, 1.5ml	1,000/bag	V1231

ÉTUDES GÉNÉTIQUES ET MOLÉCULAIRES DES ANOMALIES VERTÉBRALES THORACIQUES DANS UNE COHORTE DE BOULEDOGUES FRANÇAIS

NOM et Prénom : ROUX Camille, Marie

Résumé :

Il a été montré que 92% des chiens Bouledogue Français présentent des anomalies vertébrales qui sont le plus souvent asymptomatiques et diagnostiquées de façon fortuite. Une composante génétique à la survenue de ces anomalies, dans la race, est fortement suspectée.

Après un rappel du phénotype standard recherché chez le Bouledogue Français et des différentes anomalies vertébrales retrouvées dans la race, sont présentés les diverses stratégies de recherche de gènes morbides et le déterminisme génétique des anomalies vertébrales chez différentes espèces de Mammifères.

La partie expérimentale de cette étude avait pour objectif de caractériser génétiquement les anomalies vertébrales thoraciques chez le Bouledogue Français, avec à terme le but d'identifier le ou les locus en cause afin de proposer un test de dépistage qui permettrait de réduire la prévalence de ces anomalies dans la race.

Nous avons mis en évidence un très probable mode de transmission de type polygénique, sans locus majeur. Une étude d'association initiale, réalisée avec une première cohorte de 79 chiens, n'a pas permis d'identifier de locus significativement associé à la présence d'anomalies vertébrales thoraciques chez nos chiens.

Ces résultats peuvent s'expliquer par différents facteurs : le nombre de chiens limités pour ce genre d'analyse, la faible proportion d'animaux indemnes et le mode de transmission de type polygénique.

Néanmoins, compte tenu d'une composante génétique dans le phénotype des anomalies vertébrales, le programme de recherche génétique doit être poursuivi, notamment en augmentant le nombre de chiens dans la cohorte et en particulier le nombre d'individus indemnes.

Mots clés : ANATOMIE / PATHOLOGIE / RACHIS / MALFORMATION CONGÉNITALE / SÉLECTION / PRÉDISPOSITION / ADN / GÉNÉTIQUE / RACE CANINE / CARNIVORE DOMESTIQUE / CHIEN / BOULEDOGUE FRANÇAIS.

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. ABITBOL M.

Assesseur : Pr. MOISSONNIER P.

Invités : Pr. TIRET L. et Dr. DESQUILBET L.

GENETIC AND MOLECULAR STUDIES OF THORACIC VERTEBRAL ABNORMALITIES IN A COHORT OF FRENCH BULLDOGS

SURNAME : ROUX

Given name : Camille, Marie

Summary :

Previous studies have shown that 92% of French Bulldog dogs have vertebral abnormalities that are most of the time asymptomatic and diagnosed incidentally. A genetic component for these vertebral abnormalities is highly suspected.

In this thesis, we first present the standard phenotype of French Bulldog and the various vertebral abnormalities described in the breed. Then we detail the different genetic strategies that allow to search for morbid loci and the genetic determinism of vertebral abnormalities in several Mammal species.

In the experimental part, we have analysed the genetics of thoracic vertebral abnormalities in a cohort of French Bulldog dogs. The long-term goal of this study was to identify loci involved in vertebral abnormalities to develop a DNA test, in order to reduce the prevalence of these abnormalities in the breed.

We have identified that vertebral abnormalities are mostly probably inherited with a polygenic mode of inheritance without major locus. A first association study performed with 79 dogs was unable to detect a locus that was significantly associated with thoracic vertebral abnormalities in our dogs.

This result can be explained by several factors : the small number of dogs included in the study, the low proportion of animals without vertebral abnormalities (control dogs) and the polygenic mode of inheritance.

Our work needs to be continued by genotyping more French Bulldog dogs especially control animals without vertebral abnormalities.

Keywords : ANATOMY / PATHOLOGY / SPINE / CONGENITAL MALFORMATION / SELECTION / PREDISPOSITION / DNA / GENETIC / DOG BREED / DOMESTIC CARNIVORE / DOG / FRENCH BULLDOG

Jury :

President : Pr.

Director : Dr. ABITBOL M.

Assessor : Pr. MOISSONNIER P.

Guests : Pr. TIRET L. and Dr. DESQUILBET L.