

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2009-2010 - Thèse n°



***LE SYNDROME LETAL DU POULAIN BLANC :
MISE AU POINT D'UN TEST DE DIAGNOSTIC
MOLECULAIRE***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 7 Mai 2010
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Fanny SEIGNOBOS
Née le 7 Mai 1984
à Valence (26)



ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2009-2010 - Thèse n°



LE SYNDROME LETAL DU POULAIN BLANC : MISE AU POINT D'UN TEST DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 7 Mai 2010
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Fanny SEIGNOBOS
Née le 7 Mai 1984
à Valence (26)

Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, membre de UNIVERSITÉ DE LYON



Nom	Prénom	Grade	
ALOGNINOJWA	Théodore	PR1	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) - Dpt Production animale
ARCANGIOLI	Marie-Anne	MC Classe Normale	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale UR UMR ENVL AFSSA Mycoplasmoses des Ruminants
ARTOIS	Marc	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Production animale UR UMR 5525 CNRS E.J.F. EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
AVISON	Timothy	PCEA	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé)
BECKER	Claire	MC Classe Normale Stagiaire	UP Pathologie du bétail UR UMR ENVL AFSSA Mycoplasmoses des Ruminants
BELLI	Patrick	MC Contractuel	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Analyses de Laboratoire
BELLUCO	Sara	MC Classe Normale Stagiaire	UP Pathologie Morphologique et Clinique
BENAMOU-SMITH	Agnès	MC Classe Normale	UP Equine - Dpt Equine UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
BENOIT	Etienne	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
BERNY	Philippe	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
BERTHELET	Marie-Anne	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs)
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL ERI 22 (INSERM) Agression Vasculaire Réponse tissulaire PT Logistique Bureau de la Pédagogie et de la Vie Etudiante Direction Adjoint au directeur - Chargée de la Vie étudiante
BOULOCHER	Caroline	MC Classe Normale Stagiaire	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores - UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
BOURDOISEAU	Gilles	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Carnivores UR Thématique Leishmaniose Direction Adjoint au Directeur
BOURGOIN	Gilles	MC Classe Normale	PT Laboratoires d'analyses Parasitologie
BRUYERE	Pierre	MC Contractuel	UP Reproduction
BUBLOT	Isabelle	MC Contractuel	UP Médecine des Carnivores - Dpt Carnivores
BUFF	Samuel	MC Classe Normale	UP Reproduction - Dpt Carnivores UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle PT CERREC PT Formation continue
BURONFOSSE	Thierry	MC Hors Classe	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Analyses de Laboratoire UR UMR 271 INSERM Hépatites virales
CADORE	Jean-Luc	PR1	UP Médecine des Carnivores - Dpt Equine UR UMR 754 INRA - UCBL - ENVL - EPHE Rétrovirus Pathologie comparée Direction Adjoint au directeur - Chargé de missions
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 958 Protozoaires entériques des volailles
CAROZZO	Claude	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
CHABANNE	Luc	PR2	UP Médecine des Carnivores Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
CHALVET-MONFRAY	Karine	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Industrie UR UMR 5525 CNRS E.J.F. EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
COMMUN	Loic	MC Contractuel	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) Dpt Analyses de Laboratoire
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR CNRS 5558
DEMONT	Pierre	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
DESJARDINS PESSON	Isabelle	MC Contractuel	UP Equine
EGRON-MORAND	Germaine	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) Dpt Production animale
ESCRIOU	Catherine	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
FAU	Didier	PR2	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores - UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
FLEURY	Catherine	PR2	UP Equine - Dpt Equine
FOURNEL	Corinne	PR1	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
FRANCK	Michel	PR1	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) - Dpt Production animale -
FRIKHA	Mohamed-Ridha	MC Classe Normale	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale
GANGL	Monika	MC Contractuel	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Equine
GARNIER	François	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores
GENEVOIS	Jean-Pierre	PRX	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	PR2	UP Biologie Fonctionnelle

Nom	Prénom	Grade	
GONTHIER	Alain	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 958 Protozoaires entériques des volailles
GRAIN	Françoise	PR2	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) Dpt Analyses de Laboratoire PT Logistique Bureau de la Pédagogie et de la Vie Etudiante Direction Adjoint au directeur - Chargée de la Pédagogie
GRANCHER	Denis	MC Hors Classe	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) - Dpt Production animale UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques Direction Adjoint au directeur - Chargé des relations intérieures
GREZEL	Delphine	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
GUERIN	Pierre	PR2	UP Reproduction - Dpt Production animale UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Analyses de Laboratoire UR UMR CNRS 5558
HUGONNARD	Marine	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores - Dpt Carnivores UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
JAUSSAUD	Philippe	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie PT Laboratoires d'analyses Laboratoire LEPS
JUNOT	Stéphane	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL ERI 22 (INSERM) Agression Vasculaire Réponse tissulaire
KECK	Gérard	PR1	UP Biologie fonctionnelle Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
KODJO	Angeli	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire Dpt Industrie UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
LACHERETZ	Antoine	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire Dpt Industrie
LAMBERT	Véronique	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) Dpt Analyses de Laboratoire
LE-GRAND	Dominique	MC Hors Classe	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale
LEBLOND	Agnes	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire Dpt Equine UMR INRA EPIA - UR 346
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	MC Classe Normale	UP Reproduction - Dpt Equine UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle
LEPAGE	Olivier	PR1	UP Equine - Dpt Equine
LOUKIADIS	Estelle	ISPV	UR UPSP 5201 Microbiologie alimentaire et prévisionnelle
LOUZIER	Vanessa	MC Classe Normale	UP Biologie Fonctionnelle
MARCHAL	Thierry	MC Hors Classe	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
MARTIN	Gillian	PCEA	PT Logistique LANGUES
MIALET	Sylvie	ISPV	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
MOUNIER	Luc	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) - Dpt Production animale UR UMR INRA URH
PIN	Didier	MC Classe Normale	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores
PONCE	Frédérique	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores + Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
PORTIER	Karine	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Equine
POUZOT	Céline	MC Contractuel	PT CHEV CHEVAC - SIAMU
PROUILLAC	Caroline	MC Classe Normale	PT CHEV UMR 1233 Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
REMY	Denise	PR2	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores
RICHARD	Yves	PRX	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne PT Logistique Bureau de la Recherche Direction Directeur scientifique
ROGER	Thierry	PR1	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Industrie UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux PT ICLB PT Formation continue
SABATIER	Philippe	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Production animale UR UMR 5525 CNRS EJP EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
SAWAYA	Serge	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Equine UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
SERGEANT	Delphine	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UPSP 5201 Microbiologie alimentaire et prévisionnelle
THIEBAULT	Jean-Jacques	MC Hors Classe	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores
VIALARD	Jacquemine	MC Hors Classe	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechnique et santé) - Dpt Analyses de Laboratoire
VIGUIER	Eric	PR1	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	MC Contractuel	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Analyses de Laboratoire
ZENNER	Lionel	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Production animale

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Alain CALENDER

De la Faculté de médecine de Lyon

Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse

Hommages respectueux

A Madame le Professeur Françoise GRAIN

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Pour nous avoir proposé ce travail et nous avoir encadrée lors de sa réalisation

Sincère et profonde reconnaissance

A Madame le Professeur Jacquemine VIALARD

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Pour son accueil en tant que Directrice du LVD 69 et pour la mise à disposition des locaux et du matériel de son laboratoire lors de la réalisation de la partie expérimentale de cette thèse

Et pour avoir accepté de faire partie de ce jury

Sincères remerciements

A Madame Karine GROUD

Du Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône

Pour son aide technique, sa disponibilité et ses précieux conseils

Toute ma gratitude

A mes parents,

Ca y est j'ai enfin fini même si ça a été un peu long,

Merci de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de ces années,

Si je suis arrivée là c'est grâce à vous, je suis fière d'être votre fille.

A Bastien,

Mon petit frère adoré, pour tous ces moments passés ensemble, pour ces quelques soirées de l'accueil FBI-JJP que je ne suis pas prête d'oublier,

Je te souhaite beaucoup de réussite dans ta vie professionnelle, personnelle et sportive.

A papi Pierrot et mamie Georgette,

Parce que si j'ai choisi cette voie, c'est sûrement grâce à vous,

Et pour tous vos encouragements durant mes études, je vous remercie.

A mamie Paulette

Pour m'avoir appris tant de choses et pour ton soutien immense pendant toute ma scolarité,

Un grand merci.

A papi Marcel,

Pour tous ces mercredis où tu t'es occupé de moi,

Tu es parti bien trop tôt, mais là où tu es j'espère que tu es fier de moi.

A Romain,

A ces 4 années (déjà !) passées ensemble et à celles à venir,

Je t'aime.

TABLE DES MATIERES

<i>Liste des figures</i>	13
<i>Liste des tableaux</i>	15
<i>Liste des annexes</i>	17
<i>Liste des abréviations</i>	19
<i>Introduction</i>	21
Première partie : Etude bibliographique du syndrome létal du poulain blanc.....	23
<i>Chapitre I : La maladie de Hirschsprung et ses variantes animales</i>	25
A. Présentation de la maladie	25
1. Définition et classification.....	25
2. Epidémiologie	25
3. Présentation clinique et diagnostic.....	26
4. Diagnostic différentiel.....	27
5. Prise en charge et pronostic	27
B. Syndromes associés à la maladie de Hirschsprung.....	28
1. Les neurocristopathies fréquemment associées à la maladie de Hirschsprung	28
a. Néoplasie endocrinienne multiple de type 2 et carcinome médullaire de la thyroïde familial	28
b. Neuroblastome.....	29
c. Syndrome d’hypoventilation centrale congénitale.....	29
d. Syndrome de Waardenburg	29
e. Autres neurocristopathies	30
2. Autres syndromes fréquemment associés à la maladie de Hirschsprung	30
C. Mécanisme de la maladie causé par un développement embryonnaire anormal	31
1. Physiopathologie et anatomopathologie de la maladie	31
2. Développement embryonnaire anormal des individus malades	31
D. Les voies de signalisation intervenant dans la maturation des cellules nerveuses entériques et les molécules mises en jeu	33
1. La voie de signalisation par la protéine RET.....	34
2. La voie de signalisation par le système EDN3/EDNRB	35
E. Les bases génétiques de la maladie de Hirschsprung.....	37
1. La voie de signalisation par la protéine RET.....	37
2. La voie de signalisation par l’endothéline 3.....	38
3. Autres gènes impliqués dans la maladie de Hirschsprung.....	39
a. Le gène Sox10	39
b. Les gènes plus rarement impliqués dans la maladie de Hirschsprung	40

4.	Interactions et transmissions des différents allèles impliqués	41
5.	Les bases génétiques du syndrome de Shah-Waardenburg	41
F.	Les modèles murins de la maladie de Hirschsprung.....	45
1.	Le modèle piebald lethal chez la souris	45
2.	Le modèle lethal spotting chez la souris	49
3.	Le modèle dom chez la souris	52
4.	Le modèle spotting lethal chez le rat	55
<i>Chapitre II : Le syndrome léthal du poulain blanc</i>		<i>61</i>
A.	Présentation de la maladie	61
1.	Signes cliniques	61
2.	Observations post mortem	63
3.	Diagnostic différentiel.....	63
B.	La mutation impliquée dans le syndrome léthal du poulain blanc, les méthodes permettant de la détecter et l'étude de sa répartition	65
1.	Le gène mis en cause et sa mutation	65
2.	Le mode de transmission de la maladie.....	68
3.	Les tests de dépistage de la mutation.....	70
a.	Dépistage par PCR-RFLP.....	70
b.	Dépistage par PCR spécifique d'allèles	71
4.	La répartition de la mutation dans la population équine	74
a.	La mutation rencontrée chez différentes races.....	74
b.	La mutation et les différentes robes	75
C.	Intérêts de l'étude du syndrome léthal du poulain blanc.....	80
1.	Intérêt en biologie cellulaire	80
2.	Intérêt pour l'étude de la maladie de Hirschsprung	81
3.	Intérêt en médecine vétérinaire et en élevage.....	83
Deuxième partie : Mise au point de la technique PCR pour la détection de l'allèle léthal responsable du LWFS		87
<i>Chapitre I : Objectifs de l'étude expérimentale</i>		<i>89</i>
<i>Chapitre II : Matériel et méthode</i>		<i>91</i>
A.	Matériel	91
1.	Matériel biologique.....	91
a.	Les chevaux.....	91
b.	Les prélèvements.....	93
2.	Matériel expérimental	93
a.	Matériel commun à toute les étapes.....	93
b.	Matériel nécessaire à l'extraction de l'ADN	93
c.	Les amorces	94

d.	Matériel et réactifs	95
B.	Méthode	95
1.	Les prélèvements	95
a.	Méthode de prélèvement.....	95
b.	Conservation.....	95
2.	Les amorces	96
a.	Définition des amorces	96
b.	Préparation et conservation des solutions d'amorces	96
3.	Les autres réactifs	96
4.	Extractions d'ADN	96
a.	Extraction de l'ADN à partir des échantillons de sang	96
b.	Extraction de l'ADN à partir des échantillons de crins	97
c.	Tableau récapitulatif des extractions en fonction du matériel biologique	97
5.	Réalisation de l'amplification par PCR	98
a.	Milieu réactionnel.....	98
b.	Cycles de PCR.....	101
c.	Analyse des produits amplifiés	102
6.	Suivi des bonnes pratiques de laboratoire.....	103
a.	Risques de contamination des échantillons et prévention.....	103
b.	Risques de manipulation des réactifs et prévention	105
	<i>Chapitre III : Résultats</i>	107
A.	Résultats des PCR lors de la mise au point du test	107
1.	Avec les amorces déjà publiées	107
a.	Amorces LWF-s1/LWF-as2	107
b.	Amorces LWF-s1/LWF-as4.....	109
c.	Amorces LWF-s3/LWF-as2	110
d.	Amorces LWF-s3/LWF-as6.....	111
e.	Amorces LWFm-s5/LWF-as2.....	111
f.	Amorces LWF-s3/LWF-as2/LWF-as6	114
g.	Amorces LWF-s3/LWFm-s5/LWF-as2	115
h.	Amorces LWF-s3/LWFm-s5/LWF-as2/LWF-as6	116
2.	Avec les amorces créées	118
a.	Avec les amorces LWFm-s7/LWF-as2	118
b.	Avec les amorces LWFm-s9/LWF-as2	119
c.	Avec les amorces LWF-s3/LWFm-s9/LWF-as2/LWF-as6	120
3.	Choix des conditions finales du test.....	125
4.	Application des conditions finales sur les extraits d'ADN issus des échantillons de crins	126

B.	Résultats du test sur les autres chevaux.....	128
1.	Résultat du test sur les chevaux hétérozygotes.....	128
2.	Résultat du test sur les chevaux de statut inconnu	129
3.	Résultat du test sur le poulain blanc et sa mère.....	130
4.	Résultats du test après sa commercialisation sur des chevaux de statut inconnu.....	131
<i>Chapitre IV : Discussion</i>		<i>133</i>
A.	Le gène ciblé	133
B.	Matériel	133
1.	Les animaux	133
2.	Les prélèvements	134
C.	Méthode	135
1.	L'extraction d'ADN génomique.....	135
2.	L'amplification de l'ADN par PCR	135
a.	Variation de stringence du milieu réactionnel	135
b.	Choix des amorces et variation de leurs concentrations.....	138
c.	Variation de sensibilité et de spécificité	139
d.	Variation des cycles d'amplification	140
3.	La migration et la révélation des produits amplifiés.....	140
D.	Résultats	141
1.	Répétabilité et reproductibilité.....	141
a.	Répétabilité.....	141
b.	Reproductibilité	141
2.	Sensibilité et spécificité.....	141
E.	Proposition d'un test de diagnostic et de dépistage	142
1.	Détermination des conditions finales du test	142
2.	Commercialisation du test	144
a.	Annonce du lancement du test en France.....	144
b.	Document technique de demande d'analyse.....	145
F.	Intérêt du test PCR dans le cadre du syndrome léthal du poulain blanc.....	145
1.	Intérêt en élevage	145
2.	Intérêt en médecine vétérinaire	146
3.	Perspectives	146
<i>Conclusion</i>		<i>147</i>
Bibliographie.....		149
Annexes		163

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE HIRSCHSPRUNG.....	31
FIGURE 2 : MIGRATION DES CELLULES PRECURSEURS DES MELANOCYTES ET DES CELLULES NERVEUSES INTESTINALES	32
FIGURE 3 : MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA MIGRATION, MATURATION ET DIFFERENCIATION DES MELANOCYTES ET DES CELLULES NERVEUSES ENTERIQUES.....	33
FIGURE 4 : LES LIGANDS DE LA FAMILLE DU GDNF ET LEURS INTERACTIONS PREFERENTIELLES AVEC LEURS RECEPTEURS	34
FIGURE 5 : ACTIVATION DE LA PROTEINE RET PAR INTERACTION AVEC LE GFRA1 ET LE GDNF	35
FIGURE 6 : STRUCTURE DES ENDOTHELINES	36
FIGURE 7 : SOURIS <i>PIEBALD SPOTTING</i> (<i>s/s</i>) EN HAUT ET <i>PIEBALD LETHAL</i> (<i>S^L/S^L</i>) EN BAS	46
FIGURE 8 : OREILLE INTERNE DE SOURIS <i>+/+</i> ET DE SOURIS <i>S^L/S^L</i> : OBSERVATION DES MELANOCYTES DANS LE VESTIBULE ET LA STRIE VASCULAIRE	47
FIGURE 9 : LOCALISATION DU GENE <i>EDNRB</i> MURIN ET ANALOGIE AVEC LE GENE HUMAIN	48
FIGURE 10: SOURIS <i>LETHAL SPOTTING</i>	50
FIGURE 11 : LOCALISATION DU GENE <i>EDN3</i> MURIN ET ANALOGIE AVEC LE GENE HUMAIN	51
FIGURE 12 : FACE DORSALE (A) ET FACE VENTRALE (B) D'UNE SOURIS <i>DOM/+</i>	53
FIGURE 13 : SEQUENCES D'ACIDES AMINES CODEES PAR LE GENE <i>SOX10</i> NON MUTE (<i>C57BL/6J</i>) ET MUTE (<i>DOM</i>).....	54
FIGURE 14 : RATS <i>SPOTTING LETHAL</i> ET SAUVAGE ET PARTIE DISTALE DE LEUR TUBE DIGESTIF RESPECTIFS	56
FIGURE 15 : ASPECT MICROSCOPIQUE DES PLEXUS MYENTERIQUE (PHOTO DE GAUCHE) ET SOUS MUQUEUX (PHOTO DE DROITE) AU NIVEAU DU COLON	58
FIGURE 16 : SEQUENCE PARTIELLE DU GENE <i>EDNRB</i> CHEZ LE RAT	59
FIGURE 17 : POULAIN ATTEINT DE LWFS.....	61
FIGURE 18 : CHEVAL DE ROBE OVERO.....	65
FIGURE 19 : ALLELE NORMAL ET ALLELE MUTE SUR UNE PARTIE DU GENE <i>EDNRB</i> DU CHEVAL	66
FIGURE 20 : SEQUENCE D'ACIDES AMINES COMPLETE DE LA PROTEINE <i>EDNRB</i> DU CHEVAL.....	68
FIGURE 21 : MODELE DE TRANSMISSION DU SYNDROME LETAL DU POULAIN BLANC	69
FIGURE 22 : RESULTAT DE LA PCR-RFLP AVEC DIGESTION PAR <i>BFA1</i>	70
FIGURE 23 : RESULTAT DE LA PCR-RFLP AVEC DIGESTION PAR <i>SAU3AI</i>	71
FIGURE 24 : RESULTAT DE LA PCR SPECIFIQUE D'ALLELE REALISEE PAR SANTSCHI ET AL. (1998)	72
FIGURE 25 : RESULTAT DE LA PCR SPECIFIQUE D'ALLELE REALISEE PAR METALLINOS ET AL. (1998)	73
FIGURE 26 : CHEVAL PAINT HORSE.....	74
FIGURE 27 : CHEVAL DE ROBE TOBIANO	75
FIGURE 28 : CHEVAL DE ROBE OVERO	76
FIGURE 29 : CHEVAL DE ROBE TOVERO.....	76
FIGURE 30 : CHEVAUX DE ROBE CALICO, MEDICINE HAT ET BALD-FACE	78
FIGURE 31 : CHEVAL FRAME OVERO NON PORTEUR DE L'ALLELE MUTE.....	80

FIGURE 32 : ALIGNEMENT DE SEQUENCES D'ACIDES AMINES DU PREMIER DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE ET DES REGIONS VOISINES DE LA PROTEINE EDNRB CHEZ DIFFERENTES ESPECES	81
FIGURE 33 : "BOO", UN EXEMPLE DE CHEVAL ENTIEREMENT BLANC NON ATTEINT	84
FIGURE 34 : EMPLACEMENT SCHEMATIQUE DES AMORCES SUR LE GENE EDNRB	95
FIGURE 35 : RESULTAT DE LA PCR AVEC LES AMORCES LWF-s1/LWF-AS2	108
FIGURE 36 : RESULTAT DE LA PCR AVEC LES AMORCES LWF-s1/LWF-AS4	109
FIGURE 37 : RESULTAT DE LA PCR AVEC LES AMORCES LWF-s3/LWF-AS2	110
FIGURE 38 : RESULTAT DE LA PCR AVEC LES AMORCES LWF-s3/LWF-AS6	111
FIGURE 39 : RESULTATS DES PCR AVEC LES AMORCES LWFm-s5/LWF-AS2.....	112
FIGURE 40 : RESULTAT DE LA PCR AVEC LES AMORCES LWF-s3/LWF-AS2/LWF-AS6	114
FIGURE 41 : RESULTAT DE LA PCR AVEC LES AMORCES LWF-s3/LWFm-s5/LWF-AS2.....	115
FIGURE 42 : RESULTATS DES PCR AVEC LES AMORCES LWF-s3/LWFm-s5/LWF-AS2/LWF-AS6	117
FIGURE 43 : RESULTAT DE LA PCR AVEC LES AMORCES LWFm-s7/LWF-AS2.....	118
FIGURE 44 : RESULTAT DE LA PCR AVEC LES AMORCES LWFm-s9/LWF-AS2.....	119
FIGURE 45 : RESULTATS DES PCR AVEC LES AMORCES LWF-s3/LWFm-s9/LWF-AS2/LWF-AS6 AVEC AMPLIFICATION : 94°C – 3min ; 94°C – 5s ; T°C – 10s ; 72°C – 30s 45 cycles; 72°C – 10min ; 8°C – ∞.....	120
FIGURE 46 : RESULTATS DES PCR AVEC LES AMORCES LWF-s3/LWFm-s9/LWF-AS2/LWF-AS6 AVEC AMPLIFICATION : 94°C – 3min ; 94°C – 10s ; T°C – 20s ; 72°C – 40s 45 cycles; 72°C – 10min ; 8°C – ∞.....	122
FIGURE 47 : RESULTATS DES PCR AVEC LES AMORCES LWF-s3/LWFm-s9/LWF-AS2/LWF-AS6 AVEC AMPLIFICATION : 94°C – 3min ; 94°C – 10s ; T°C – 20s ; 72°C – 30s 45 cycles; 72°C – 10min ; 8°C – ∞.....	124
FIGURE 48 : RESULTAT DE LA PCR DE CHOIX DES CONDITIONS FINALES DU TEST DE DIAGNOSTIC DU SYNDROME LETAL DU POULAIN BLANC	125
FIGURE 49 : RESULTAT DE LA PCR CONDITIONS FINALES APPLIQUEE AUX EXTRAITS D'ADN ISSUS DES ECHANTILLONS DE CRINS	126
FIGURE 50 : RESULTAT DU TEST SUR LES CHEVAUX HETEROZYGOTES	128
FIGURE 51 : RESULTAT DU TEST SUR LES CHEVAUX DE STATUT INCONNU	129
FIGURE 52 : RESULTAT DU TEST SUR LE POULAIN BLANC ET SA MERE.....	130
FIGURE 53 : EXEMPLE DE L'EFFET DE LA DIMINUTION DE CONCENTRATION EN MgCl ₂	137
FIGURE 54 : EXEMPLE DE L'EFFET DE L'AUGMENTATION DE TEMPERATURE	138
FIGURE 55 : TEXTE D'INFORMATION SUR LA DISPONIBILITE D'UN TEST « SYNDROME LETAL DU POULAIN BLANC » EN FRANCE	144

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : CRITERES DIAGNOSTIQUES DU SYNDROME DE WAARDENBURG.....	29
TABLEAU II : FREQUENCE DES DIFFERENTS POLYMORPHISMES ALLELIQUES DU GENE RET CHEZ DES INDIVIDUS ATTEINTS DE MALADIE DE HIRSCHSPRUNG ET CHEZ DES INDIVIDUS SAINS	38
TABLEAU III: GENES IMPLIQUES DANS LA MALADIE DE HIRSCHSPRUNG.....	40
TABLEAU IV : LES DIFFERENTES MUTATIONS RETROUVEES CHEZ L'HOMME ATTEINT DE SYNDROME DE SHAH-WAARDENBURG	43
TABLEAU V : LES CAUSES DE COLIQUES CHEZ LE POULAIN.....	64
TABLEAU VI : REGIONS PRESUMEEES DE LA PROTEINE EDNRB ET LEUR LOCALISATION	67
TABLEAU VII : SEQUENCE DES AMORCES SENS ET ANTI-SENS UTILISEES DANS LE TEST DE SANTSCHI ET AL. (1998) ET LONGUEUR DES FRAGMENTS AMPLIFIES	71
TABLEAU VIII : TAILLE DES FRAGMENTS AMPLIFIES ENTRE LES DIFFERENTES AMORCES UTILISEES PAR METALLINOS ET AL. (1998).....	73
TABLEAU IX : LES TROIS SOUS-TYPES DE LA ROBE OVERO.....	77
TABLEAU X : GENOTYPE POUR LE GENE EDNRB EN FONCTION DE LA ROBE	78
TABLEAU XI : GENES IMPLIQUES DANS LE SYNDROME DE SHAH-WAARDENBURG CHEZ L'HOMME ET CHEZ LES MODELES ANIMAUX, MUTATIONS ET LOCALISATION	82
TABLEAU XII : DESCRIPTION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DES ANIMAUX PRELEVES EN VUE DE LA MISE AU POINT DU TEST	92
TABLEAU XIII : COMMÉMORATIFS DES CHEVAUX DONT LES PROPRIETAIRES ONT DEMANDE LE TEST	93
TABLEAU XIV : LES AMORCES : SEQUENCE ET TEMPERATURE DE FUSION T _M	94
TABLEAU XV : LES AMORCES CREEES ET LEUR TEMPERATURE DE FUSION T _M	95
TABLEAU XVI : NATURE DES PRELEVEMENTS ET NUMERO D'EXTRAIT D'ADN POUR CHAQUE CHEVAL	98
TABLEAU XVII : CARACTERISTIQUES DU MELANGE REACTIONNEL	100
TABLEAU XVIII : PROGRAMMES DU THERMOCYCLEUR UTILISES	101
TABLEAU XIX : RESULTATS DU TEST APRES SA COMMERCIALISATION.....	131
TABLEAU XX : CONDITIONS EXPERIMENTALES DU TEST	143

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : LES REACTIFS.....	165
ANNEXE 2 : LE MATERIEL.....	167
ANNEXE 3 : EXEMPLE DE FICHE TECHNIQUE D'UNE AMORCE DEJA PUBLIEE	169
ANNEXE 4 : METHODE D'EXTRACTION D'ADN MANUELLE AVEC LE KIT NUCLEOSPIN® BLOOD QUICKPURE	171
ANNEXE 5 : METHODE D'EXTRACTION D'ADN MANUELLE AVEC LE KIT NUCLEOSPIN® TISSUE	173
ANNEXE 6 : METHODE D'EXTRACTION D'ADN SEMI AUTOMATISEE AVEC LE KIT MAGNESIL® KINGFISHER, GENOMIC SYSTEM ET LE KINGFISHER™	175
ANNEXE 7 : LES DIFFERENTES CONDITIONS DE PCR REALISEES.....	177
ANNEXE 8 : DOCUMENT D'ACCOMPAGNEMENT DES PRELEVEMENTS (PAGE 1)	181
ANNEXE 9 : DOCUMENT D'ACCOMPAGNEMENT DES PRELEVEMENTS (PAGE 2)	183

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : ACIDE DESOXIRIBONUCLEIQUE

ARN : ACIDE RIBONUCLEIQUE

dNTP : DESOXYRIBONUCLEOTIDES (AVEC N=A (ADENINE), N=G (GUANINE), N=T (THYMINE) ET N=C (CYTOSINE))

EDTA : ETHYLENE DINITRO TETRACETIC ACID

ECE : ENZYME DE CONVERSION DE L'ENDOTHELINE

EDN : ENDOTHELINE

EDNRB : RECEPTEUR AUX ENDOTHELINES DE TYPE B

GNDF : GLIAL CELL-LINE-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR

GFRA1 : GDNF FAMILY RECEPTOR A 1

GPI : GLYCOPHOSPHATIDYLINOSITOL

HSCR : HIRSCHSPRUNG

LWFS : LETHAL WHITE FOAL SYNDROM

PB : PAIRE DE BASES

PCR : POLYMERASE CHAIN REACTION

RET : RECEPTEUR TYROSINE KINASE

ABREVIATION DES ACIDES AMINES :

Nom	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu

Nom	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Pyrolysine	O	Pyl
Sélocystéine	U	Sec
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

INTRODUCTION

Les maladies génétiques sont nombreuses chez l'homme mais aussi chez les différentes espèces animales. Ce sont des maladies dues à une ou plusieurs anomalies dans le génome qui sont transmises à la descendance et qui entraînent un dysfonctionnement de certaines cellules. Parmi les maladies génétiques, on retrouve des affections bénignes ou peu handicapantes ou au contraire des affections graves voire mortelles. Ces maladies, notamment lorsqu'elles ont des conséquences graves, sont difficiles à gérer du point de vue médical et psychologique : chez l'Homme, tous les traitements possibles sont mis en œuvre alors que chez les animaux, la stratégie de reproduction est adaptée.

Le syndrome léthal du poulain blanc fait parti de ces maladies génétiques à conséquences graves. Cette maladie a été décrite par des éleveurs de Paint Horse et de Quarter Horse dans les années 60 puis a fait l'objet d'une première publication en 1977. Depuis, cette maladie a largement été étudiée et les connaissances se sont approfondies. Les symptômes de la maladie sont des coliques dans les 24 heures suivant la naissance du poulain. Ces coliques sont dues à une aganglionose du côlon qui entraîne une dilatation extrême de celui-ci puis la mort dans les 48 heures suivant la naissance. Cette anomalie des cellules nerveuses du côlon fait suite à une anomalie de développement de la crête neurale durant la gestation. Chez ces animaux, la cause de cette anomalie de développement est la substitution de deux paires de bases dans le premier exon du gène codant pour le récepteur aux endothélines de type B. Il en résulte un changement de conformation de ce récepteur qui perd donc sa fonction et son implication dans la migration des cellules issues de la crête neurale. Cette maladie est aussi connue chez l'homme sous le nom de maladie de Hirschsprung. Elle correspond à une aganglionose d'un segment plus ou moins important de l'intestin distal qui entraîne donc des signes cliniques proportionnels à la taille de la zone non innervée. Chez l'homme, plusieurs gènes sont impliqués et d'autres anomalies de développement sont souvent associées. Des modèles murins existent et permettent de mieux comprendre le fonctionnement des différentes molécules intervenant dans le développement de la crête neurale.

Dans une première partie, seront étudiées la maladie de Hirschsprung et ses variantes chez les rongeurs avant de détailler la maladie chez le cheval ainsi que ses particularités. La deuxième partie, expérimentale, consiste en la mise au point d'un test génétique permettant de détecter l'allèle muté.

PREMIERE PARTIE :

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DU
SYNDROME LETAL DU POULAIN BLANC**

CHAPITRE I : LA MALADIE DE HIRSCHSPRUNG ET SES VARIANTES ANIMALES

A. Présentation de la maladie

1. *Définition et classification*

La maladie de Hirschsprung, découverte en 1888 par le pédiatre danois Harald Hirschsprung, est une maladie génétique se traduisant par une occlusion intestinale néonatale ou par une constipation sévère chez l'enfant et l'adulte (BIDAUD, et al., 1997). Elle est due à une absence de cellules ganglionnaires du système nerveux parasymphatique au niveau des plexus myentérique (plexus d'Auerbach) et sous-muqueux (plexus de Meisner) du tube digestif dans sa partie distale suite à un arrêt précoce (entre la 5^{ème} et la 12^{ème} semaine de gestation) de la migration crânio-caudale des cellules de la crête neurale à l'origine du système nerveux digestif ; elle est classée dans la catégorie des neurocristopathies (PUFFENBERGER, et al., 1994 b; ETCHEVERS, et al., 2007; AMIEL, et al., 2008).

Il existe plusieurs degrés de la maladie. Le sphincter anal interne est toujours la limite inférieure de l'aganglionose mais la limite supérieure varie selon les sujets atteints (BIDAUD, et al., 1997; AMIEL, et al., 2008).

La plupart des sujets (80%) sont atteints de la forme recto-sigmoïdienne dans laquelle l'aganglionose débute au plus tôt au niveau de la valvule sigmoïde (BIDAUD, et al., 1997).

La forme pancolique où la totalité du côlon est touchée concerne environ 8 à 10% des malades.

Une forme totale existe chez 1% des malades : ici, l'aganglionose s'étend à l'ensemble de l'intestin grêle et du côlon.

La dernière forme, moins grave et concernant environ 8% des malades, est restreinte au rectum (PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008).

2. *Epidémiologie*

Cette maladie touche environ 1 enfant sur 5000. Dans la forme recto-sigmoïdienne, on note un ratio homme-femme de 4/1 alors que dans les formes étendues, le ratio est de 1/1.

L'incidence de la maladie varie significativement selon les groupes ethniques (Asiatiques plus touchés que les Hispaniques) (ETCHEVERS, et al., 2007; AMIEL, et al., 2008; PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008).

Les formes familiales de la maladie représentent 6 à 20% des cas selon les auteurs alors que les formes isolées apparaissent dans 70% des cas (BIDAUD, et al., 1997; PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008). Dans les formes longues, il semble qu'un ou plusieurs allèles autosomiques dominants de faible pénétrance interviennent. Les formes courtes quant à elles se transmettraient selon un modèle multifactoriel (BIDAUD, et al., 1997).

Une anomalie chromosomique est présente dans 12% des cas de maladie de Hirschsprung (la trisomie 21 représente 90% des cas d'anomalies chromosomiques).

Cette maladie est associée dans 18% des cas à d'autres anomalies congénitales : malformations crânio-faciales, cardiaques, rénales et des membres. Le taux de malformations associées est plus important dans les formes familiales que dans les formes isolées (39% contre 21%) (PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008).

3. Présentation clinique et diagnostic

Les signes cliniques sont présents chez les nouveau-nés avec un retard à l'expulsion du méconium (24 à 48 heures après la naissance), une distension abdominale, des vomissements et des signes de coliques (AMIEL, et al., 2008). La distension abdominale diminue souvent suite à un toucher rectal ou à un sondage qui provoque une émission de selles liquides. Les signes cliniques deviennent de plus en plus importants au fil des heures (PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008).

Parfois, le diagnostic est plus tardif et se fait chez des enfants, ou même des adultes, ayant toujours présenté une constipation plus ou moins marquée et parfois une distension abdominale ou une courbe de croissance anormale (AMIEL, et al., 2008; PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008).

Le diagnostic proprement dit passe par des examens complémentaires comme la radiographie abdominale sur laquelle l'intestin grêle apparaît dilaté, accompagné ou non d'une dilatation du côlon proximal. Le côlon distal est quant à lui invisible. La zone d'arrêt de la dilatation correspond à la jonction entre les parties innervées et non innervées du côlon. Des radiographies avec produit de contraste sont aussi réalisées mais sont difficiles à

interpréter dans les formes courtes de la maladie (AMIEL, et al., 2008; PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008).

La manométrie rectale est une méthode qui permet d'évaluer le reflexe recto-anal inhibiteur. Il est difficilement interprétable dans les premières semaines de la vie car il est absent chez le nouveau-né. Ce test est très spécifique mais peu sensible et peut donc entraîner des faux négatifs (PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008).

La biopsie rectale est l'examen complémentaire de choix dans le diagnostic de la maladie de Hirschsprung. Elle peut se faire par aspiration sans anesthésie : dans ce cas on prélève la muqueuse et la sous muqueuse du rectum, parfois la musculature. La biopsie peut aussi être réalisée de manière chirurgicale sous anesthésie : dans ce cas, on obtient toute l'épaisseur de la paroi rectale. Cette seconde technique est réalisée lorsque la première ne permet pas de faire le diagnostic (10% des cas). Suite à la biopsie, on réalise un examen histologique : l'absence de cellules ganglionnaires dans les plexus myentériques et l'hyperplasie des cellules de Schwann concomitante confirment la maladie. (AMIEL, et al., 2008; PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008)

4. Diagnostic différentiel

Il convient de rechercher les autres causes d'obstruction intestinale telles que l'iléus méconial, les malformations intestinales, les syndromes de pseudo-obstruction intestinale et les obstructions fonctionnelles de l'intestin. Dans tous les cas, on effectue un bilan sanguin complet ainsi que des biopsies rectales afin de vérifier l'absence de maladie de Hirschsprung (PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008).

5. Prise en charge et pronostic

La prise en charge immédiate du nourrisson se fait par les examens complémentaires conduisant au diagnostic. Parallèlement, un nursing est réalisé permettant l'évacuation des selles (lavements, touchers rectaux, massages abdominaux) et une réalimentation rapide. (PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008)

La prise en charge chirurgicale consiste à retirer le segment d'intestin non innervé. Dans les formes peu étendues, une entérectomie permettant de relier le côlon sain au canal anal est réalisable mais une colostomie transitoire est souvent effectuée. Dans les formes graves, une nutrition parentérale est nécessaire et parfois sur de longues périodes. La mortalité

est bien sûr plus importante dans les formes longues que dans les formes courtes (AMIÉL, et al., 2008).

Le pronostic d'ensemble et à long terme montre que 90% des enfants sont continents après chirurgie (PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008).

B. Syndromes associés à la maladie de Hirschsprung

Dans 18% des cas de maladie de Hirschsprung, on retrouve d'autres anomalies congénitales chez les patients. Les cas syndromiques sont plus fréquents dans les cas familiaux de maladie de Hirschsprung que dans les cas isolés (39% contre 21%) ce qui laisse supposer que la transmission de ces syndromes se fait selon les lois mendéliennes (AMIÉL, et al., 2008). Les syndromes associés sont nombreux : certaines associations ont été caractérisées facilement mais, pour certains syndromes, l'apparition concomitante avec une maladie de Hirschsprung ne s'est produite qu'un faible nombre de fois, ce qui pose le problème de savoir si les deux affections sont apparues indépendamment ou si elles ont un point de départ génétique commun. L'étude de ces syndromes est donc intéressante pour la recherche des gènes impliqués dans la maladie de Hirschsprung.

1. Les neurocristopathies fréquemment associées à la maladie de Hirschsprung

Une neurocristopathie est une maladie dont l'origine est une anomalie dans la migration, la différenciation, la division ou la durée de vie des cellules de la crête neurale qui entraîne des dysplasies organiques ou tissulaires. Les caractéristiques cliniques et pathologiques de ces neurocristopathies sont extrêmement diverses alors qu'elles ont la même origine (ETCHEVERS, et al., 2007).

a. Néoplasie endocrinienne multiple de type 2 et carcinome médullaire de la thyroïde familial

Il existe 2 types de néoplasie endocrinienne multiple : MEN2A et MEN2B. Ce sont des syndromes de prédispositions au carcinome médullaire de la thyroïde, au phéochromocytome et à l'hyperplasie des glandes parathyroïdes. Ce syndrome se transmet selon un mode autosomal dominant. Des mutations non-sens sur le gène *RET* ont été identifiées chez ces malades et certains cas étaient associés à une maladie de Hirschsprung (ROMEIO, et al., 1998).

b. Neuroblastome

C'est la tumeur solide la plus fréquente chez l'enfant avec une incidence de 1/10 000. Cette tumeur apparaît à n'importe quel endroit du système nerveux sympathique. Le neuroblastome est souvent associé à la maladie de Hirschsprung et au syndrome d'hypoventilation centrale congénitale (ROHRER, et al., 2002). Dans chacune de ces associations, on a retrouvé des mutations sur le gène *PHOX2B* alors que ces mutations sont rares dans les neuroblastomes isolés (PERRI, et al., 2005).

c. Syndrome d'hypoventilation centrale congénitale

Aussi appelé syndrome d'Ondine, c'est un dysfonctionnement du contrôle autonome de la respiration ce qui engendre une réponse anormale en cas d'hypoxie ou d'hypercapnie. Ce syndrome est associé à la maladie de Hirschsprung dans 20% des cas. Des mutations sur le gène *PHOX2B* sont la cause de la maladie (TRANG, et al., 2005).

d. Syndrome de Waardenburg

C'est un syndrome combinant des anomalies pigmentaires et une surdité neurosensorielle congénitale résultant de l'absence de mélanocytes et de la strie vasculaire de la cochlée (MC CALLION et CHAKRAVARTI, 2001). La fréquence du syndrome de Waardenburg est d'environ 1/50 000 naissances (KARACA, et al., 2009). Le diagnostic du syndrome de Waardenburg se fait sur la base de critères majeurs et mineurs. Si la personne est porteuse de deux critères majeurs ou d'un critère majeur et de deux critères mineurs au minimum, elle est considérée comme atteinte de ce syndrome (KARACA, et al., 2009). Les critères sont détaillés dans le Tableau I.

Critères majeurs	Critères mineurs
- surdité neurosensorielle congénitale unilatérale ou bilatérale - anomalie pigmentaire de l'iris : hétérochromie irienne partielle ou totale - mèche blanche de cheveux - Déplacement latéral du canthus interne de l'œil conjointement à une distance interpupillaire normale - un apparenté au 1er degré atteint	- taches cutanées hypopigmentées - synophris ou sourcils fournis et confluent - racine du nez haute et large - hypoplasie des ailes du nez - Blanchissement prématuré des cheveux

Tableau I : Critères diagnostiques du syndrome de Waardenburg

(d'après KARACA, et al., 2009)

La combinaison du syndrome de Waardenburg et de la maladie de Hirschsprung définit le syndrome de Shah-Waardenburg ou syndrome de Waardenburg de type 4 (AMIEL, et al., 2008; KARACA, et al., 2009) ou encore maladie de Hirschsprung de type II (MC CALLION et CHAKRAVARTI, 2001). Plus de 50 cas ont été décrits dans la littérature.

Ce syndrome associant la maladie de Hirschsprung et des défauts de pigmentation de la peau et de l'iris est celui qui se rapproche le plus du syndrome léthal du poulain blanc chez le cheval.

e. Autres neurocristopathies

Syndrome de dysautonomie familiale, myéloméningocoele, neurofibromatose de type 1,... (AMIEL, et al., 2008)

2. *Autres syndromes fréquemment associés à la maladie de Hirschsprung (AMIEL, et al., 2008)*

- *Syndrome de Mowat-Wilson*

C'est un syndrome associant un retard mental important avec une microcéphalie, de l'épilepsie, un développement moteur altéré et étant parfois associé à un mégacôlon. Des mutations du gène *ZFHX1B* (Zinc Finger Homeo Box 1B) ont été retrouvées dans plus de 100 cas.

- *Syndrome de Goldberg-Shprintzen*

Ce syndrome ressemble beaucoup au précédent mais n'a pas la même cause génétique. Dans ce cas, le retard mental est modéré et est associé à une microcéphalie, un faciès déformé,... Le gène mis en cause est *KIAA1279*.

- *Anomalie des membres*

On retrouve des anomalies telles que la polydactilie, l'hypoplasie des phalanges distales, la brachydactilie, associées à la maladie de Hirschsprung.

- *Syndrome de Bardet-Biedl et de McKusick-Kauffman, syndrome de Smith-Lemli-Opitz, ...*

C. Mécanisme de la maladie causé par un développement embryonnaire anormal

1. *Physiopathologie et anatomopathologie de la maladie*

Lors de l'évolution de la maladie, l'intestin proximal se dilate et la transition est progressive ou abrupte avec l'intestin distal non innervé (Figure 1). L'intestin augmente non seulement de diamètre mais aussi de longueur dans des proportions différentes suivant la durée d'évolution.

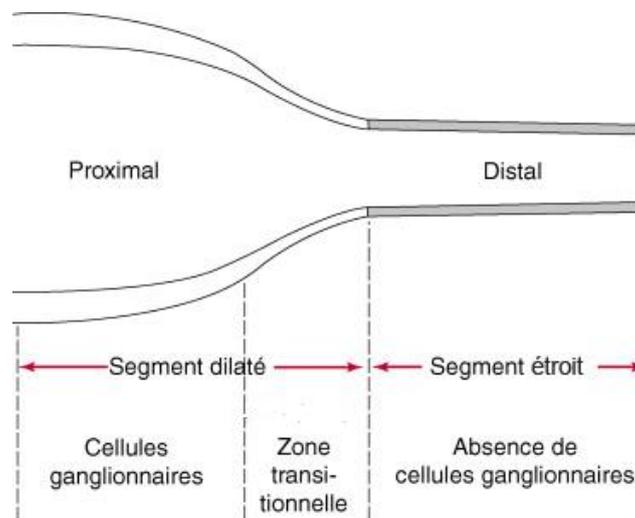


Figure 1 : Physiopathologie de la maladie de Hirschsprung

(PHILIPPE-CHOMETTE, et al., 2008)

Cette dilatation est due à l'absence de cellules ganglionnaires dans l'intestin distal qui permettent normalement le péristaltisme et donc un maintien du transit intestinal. Les cellules ganglionnaires proviennent de la crête neurale dont le développement normal est décrit ci-après.

2. *Développement embryonnaire anormal des individus malades*

Les cellules de la crête neurale sont produites, chez l'embryon, de la 3^{ème} à la 5^{ème} semaine de gestation, au niveau des bourrelets médullaires séparant la plaque neurale de l'ectoderme. Okamoto et Ueda (1967) ont montré, après coloration, qu'il existe une migration de ces cellules entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine de gestation dans le sens crânio-caudal en partant de l'œsophage (Figure 2). A ce moment là, les cellules se détachent et prennent un aspect mésenchymateux. Cette migration se termine à la 12^{ème} semaine de gestation.

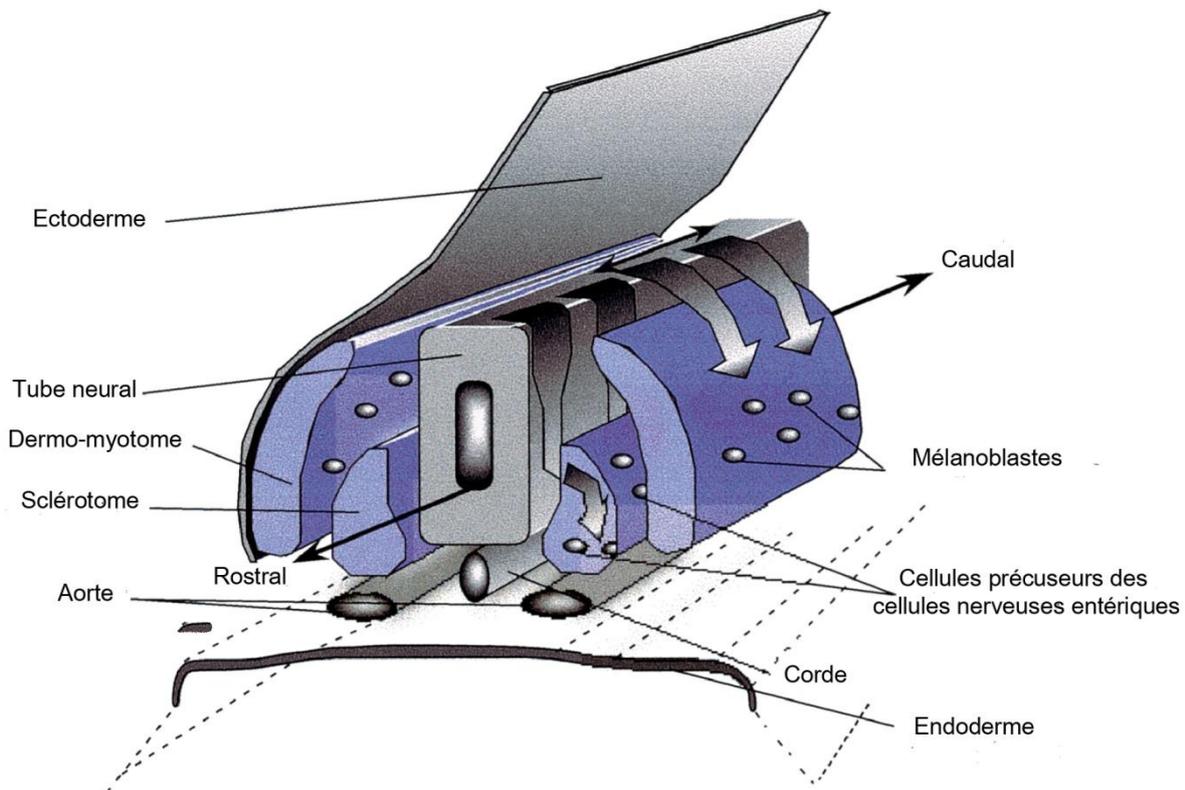


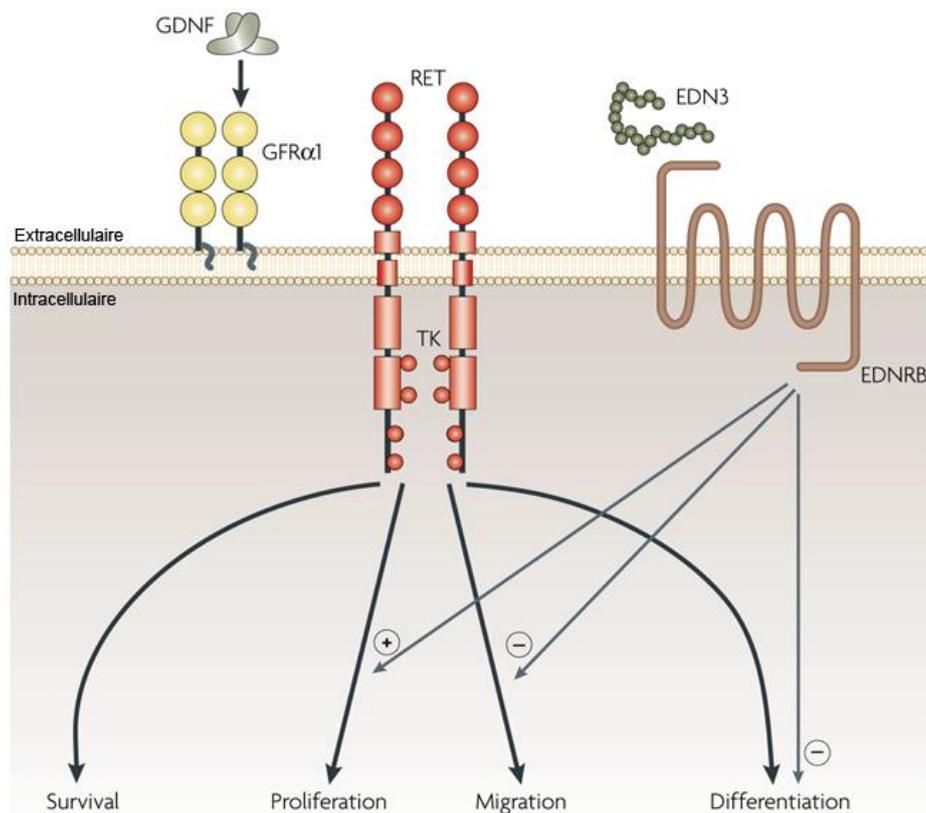
Figure 2 : Migration des cellules précurseurs des mélanocytes et des cellules nerveuses intestinales

(d'après MCCALLION et CHAKRAVARTI, 2001)

Les cellules de la crête neurale sont les précurseurs des neurones et des cellules de support de l'ensemble du système nerveux périphérique, des cellules adrénergiques et autres cellules endocrines et des cellules pigmentaires excepté celles provenant de la rétine. On comprend donc que la formation du système nerveux entérique repose sur la migration, la prolifération et la différenciation des cellules entériques dérivées de la crête neurale. On peut donc en déduire que l'aganglionose du côlon est due à un développement anormal et que plus tôt intervient l'anomalie, plus le segment intestinal atteint est long (OKAMOTO et UEDA, 1967; ETCHEVERS, et al., 2007). Ces migrations, proliférations et différenciations en cellules nerveuses de ces cellules souches sont sous la dépendance de signaux moléculaires spécifiques et de voies d'activation en cascade où interviennent notamment la protéine RET (Récepteur Tyrosine Kinase), l'endothéline, ...

D. Les voies de signalisation intervenant dans la maturation des cellules nerveuses entériques et les molécules mises en jeu

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la maturation des cellules à l'origine des cellules nerveuses entériques. Dans chacune de ces voies, de nombreuses molécules interviennent et le mécanisme exact de migration, prolifération, différenciation n'est pas encore connu. La Figure 3 présente les principales molécules impliquées.



RET : Récepteur Tyrosine Kinase

GFR α 1 : GDNF family receptor α 1

TK : Tyrosine Kinase

EDN3 : Endothéline 3

GDNF : Glial Cell Derived Neurotrophic Factor

EDNRB : Récepteur aux endothélines de type B

Figure 3 : Molécules impliquées dans la migration, maturation et différenciation des mélanocytes et des cellules nerveuses entériques

(d'après HEANUE et PACHNIS, 2007)

1. La voie de signalisation par la protéine RET

La protéine récepteur tyrosine kinase (RET) est un récepteur transmembranaire comportant 1114 acides aminés et appartenant à la super famille des récepteurs tyrosine kinase (SCHUCHARDT, et al., 1995). Elle contient un domaine extracellulaire cadherin-like, une région riche en cystéine et un domaine tyrosine kinase intracellulaire (CECCHERINI, et al., 1993). Chez les souris, la protéine RET intervient dans le développement rénal (SCHUCHARDT, et al., 1994), la spermatogenèse (JAIN, et al., 2004) et le développement des plaques de Peyer (VEIGA-FERNANDES, et al., 2007). Parmi les isoformes de la protéine RET formés par épissage alternatif, il existe le RET9 qui est crucial dans le développement des reins et du système nerveux entérique (DE GRAAFF, et al., 2001).

Le *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) est un facteur de survie majeur de nombreux types de cellules nerveuses et il est aussi un ligand de la protéine RET (DURBEC, et al., 1996). Pour activer la protéine RET, le GDNF a besoin d'un corécepteur au glycoposphatidylinositol (GPI) : le GFR α 1. Quatre corécepteurs au GPI sont connus (GFR α 1-4) et 4 ligands de ces corécepteurs ont été mis en évidence (Figure 4) : le GDNF, le neurturin (NTN), le persephin (PSPN) et l'artemin (ARTN).

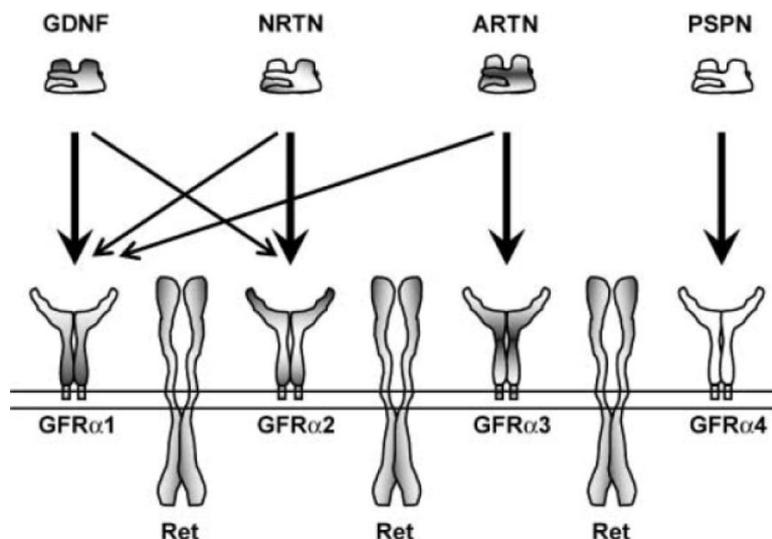


Figure 4 : Les ligands de la famille du GDNF et leurs interactions préférentielles avec leurs récepteurs

(ENOMOTO, 2005)

Des combinaisons spécifiques de ces ligands avec les récepteurs GFR α 1-4 sont nécessaires au développement et à la survie des neurones centraux et périphériques et elles peuvent toutes activer la protéine RET. L'interaction nécessaire au développement des cellules nerveuses du tube digestif est l'interaction entre la protéine RET, le GFR α 1 et le GDNF (Figure 5) : ceci permet la dimérisation et la phosphorylation des tyrosines de la protéine RET, ce qui la rend fonctionnelle (TREANOR, et al., 1996). Des mutations sur un des gènes codant pour une de ces protéines peuvent entraîner une maladie de Hirschsprung.

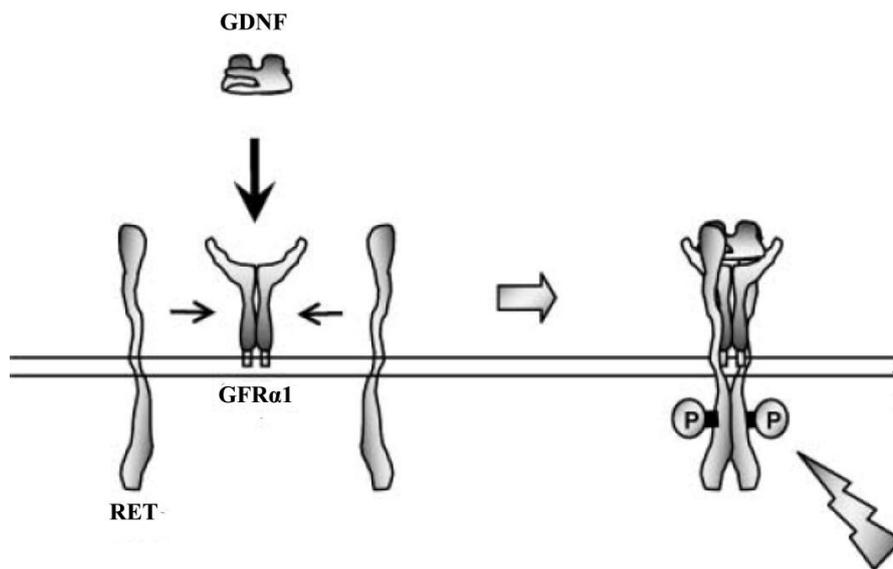


Figure 5 : Activation de la protéine RET par interaction avec le GFR α 1 et le GDNF

(d'après ENOMOTO, 2005)

2. La voie de signalisation par le système EDN3/EDNRB

Les endothélines, des peptides de 21 acides aminés, sont au nombre de 3 : endothéline-1, endothéline-2, endothéline-3. Leur structure comporte deux ponts disulfures entre les acides aminés cystéine 1 et 15 d'une part et 3 et 11 d'autre part (Figure 6).

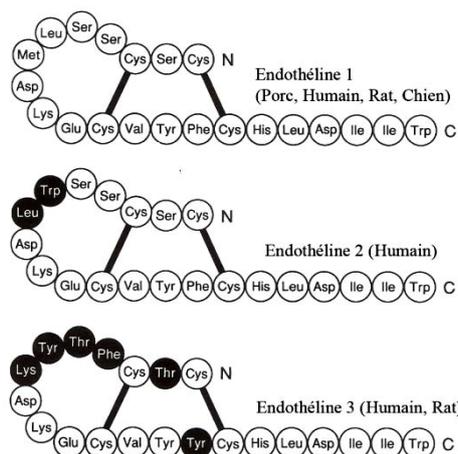


Figure 6 : Structure des endothélines

(d'après SAKURAI, et al., 1992)

Les endothélines sont issues de précurseurs de grande taille nommés préproendothélines qui subissent deux clivages successifs avant de donner l'endothéline de 21 acides aminés : le premier clivage est réalisé par une furine (ou une enzyme à activité similaire) et donne une bigendothéline qui contient 38 à 41 acides aminés. Cette bigendothéline est quant à elle clivée entre les acides aminés 21 et 22 par une enzyme de conversion de l'endothéline (ECE-1 ou ECE-2 ; ECE-1 n'agit que sur l'endothéline-1 et l'endothéline-3) pour donner l'endothéline mature (BAYNASH, et al., 1994; BIDAUD, et al., 1997).

Les endothélines matures se fixent sur des récepteurs aux endothélines : ce sont des protéines possédant 7 hélices transmembranaires couplées à des protéines G. Ils sont au nombre de 2 : les récepteurs aux endothélines de type A et de type B (respectivement EDNRA et EDNRB) (SAKURAI, et al., 1992).

C'est l'endothéline-3 qui nous intéresse ici. Elle intervient dans la mise en place du système nerveux entérique en se fixant sur son récepteur préférentiel, l'EDNRB.

Des hétérozygotes pour les gènes codant pour l'endothéline-3 (EDERY, et al., 1996), son récepteur l'EDNRB (PUFFENBERGER, et al., 1994 b) ou l'ECE-1 (HOFSTRA, et al., 1999) ont été retrouvés parmi les porteurs de la maladie de Hirschsprung ainsi que chez des patients présentant un syndrome de Shah-Waardenburg (associant l'aganglionose à des défauts de pigmentation de la peau et à une surdité). Une étude portant sur la maladie de Hirschsprung dans la population Mennonite, où la fréquence de la maladie de Hirschsprung

est de 1/500 naissances, a permis de montrer une co-transmission de l'allèle muté codant pour l'EDNRB et d'un haplotype spécifique du gène codant pour la protéine RET chez les individus affectés par la maladie (AURICCHIO, et al., 1999). *In vitro*, l'endothéline-3 et le GDNF agissent en synergie pour favoriser la prolifération des cellules entériques dérivées de la crête neurale ainsi que leur migration. Il a aussi été montré que l'endothéline-3 inhibait la réponse au signal chimio-attractif induit par le GDNF. Une autre étude montre que l'endothéline-3 est nécessaire au maintien au stade de cellules souches des cellules entériques dérivées de la crête neurale. Le signal produit par l'endothéline-3 apparaît donc comme un régulateur du développement du système nerveux entérique en modulant l'action du GDNF et de nombreux autres signaux (BARLOW, et al., 2003).

Nous retiendrons essentiellement la voie de signalisation impliquant l'endothéline-3 car c'est elle qui est responsable de la maladie chez le cheval.

E. Les bases génétiques de la maladie de Hirschsprung

1. *La voie de signalisation par la protéine RET*

Le gène *RET* apparaît comme le gène majeur de la maladie de Hirschsprung. Son locus est 10q11.2. Plus de 100 mutations ont été décrites sur ce gène, incluant de larges délétions, des microdélétions, des insertions et des mutations non-sens, faux-sens ainsi que des mutations par épissage (AMIÉL, et al., 2008). Les allèles mutés sont transmis selon un mode autosomal dominant à pénétrance incomplète (LYONNET, et al., 1993).

Malgré la performance des techniques de détection des mutations, on ne retrouve des mutations sur le gène *RET* que dans 40 à 50% des cas familiaux et 10 à 20% des cas sporadiques de la maladie (ATTIE, et al., 1995; PELET, et al., 2005).

Des *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) ont été mis en évidence dans la région du gène *RET* dans des populations atteintes de maladie de Hirschsprung (BORREGO, et al., 1999) ce qui a permis de définir des haplotypes prédisposant à la maladie : des associations de SNP particulières favorisent l'apparition de la maladie sans qu'il y ait pour autant de réelles mutations (BURZYNSKI, et al., 2004). Des exemples de polymorphismes sont répertoriés dans le Tableau II.

Exon	Polymorphisme allélique / génotype	Fréquence (N/%) chez les individus atteints de maladie de Hirschsprung T=70 ; A=140	Fréquence chez les individus sains (groupe témoin) T=40 ; A=80	Significativité (P)
2	135 A	72/51,4	19/23,7	$P = 0.0001$
	135 G/A ou A/A	57/81,4	16/40	$P = 0.0028$
3	375 A	0/0	1/1.25	$P > 0.05$
	375 C/A or A/A	1/0.15	1/2.5	
7	1296 A	48/34.3	32/40	$P > 0.05$
	1296 G/A or A/A	42/60	26/65	
11	2071 A	15/10.7	14/17.5	$P = 0.044$
	2071 G/A or A/A	14/20	14/35	$P = 0.043$
13	2307 G	50/35.7	24/30	$P > 0.05$
	2307 T/G or G/G	42/60	22/55	
14	2508 T	1/0.7	3/3.75	$P > 0.05$
	2508 C/T or T/T	1/0.15	3/7.5	
15	2712 G	16/11.4	17/21.3	$P = 0.02$
	2712 C/G or G/G	15/21.4	16/40	$P = 0.023$

A=nombre total d'allèles ; N=nombre d'individus ; T=nombre total d'individus

Tableau II : Fréquence des différents polymorphismes alléliques du gène RET chez des individus atteints de maladie de Hirschsprung et chez des individus sains

(d'après SMIGIEL, et al., 2006)

Tous les polymorphismes décrits dans le Tableau II, sauf un (celui de l'exon 11), sont des mutations silencieuses : le rôle joué par ces mutations silencieuses dans la maladie de Hirschsprung est encore inconnu (SMIGIEL, et al., 2006).

Un point de recombinaison a aussi été découvert dans l'intron 5 du gène *RET* (AMIÉL, et al., 2008).

Les mutations sur le gène codant pour le GDNF, situé sur le locus p13.1 du chromosome 5, sont rares dans les cas de maladie de Hirschsprung : seulement 6 cas ont été décrits (AMIÉL, et al., 2008). De plus, les mutations sur le gène *GDNF* ne paraissent pas suffisantes pour induire la maladie (BORGHINI, et al., 2002; EKETJALL et IBANEZ, 2002).

2. La voie de signalisation par l'endothéline 3

Cette voie fait intervenir les endothélines et leurs récepteurs ainsi que les molécules permettant la maturation des endothélines.

Le locus du gène responsable de la maladie de Hirschsprung en 13q22 a été proposé pour 3 raisons : un lod-score significatif pour ce locus dans une population de Mennonites

avec de multiples cas de maladie de Hirschsprung (PUFFENBERGER, et al., 1994 a), une délétion au niveau de ce locus chez de nombreux patients atteints (SHANSKE, et al., 2001), une correspondance entre le locus du *piebald-lethal* chez la souris, un modèle d'aganglionose, et le 13q22 chez l'homme (AMIEL, et al., 2008).

Le rôle de la voie de signalisation par l'endothéline dans la maladie de Hirschsprung a été mis en évidence avec la découverte des souris *piebald-lethal* qui possédaient un gène *EDNRB* muté (HOSODA, et al., 1994). Ensuite, une mutation non-sens sur le gène codant pour le récepteur aux endothélines de type B a été mise en évidence dans une famille de Mennonites (mutation W276C) : elle se situe au niveau de l'exon 4 et a pour conséquence le remplacement d'un acide aminé (tryptophane remplacé par cystéine) dans le 5^{ème} domaine transmembranaire de l'*EDNRB* qui, par conséquent, n'est plus fonctionnel. Cette mutation n'est ni nécessaire ni suffisante pour déclencher la maladie et la pénétrance de ce gène est liée au sexe, celle-ci étant plus importante chez les mâles que chez les femelles (PUFFENBERGER, et al., 1994 b).

La même année, en 1994, Baynash et son équipe découvrent une mutation sur le gène *EDN3* chez des souris *lethal spotting*, modèles pour le syndrome de Shah Waardenburg (BAYNASH, et al., 1994). On retrouve des homozygotes mutés pour le gène *EDN3* parmi les malades atteints de ce syndrome (EDERY, et al., 1996).

Les gènes *EDNRB* et *EDN3* ont été étudiés chez de nombreux patients atteints de la forme isolée et syndromique de la maladie de Hirschsprung : les mutations sur le gène *EDN3* sont rares (BIDAUD, et al., 1997) mais, par contre, les mutations sur le gène *EDNRB* sont présentes chez environ 5% des cas malades (AMIEL, et al., 2008).

Par ailleurs, une mutation sur le gène *ECE1*, qui intervient dans la maturation de l'endothéline-3, a été découverte chez un patient atteint de maladie de Hirschsprung mais aussi de malformations crânio-faciales et cardiaques (HOFSTRA, et al., 1999).

3. Autres gènes impliqués dans la maladie de Hirschsprung

a. Le gène Sox10

Un autre modèle murin du syndrome de Shah-Waardenburg existe : le modèle Dom (pour Dominant mégacôlon). Le gène impliqué dans ce modèle est le gène *Sox10*, gène faisant partie du système SRY-like (*sex determining factor-like*) (PINGAULT, et al., 1998). Le locus de ce gène est q13 sur le chromosome 22. Les souris homozygotes mutées meurent au stade

embryonnaire mais les souris hétérozygotes survivent et présentent une aganglionose du côlon (LANE et LIU, 1984). Des mutations de ce gène ont été retrouvées chez des patients atteints de syndrome de Waardenburg type 4 (PINGAULT, et al., 1998), type 2 (BONDURAND, et al., 2007) ou de syndrome Yemenite (BONDURAND, et al., 1999). Certains présentaient des problèmes neurologiques dus à une démyélinisation des systèmes nerveux central et périphérique (TOURAINÉ, et al., 2000). La pénétrance de cet allèle apparaît élevée. Ce gène est un gène majeur dans les cas de maladie de Hirschsprung isolés (AMIÉL, et al., 2008).

b. Les gènes plus rarement impliqués dans la maladie de Hirschsprung

D'autres gènes ont été impliqués très rarement dans des cas de maladie de Hirschsprung. Ce sont les gènes *NTN* (Neurturin), *ZFXH1B* (Zinc Finger Homeo Box 1B), *PHOX2B* (Paired-Like Homeobox 2B) et *TCF4* (Transcription Factor 4). Le Tableau III répertorie tous les gènes impliqués dans la maladie de Hirschsprung.

Gène	Localisation	Mode de transmission	Phénotype des mutants	Fréquence des symptômes de la maladie de Hirschsprung
<i>RET</i>	10q11.2	AD	HSCR	70% chez les mâles et 50% chez les femelles pour les mutations non sens
<i>GDNF</i>	5p13	AD	HSCR	5 cas répertoriés Pénétrance faible
<i>NTN</i>	19p13	AD	HSCR	1 cas répertorié
<i>SOX10</i>	22q13	AD	WS4	Environ 80%
<i>EDNRB</i>	13q22	AR/AD	WS4/HSCR	faible
<i>EDN3</i>	20q13	AR/AD	WS4/HSCR	1 cas répertorié
<i>ECE1</i>	1p36	AD	HSCR, déformations cardiaques et crâniofaciales	1 cas répertorié
<i>ZFXH1B</i> (<i>SIPSI</i>)	2q22	AD	MCA-MR, malformation de la face	60%
<i>PHOX2B</i>	4p12	AD	CCHS	20%
<i>TCF4</i>	18q21	AD	Encéphalopathie épileptique	1 cas

AD : Autosomal Dominant ; AR : Autosomal Récessif

HSCR : Hirschsprung ; WS4 : Shah-Waardenburg de type 4 ; MCA-MR : Anomalies Congénitales Multiples – Retard mental ; CCHS : Syndrome d'Hypoventilation Centrale Congénitale

Tableau III: Gènes impliqués dans la maladie de Hirschsprung

(d'après AMIÉL, et al., 2008)

4. Interactions et transmissions des différents allèles impliqués

Le gène *RET* joue un rôle clé dans la maladie de Hirschsprung et de nombreux autres gènes sont nécessaires pour en moduler l'expression clinique. La pénétrance de l'allèle *RET* muté est incomplète et dépendante du sexe. La corrélation génotype/phénotype est faible. La maladie de Hirschsprung est génétiquement très hétérogène et est due à des mutations variées tant en forme qu'en localisation : une mutation sur un des gènes impliqués (*RET*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*) est suffisante pour induire le phénotype malade (AMIÉL, et al., 2008).

Une étude de Bolk et al. (2000) sur 12 familles comportant des cas de maladie de Hirschsprung a montré qu'on peut regrouper les familles en 2 groupes : dans le premier groupe, les individus atteints de maladie de Hirschsprung avaient tous des mutations importantes au niveau du gène *RET* et dans le deuxième groupe, les mutations du gène *RET* chez les individus malades étaient moins importantes et n'entraînaient pas une perte de fonction de la protéine RET. Dans les familles du 2^{ème} groupe, un linkage entre le locus du gène *RET* et le locus 9q31 a été mis en évidence : le gène situé en 9q31 pourrait donc être un gène affectant l'expression du gène *RET*. Les mutations relevées dans chacune de ces familles étaient très conservées. Une autre analyse de Gabriel et al. (2002) a montré que le fait d'être hétérozygote sur 3 *loci* (10q11 (*RET*), 3p21 et 19q12 (modificateurs de l'expression du gène *RET*)) augmente le risque d'être porteur de la maladie.

Dans une famille, si un enfant est malade, le risque d'apparition de la maladie dans la fratrie est plus élevé que dans la totalité de la population sans suivre les lois de Mendel pour autant : ce risque varie de 1 à 33% selon les familles (AMIÉL, et al., 2008).

5. Les bases génétiques du syndrome de Shah-Waardenburg

Actuellement, 3 gènes ont été impliqués dans le syndrome de Shah-Waardenburg : les gènes *EDNRB*, *EDN3* et *SOX10* (VERHEIJ, et al., 2006).

Des mutations homozygotes des gènes *EDNRB* et *EDN3* ont été mises en évidence dans des cas de syndrome de Shah-Waardenburg. Des mutations hétérozygotes sur ces mêmes gènes ont été retrouvées dans des cas de maladie de Hirschsprung isolée ou des cas d'anomalies pigmentaires, associées ou non à une surdité (TUYSUZ, et al., 2009). Pour ces deux gènes, la transmission du syndrome de Shah-Waardenburg se fait sur un mode autosomal récessif.

La transmission de ce syndrome est par contre autosomale dominante quand le gène *SOX10* est touché : les mutations touchant ce gène sont en majorité ponctuelles troncantes ce qui modifie en totalité ou en partie le domaine d'activation de la protéine SOX10. Dans la plupart des cas, les malades présentent un syndrome de Shah-Waardenburg classique (identique aux formes récessives), mais dans quelques cas, on note une atteinte neurologique en plus : ce syndrome est nommé PCWH (*peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, WS, and Hirschsprung disease*) (BONDURAND, et al., 2007).

Les différentes mutations mises en évidence chez des individus atteints du syndrome de Shah-Waardenburg sont répertoriées dans le Tableau IV.

Gène impliqué	Changement de codon	Changement d'acide aminé	Numéro de codon	Référence
EDNRB	GGA→AGA	Gly→Arg	186	(PAYNE, et al., 2001)
	AGT→AAT	Ser→Asn	196	(SANGKHATHAT, et al., 2005)
	CGA→TGA	Arg→STOP	253	(SYRRIS, et al., 1999)
	TTT→CTT	Phe→Leu	292	(PINGAULT, et al., 2002)
EDN3	TAT→TGT	Tyr→Cys	127	(PINGAULT, et al., 2002)
	TGC→TTC	Cys→Phe	159	(HOFSTRA, et al., 1996)
	TGC→TGA	Cys→STOP	169	(PINGAULT, et al., 2001)
	GGCCGAG^GGGgcCCCTGAGCAC t		87 (^)	(EDERY, et al., 1996)
SOX10	TAC→TAA	Tyr→STOP	83	(PINGAULT, et al., 1998)
	GAG→TAG	Glu→STOP	189	(PINGAULT, et al., 1998)
	TAC→TAG	Tyr→STOP	207	(SOUTHARD-SMITH, et al., 1999)
	CAG→TAG	Gln→STOP	234	(PINGAULT, et al., 2002)
	CAG→TAG	Gln→STOP	250	(INOUE, et al., 2002)
	TCG→TAG	Ser→STOP	251	(TOURAINÉ, et al., 2000)
	TAC→TAA	Tyr→STOP	313	(TOURAINÉ, et al., 2000)
	TCA→TGA	Ser→STOP	346	(VERHEIJ, et al., 2006)
	CAG→TAG	Gln→STOP	372	(PINGAULT, et al., 2002)
	CAG→TAG	Gln→STOP	377	(SOUTHARD-SMITH, et al., 1999)
	TAA→AAA	STOP→Lys	467	(SHAM, et al., 2001)
	GCAAG^GTCAAgaAAGGAGCAGC		54 (^)	(INOUE, et al., 2002)
	GGTCAAG^AAGgAGCAGCAGGA		56 (^)	(SHAM, et al., 2001)
	GGCCC^ATGAAcgCCTTCATGGT		108 (^)	(PINGAULT, et al., 2002)
	AAGCGG^GACGgGCGCTCCATG		259 (^)	(PINGAULT, et al., 2002)
	GTGAAG^ACAGagACCGCGGGGC		358 (^)	(PINGAULT, et al., 1998)
	AGCGG^CTCCGgctccgTATGCAGC		160 (^)	(PINGAULT, et al., 1998)
	GATCG^GGCCTgcGAGCCAGCCC ct		41 (^)	(PINGAULT, et al., 2002)

Les lettres en minuscule sont les bases délétées, celles en minuscules blanches sur fond noir sont les bases insérées.

Tableau IV : Les différentes mutations retrouvées chez l'homme atteint de syndrome de Shah-Waardenburg

Ces allèles mutés ont tous une pénétrance incomplète ce qui implique que l'on ne peut prévoir de manière sûre le phénotype en fonction du génotype. Il existe une grande variabilité familiale ce qui laisse à penser que des gènes modificateurs entrent en jeu (TOURAINÉ, 2000).

Certains cas de syndrome de Shah-Waardenburg ne sont pas pour autant expliqués au niveau moléculaire. Les hypothèses formulées se basent sur l'intervention ou sur l'existence de mutations encore non détectées sur les gènes connus (BONDURAND, et al., 2007).

F. Les modèles murins de la maladie de Hirschsprung

La maladie de Hirschsprung a fait l'objet de nombreuses recherches depuis sa découverte en 1888. Les avancées sur cette maladie et sur le syndrome de Shah-Waardenburg (affection qui se rapproche le plus du syndrome létal du poulain blanc) sont en grande partie dues à la découverte de modèles murins qui ont pu être étudiés en grand nombre. Il existe 4 modèles de syndrome de Shah-Waardenburg qui sont décrits ci-après.

1. *Le modèle piebald lethal chez la souris*

Deux modèles de souris *piebald* (avec des taches) ont été décrits.

Un premier modèle a été retrouvé dans des élevages de souris et dans des populations de souris de laboratoire du monde entier avec des animaux au pelage bicolore aux taches bien distinctes. Ces souris ont aussi été isolées de populations sauvages en Turquie, en Allemagne et aux Etats-Unis ce qui laisse à penser que l'allèle mis en jeu est présent dans les populations de souris sauvages. Cet allèle a été nommé *piebald spotting* (*s*). Les homozygotes mutés (*s/s*) pour cet allèle portent des taches blanches bien délimitées ; le blanc est plus présent sur la partie ventrale du corps, sur le bout de la queue, sur les pattes, entre les yeux et sur le bout du museau. Des taches blanches peuvent apparaître au niveau des épaules et au niveau lombaire formant un collier ou une ceinture. Les régions les moins souvent dépigmentées sont les yeux, les oreilles, les joues et les hanches. Il existe une grande variation dans la proportion de blanc chez les homozygotes *s/s* : certains individus sont quasiment entièrement blancs et d'autres n'ont que quelques petites taches blanches (SILVERS, 1979). Une étude de Deol (1971) a aussi montré que les souris avec des taches blanches étendues avaient, au niveau des yeux, une choroïde tachetée, une glande de Harder non pigmentée ou très peu et, au niveau des oreilles, une oreille interne moyennement pigmentée. Par contre, la rétine et les faces internes et externes de l'iris sont correctement pigmentées. Les souris hétérozygotes *s/+* sont pigmentées normalement (comme le phénotype sauvage) mais portent de petites marques blanches au bout des doigts et au bout de la queue. L'allèle *s* apparaît donc comme récessif par rapport à l'allèle sauvage. Bielschowsky et Schofield (1962) ont remarqué que 10% de leurs souris *piebald* étaient atteintes de mégacôlon.

Depuis, cette affection a été reliée au deuxième modèle de souris *piebald* décrit, pour la première fois, en 1957 par Derrick et St George-Grambauer puis étudié plus précisément par Lane à partir de 1959. Dans ce deuxième modèle, les souris sont blanches aux yeux noirs avec parfois de petites taches pigmentées au niveau de la tête et de la croupe (voir la

comparaison des deux modèles sur la Figure 7). Ces souris sont aussi atteintes de mégacôlon entraînant leur mort le plus souvent dans le mois suivant leur naissance. L'intervention d'un allèle létal a été suspectée et elles ont été baptisées souris *piebald-lethal* (s^l). Lane (1966) a prouvé que les allèles s et s^l étaient sur le même *locus*. L'allèle s^l est récessif par rapport à l'allèle sauvage (BIELSCHOWSKY, et al., 1962) et à pénétrance incomplète par rapport à l'allèle s : sur 12 souris s/s^l , seulement 3 étaient atteintes de mégacôlon (SILVERS, 1979). Le mégacôlon peut être facilement décelé à l'autopsie, soit chez des nouveau-nés, soit chez des souris adultes. On retrouve un côlon distendu depuis le caecum et sur une partie plus ou moins longue en allant vers le rectum et contenant des matières fécales dures. Chez les nouveau-nés, les matières fécales sont gélatineuses et on ne retrouve pas de crottes en formation dans le côlon (LANE, 1966).



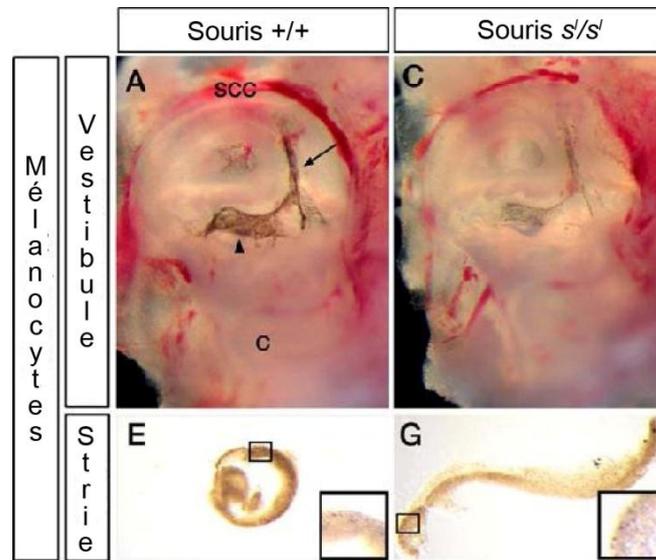
Figure 7 : Souris *piebald spotting* (s/s) en haut et *piebald lethal* (s^l/s^l) en bas

(d'après Mouse Genome Database, <http://www.informatics.jax.org>, 2006)

Des coupes de côlon d'individus homozygotes (s^l/s^l et $+/+$) et hétérozygotes ($s^l/+$) réalisées après fixation ont révélé que chez les animaux homozygotes sauvages ou hétérozygotes, le nombre de cellules ganglionnaires était normal et constant sur toute la longueur du côlon alors que chez les animaux homozygotes mutés, le nombre de cellules ganglionnaires était normal dans la partie proximale du côlon et allait en diminuant dans la partie distale (LANE, 1966). Le mégacôlon chez les animaux s^l/s^l est donc dû à une absence de ganglion (plexus d'Auerbach) dans l'intestin distal.

Cette absence de ganglion et les défauts de pigmentation de la robe font penser qu'il existe un défaut de développement de la crête neurale : défaut dans la différenciation, dans la prolifération ou dans la migration cellulaire. Les souris s^l/s^l présentent aussi des anomalies au niveau de l'oreille interne visibles sur la Figure 8 : l'épithélium neural est toujours anormal ce

qui pourrait être une conséquence secondaire à un mauvais développement de la crête neurale (DEOL, 1967).



Les mélanocytes au sein du conduit endolympatique (A et C), présents chez les souris +/+ (voir →), sont en nombre réduit chez les souris s'/s' . Il en est de même pour les mélanocytes présents au niveau de l'utricule (voir ►). Au niveau de la strie vasculaire (E et G), les mélanocytes sont aussi en nombre restreint chez les souris mutées.

SCC : Canaux Semi Circulaires ; C : Cochlée

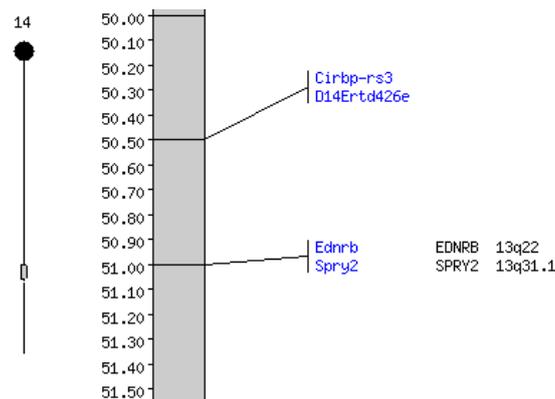
Figure 8 : Oreille interne de souris +/+ et de souris s'/s' : observation des mélanocytes dans le vestibule et la strie vasculaire

(d'après STANCHINA, et al., 2006)

Une délétion complète et ciblée du gène du récepteur aux endothélines de type B de la souris a été réalisée par Hosoda et son équipe (1994). Les souris $ednrb/+$ ($ednrb$ signifie que l'allèle a été délété) ont un phénotype normal. Les souris homozygotes $ednrb/ednrb$ ont un pelage presque totalement blanc (> 90% de blanc) avec quelques taches colorées bien délimitées sur la tête et sur les hanches et ont des yeux toujours noirs. Ces souris sont en bonne santé après leur naissance mais commencent à être malades et à maigrir entre 2 et 4 semaines de vie. Leur gain de poids est inférieur à celui des souris +/+ et $ednrb/+$ et elles meurent prématurément (en moyenne au bout de 25 jours). Des autopsies réalisées sur les souris homozygotes $ednrb/ednrb$, un ou deux jours avant leur mort présumée, montrent exactement les mêmes signes que chez les souris s'/s' . Les histologies de coupes d'intestin réalisées sont aussi semblables à celles effectuées sur les souris s'/s' . L'examen microscopique de coupes de peau montre qu'il n'y a pas de mélanocytes ni de mélanine dans les zones de

pelage blanc. Par contre, dans les régions pigmentées, le nombre de mélanocytes apparaît normal. Des coupes de globes oculaires de souris *ednrb/ednrb* montrent un manque de pigment sur la choroïde. La fonction auditive et l'oreille interne n'ont pas été étudiées chez ces souris (HOSODA, et al., 1994). Des examens semblables ont été réalisés chez d'autres souris mutées, appelées souris WS4 et présentant les mêmes signes que les souris *ednrb/ednrb* ; ils ont révélé une surdité et un manque de cellules intermédiaires au niveau de la strie vasculaire de la cochlée (MATSUSHIMA, et al., 2002). Toutes ces observations vont dans le sens d'une suspicion d'une anomalie de développement de la crête neurale (HOSODA, et al., 1994; MATSUSHIMA, et al., 2002).

Les souris *ednrb/ednrb* ont un phénotype quasiment identique à celui des souris *s^l/s^l* qui sont naturellement mutées. Le *locus* du gène *piebald* (comportant 3 allèles : *s^l*, *s* et +) a été cartographié sur la moitié distale du chromosome 14 de la souris, à 51 cM du centromère (METALLINOS, et al., 1994), analogue du chromosome 13 humain où est cartographié le gène *EDNRB* (ARAI, et al., 1993; ROBERTSON, et al., 1997) (Figure 9).



A gauche, gènes de la souris ; à droite, gènes humains

Figure 9 : Localisation du gène *EDNRB* murin et analogie avec le gène humain

(d'après Mouse Genome Database, <http://www.informatics.jax.org>, 2006)

L'étude de Hosoda et al. (1994) a confirmé que le gène *piebald* et le gène *EDNRB* sont confondus et que l'allèle *s^l* correspond à l'allèle délété *ednrb* : il n'y a aucune expression du gène *EDNRB* chez les souris mutées. Pour les souris *s/s*, le niveau d'expression du gène *EDNRB* est inférieur à celui des souris « sauvages » (27% d'expression environ). L'étude de l'allèle *s* a révélé la présence d'un élément ressemblant à un rétrotransposon inséré dans l'intron 1 et contenant des séquences régulières de polyadénylations et un site d'épissage.

Cette insertion entraîne un arrêt prématuré de la transcription du gène *EDNRB* ou un épissage anormal de l'ARNm dans presque 75% des cas et, par conséquent, aboutit à la production d'un ARNm anormal. On retrouve un ARNm normal dans approximativement 25% des cas ce qui entraîne un taux de production de récepteur aux endothélines de type B de seulement 27% par rapport aux individus portant l'allèle sauvage (YAMADA, et al., 2006). L'expression diminuée mais non absente du gène *EDNRB* chez les souris *s/s* est compatible avec leur phénotype (HOSODA, et al., 1994).

Chez les souris WS4, l'analyse de l'ADN montre une délétion de 318 paires de bases au niveau du gène *EDNRB* : cette délétion est au niveau des exons 2 et 3 (codant pour des domaines transmembranaires) de la protéine qui n'est par conséquent plus fonctionnelle (MATSUSHIMA, et al., 2002). Il existe 39 mutations différentes du gène *EDNRB* répertoriées (Mouse Genome Database, 2006). Cette protéine n'intervient pas dans la voie de différenciation cellulaire ni dans la migration primaire mais intervient dans la deuxième partie de la migration des cellules issues de la crête neurale. Elle n'est pas non plus nécessaire à la survie de ces cellules lors de la migration (LEE, et al., 2003).

La proportion de blanc dans le pelage dépend de l'origine génétique des souris (certains croisements donnent des proportions de blanc plus importantes que d'autres) ce qui suggère l'intervention d'autres *loci* qui interagiraient avec le gène *EDNRB* (HOSODA, et al., 1994). Ceci a été prouvé par l'étude de Pavan et ses collaborateurs (1995) qui ont identifié six gènes modificateurs de l'étendue du blanc dans la robe des souris *piebald*. Cette proportion dépend aussi des allèles du gène *EDNRB* chez chaque souris : on note une augmentation de la proportion de blanc selon les allèles (*s/s*, *s^l/s* et *s^l/s^l*). Ceci est intéressant car on remarque que ce caractère est dépendant de l'importance de l'expression du gène *EDNRB* alors que le mégacôlon lui n'apparaît que lorsque le gène *EDNRB* ne s'exprime pas du tout (HOSODA, et al., 1994). C'est la mauvaise interaction entre le récepteur aux endothélines de type B et l'endothéline 3 qui entraîne le mégacôlon, les défauts de pigmentation et les défauts de développement de l'oreille interne (MATSUSHIMA, et al., 2002).

2. Le modèle lethal spotting chez la souris

Un autre modèle de la maladie a été mis en évidence chez la souris : le modèle *lethal spotting* (*ls*). Les souris hétérozygotes ont un pelage totalement pigmenté alors que les souris homozygotes *ls/ls* ont des taches blanches dans leur pelage, en plus ou moins grande quantité, surtout au niveau du ventre. Ces souris ressemblent beaucoup aux souris *s/s* mais ont les

oreilles et la queue moins colorées (LANE, 1966) (Figure 10). Cet allèle *ls* est donc récessif par rapport à l'allèle sauvage.

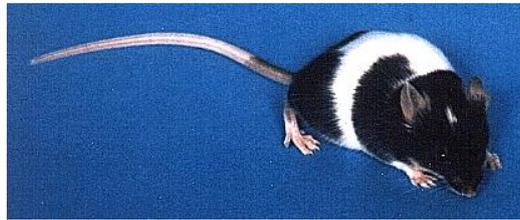
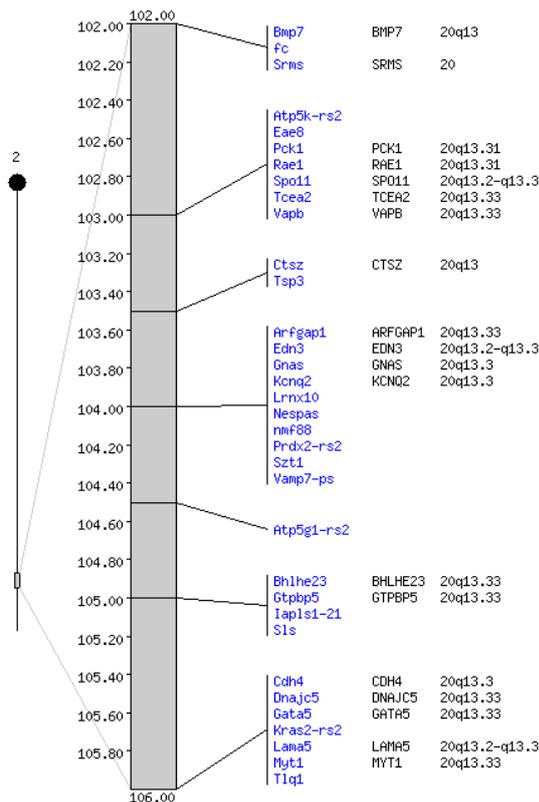


Figure 10: Souris *lethal spotting*

(d'après Mouse Genome Database, <http://www.informatics.jax.org>, 2006)

Ces souris meurent aussi de mégacôlon congénital dans leurs 2 à 3 premières semaines de vie. Les coupes d'intestin réalisées sont semblables à celles obtenues chez les souris s^l/s^l (LANE, 1966). Le phénotype est quasiment identique mais le génotype ne l'est pas. Une expérience réalisée par Baynash et ses collaborateurs (1994) a révélé que des souris ayant subi une mutation ciblée du gène *EDN3* présentaient exactement le même phénotype récessif que les individus *lethal spotting*. Une autre expérience consistant à croiser les deux lignées (*lethal spotting* et *EDN3* muté) a montré qu'il n'y a pas de complémentation entre les lignées : les animaux ont le même phénotype. Comme c'est un allèle récessif par rapport à l'allèle sauvage, on peut en déduire que les souris *lethal spotting* sont mutées sur le gène *EDN3* (BAYNASH, et al., 1994). Ce gène se situe sur le chromosome 2 à 104 cM du centromère chez la souris. Une partie de ce chromosome est analogue avec le chromosome 20 humain (Figure 11).



A gauche, gènes de la souris ; à droite, gènes humains

Figure 11 : Localisation du gène *EDN3* murin et analogie avec le gène humain

(d'après Mouse Genome Database, <http://www.informatics.jax.org>, 2006)

Pour le gène *EDN3*, il existe 3 mutations différentes répertoriées (BAYNASH, et al., 1994; Mouse Genome Database, 2006; MATERA, et al., 2007). La mutation spontanée retrouvée chez la souris *lethal spotting* est une substitution C→T au niveau de la 409^{ème} pb : le 137^{ème} acide aminé, qui est normalement une Arginine, devient un Tryptophane. Cette mutation empêche la protéolyse de la big endothéline-3 par l'ECE-1 : l'endothéline-3 mature n'est donc jamais formée (BAYNASH, et al., 1994). Pour les autres mutations, l'une est la délétion totale du gène et l'autre a été créée par un agent mutagène (MATERA, et al., 2007).

Le mécanisme cellulaire intervenant chez les souris *ls/ls* a été éclairci par les expériences de Kapur et ses collaborateurs (1992) mettant en jeu un transgène, qui, d'après plusieurs observations, s'exprimerait dans les neuroblastes du tube digestif issus de la crête neurale. L'expression de ce transgène, chez les souris +/+ se fait dans l'intestin proximal à 9,5 jours de vie embryonnaire et se poursuit distalement jusqu'au 13,5^{ème} jour de vie embryonnaire où la totalité de l'intestin est colonisée. L'expression du transgène est la même

chez les souris *ls/ls*, *ls/+* et *+/+* jusqu'au 12,5^{ème} jour. Ensuite, la progression crânio-caudale des cellules exprimant le transgène continue au niveau du côlon proximal chez les souris *+/+* et *ls/+*. Par contre, chez les souris *ls/ls*, cette migration s'arrête brutalement au niveau de la valvule iléo-caecale. La colonisation du côlon proximal et moyen se fait ultérieurement chez ces souris mais de manière irrégulière et en moindre quantité. Le côlon distal n'est jamais colonisé chez les souris homozygotes mutées (KAPUR, et al., 1992).

Des expériences ayant pour but de montrer la capacité des cellules entériques issues de la crête neurale à coloniser diverses sortes d'intestins distaux ont été réalisées *in vitro*. Les cellules issues de la crête neurale ont été prélevées sur des intestins d'embryons de souris de 11,5 jours. Ces expériences ont révélé que les cellules migraient et donnaient des cellules nerveuses dans des côlons entre 14,5 et 16,5 jours de vie embryonnaire (côlon embryonnaire sans cellules nerveuses et avec les couches de muscles externes différenciées) mais que la migration était plus importante dans des côlons plus jeunes. L'âge du côlon influe sur la distance de migration mais pas sur la prolifération et la différenciation cellulaire. La migration dans des côlons entre 14,5 et 16,5 jours et contenant déjà des cellules nerveuses est soit nulle soit fortement réduite. Dans des côlons de 11,5 jours prélevés sur des souris dont le gène *EDN3* a été délété, la migration se fait sur une plus courte distance que sur un côlon provenant d'un animal *+/+*. L'âge et l'absence d'expression de l'endothéline-3 réduisent la migration des cellules issues de la crête neurale dans le côlon, la présence de cellules nerveuses, elle, la stoppe complètement (HOTTA, et al., 2009).

Les deux modèles présentés précédemment ont beaucoup de points communs. La bonne migration des cellules entériques issues de la crête neurale repose sur la voie de signalisation par l'endothéline-3 qui nécessite une endothéline-3 fonctionnelle et un récepteur aux endothélines de type B pouvant la fixer. Ces deux modèles ont permis de faire avancer les connaissances sur la maladie de Hirschsprung et sur le syndrome de Shah-Waardenburg.

3. *Le modèle dom chez la souris*

Ce modèle a été découvert plus récemment, en 1984, aux Etats-Unis. Les souris de ce modèle ont une tache blanche sur le ventre, plus ou moins envahissante, les pattes blanches et la queue blanche (Figure 12). Elles développent un mégacôlon dans les 10 jours suivant leur naissance : le côlon est distendu et rempli de matières fécales impactées. Les souris sont maigres avec un ventre distendu. En effectuant des croisements, cet allèle est apparu comme dominant : il a donc été nommé dominant mégacôlon (*Dom*). Les souris présentant ce

phénotype ont le génotype suivant : *Dom/+*. Les souris *Dom/Dom* meurent avant le 13^{ème} jour de vie embryonnaire (LANE et LIU, 1984).

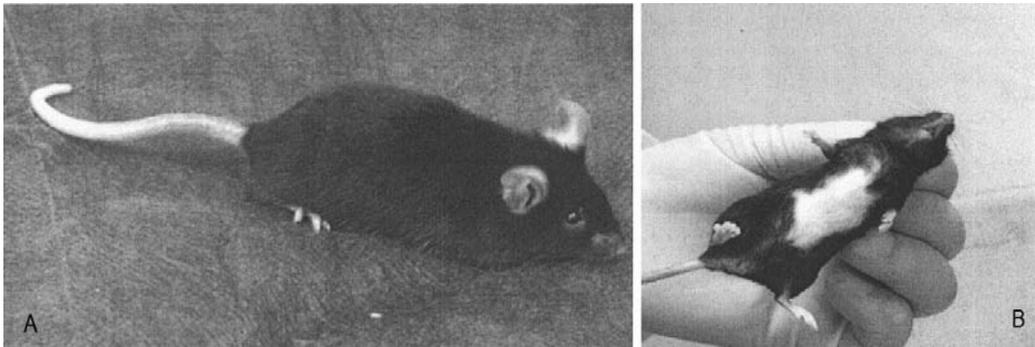


Figure 12 : Face dorsale (A) et face ventrale (B) d'une souris *Dom/+*

(d'après BRIZZOLARA, et al., 2004)

La plupart des souris meurent de mégacôlon mais la proportion de souris atteintes dépend de leur souche génétique (LANE et LIU, 1984). La pénétrance de ce phénotype est variable chez les souris hétérozygotes et certaines ne sont pas atteintes (BRIZZOLARA, et al., 2004). La variabilité d'expression est mise en évidence par la quantité de blanc variable dans la robe ainsi que par la densité de cellules ganglionnaires dans l'intestin distal (KAPUR, et al., 1996) : les cellules ganglionnaires sont en nombre normal dans l'intestin proximal et deviennent de plus en plus rares dans l'intestin distal comme pour les souris *spotting lethal* et *piebald lethal*. Par contre, la différence avec ces modèles est que les souris sont plus ou moins atteintes ce qui fait qu'elles présentent des signes cliniques plus ou moins marqués. Le gène responsable a été localisé au niveau de la partie sub-terminale du chromosome 15 de la souris (PULITI, et al., 1995), à 46,6 cM du centromère. Plus tard, le gène mis en cause a été identifié : les souris *Dom* doivent leur phénotype à une mutation du gène *Sox10* appartenant à la famille des gènes *Sox* (*SRY-related HMG-box*). Cette famille de gène est caractérisée par la présence, dans chacune des protéines codées, d'un domaine de fixation à l'ADN comportant des similarités avec le domaine HMG (*high-mobility group*) du facteur de détermination du sexe (SRY) (KUHLEBRODT, et al., 1998). Le gène *Sox10*, chez la souris, code pour une protéine de 466 acides aminés ayant 98% d'homologie avec la protéine humaine (composée du même nombre d'acides aminés) (PUSCH, et al., 1998). Il existe 9 mutations différentes pour ce gène : une est spontanée et correspond à l'allèle *Sox10^{Dom}*, les 8 autres ont été créées *in vitro* dans le but de créer d'autres modèles.

L'allèle muté spontanément contient en fait deux mutations ponctuelles (Figure 13) :

- premièrement, une transversion A→T au niveau de la 32^{ème} pb de la séquence codante ce qui entraîne la substitution d'un glutamate par une valine dans la séquence d'acides aminés.
- deuxièmement, une insertion d'une guanine après la 579^{ème} pb ce qui décale le cadre de lecture : les 193 premiers acides aminés contenant le domaine HMG sont intacts mais les 273 acides aminés restants de la protéine Sox10 normale sont remplacés par une série de 99 acides aminés différents (HERBARTH, et al., 1998).

C57Bl6/J Dom	MAEEQDLSEV ELSFVGSEEP RCLSPGSAPS LGPDGGGGGS GLRASPGPGE	50
	MAEEQDLSEV VLSFVGSEEP RCLSPGSAPS LGPDGGGGGS GLRASPGPGE	
C57Bl6/J Dom	LGKVKKEQQD GEADDDKFPV CIREAVSQVL SGYDWTLVPM PVRVNGASKS	100
	LGKVKKEQQD GEADDDKFPV CIREAVSQVL SGYDWTLVPM PVRVNGASKS	
C57Bl6/J Dom	KFHVKRPMNA FMVWAQAARR KLADQYPHLH NAELSKTLGK LWRLLNESDK	150
	KFHVKRPMNA FMVWAQAARR KLADQYPHLH NAELSKTLGK LWRLLNESDK	
C57Bl6/J Dom	RPFIEEAERL RMQHKKDHPD YKYQPRRRKN GKAAQGEAEC PGGEAEQGGGA	200
	RPFIEEAERL RMQHKKDHPD YKYQPRRRKN GKAAQGEAEC PGGGSRARRG	
C57Bl6/J Dom	AAIQAHYKSA HLDHRHPEEG SPMSDGNPEH PSQSHGPPT PPTTFKTELQ	250
	CCYSGSLQEC PPGPPAPRRR LPHVRWEPRA PLRPEPWFPN PSNHPKDRAA	
C57Bl6/J Dom	SGKADPKRDG RSLGEGGKPH IDFGNVDIGE ISHEVMSNME TFDVTELDQY	300
	VRQGRPQKGW ALLGGGREAP HRLRQRGHRG DQPRGNVQHG NL	
C57Bl6/J Dom	LPPNGHPGHV GSYSAAGYGL GSALAVASGH SAWISKPPGV ALPTVSPPGV	350
C57Bl6/J Dom	DAKAQVKTET TGPQGPPhYT DQPSTSQIAY TSLSLPHYGS APPSISRPF	400
C57Bl6/J Dom	DYSDHQPSGP YYGHAGQASG LYSAFSYMGP SQRPLYTAIS DPSPSGPQSH	450
C57Bl6/J Dom	SPTHWEQPVY TTLSRP	

Les acides aminés différents dans la séquence Dom sont en gras, le domaine HMG est encadré.

Figure 13 : Séquences d'acides aminés codées par le gène Sox10 non muté (C57BL/6J) et muté (Dom)

(d'après HERBARTH, et al., 1998)

Les gènes de la famille *Sox*, extrêmement conservés au cours de l'évolution, s'expriment dans les tissus embryonnaires et sont très probablement impliqués dans la régulation d'étapes précoces du développement et dans la détermination du devenir cellulaire. Le facteur de transcription *Sox10* est un facteur de développement de la crête neurale essentiel chez la souris (BRIZZOLARA, et al., 2004). Il agit très précocement sur la crête neurale lorsque les cellules ne sont pas encore entrées dans une voie de différenciation (KAPUR, 1999). Une inactivation du gène *Sox10* entraîne une diminution du nombre de neurones

(SOUTHARD-SMITH, et al., 1998) et de cellules gliales (KUHLBRODT, et al., 1998) dans le système nerveux périphérique, notamment au niveau entérique, et entraîne également des défauts de pigmentation liés à la perte de certaines populations de mélanocytes (HERBARTH, et al., 1998). Des études ont montré que, chez des animaux hétérozygotes *Dom/+*, les cellules dérivées de la crête neurale crâniale sont capables, au cours du développement embryonnaire précoce, de coloniser le tube digestif proximal puis de s'y différencier. Leur capacité de survie est inchangée par rapport aux souris non mutées. Par contre, contrairement aux cellules *+/+*, les cellules mutées perdent plus rapidement leur totipotence et prennent des caractères de cellules précurseurs de cellules nerveuses. Il en résulte une diminution du *pool* de cellules souches issues de la crête neurale capables de coloniser l'intestin : cette entrée dans une voie de différenciation trop précoce (due à l'absence d'expression du gène *Sox10*) entraîne un arrêt de la migration de ces cellules et donc l'intestin distal ne peut être colonisé. On a par conséquent une hypoganglionose ou une aganglionose du côlon (PARATORE, et al., 2002). Des expériences réalisées chez des souris homozygotes mutées *Dom/Dom* qui meurent pendant la vie embryonnaire ont révélé que des cellules issues de la crête neurale prélevées chez des souris non mutées sont capables de coloniser un intestin prélevé chez une souris homozygote mutée : le problème de colonisation chez les souris mutées n'est donc certainement pas lié à l'intestin en lui-même. Par contre, des cellules issues de la crête neurale prélevées sur des souris homozygotes mutées sont incapables de coloniser un intestin, qu'il provienne de souris mutées ou non. Il s'agit donc bien d'un problème au niveau des cellules de la crête neurale. De plus, on note une apoptose importante au niveau des sites de développement précoces des cellules de la crête neurale, avant même qu'elles aient commencé à coloniser l'intestin : cette mort cellulaire prématurée intervient aussi dans le défaut de migration cellulaire (KAPUR, 1999).

Les souris *Dom* sont donc un modèle d'aganglionose du côlon souvent associée à d'autres défauts de développement (notamment le pelage). Ce modèle se rapproche le plus de ce que l'on trouve en espèce humaine du fait de la pénétrance incomplète du gène et, par conséquent, des signes cliniques variables obtenus chez les souris hétérozygotes (BRIZZOLARA, et al., 2004).

4. *Le modèle spotting lethal chez le rat*

Un autre modèle murin de syndrome de Shah-Waardenburg est l'aganglionose congénitale du rat, découverte en 1979, et le gène mis en cause est nommé *spotting lethal* (*sl*). Les rats homozygotes *sl/sl* (ou rats *spotting lethal*) ont un pelage presque totalement blanc

(sauf quelques marques colorées sur la tête), présentent un mégacôlon et meurent de malnutrition (et non de septicémie) avant leur premier mois de vie (IKADAI, et al., 1979; DEMBOWSKI, et al., 2000) (Figure 14). Ce phénotype apparaît comme étant récessif et hérité du phénotype sauvage : il a été mis en évidence dans de multiples générations F2 issues de l'accouplement de deux rats au phénotype « sauvage » (IKADAI, et al., 1979). Les rats homozygotes sauvages ou hétérozygotes ont la tête, le dos et la queue pigmentés et ne semblent pas malades.



A. On note le pelage quasiment blanc du rat muté contrairement au sauvage.

B. L'intestin du rat muté présente une dilatation de la partie distale de l'intestin grêle et un côlon vide, la flèche montre la zone de transition entre les parties innervées et non innervées du tube digestif. L'intestin du rat sauvage ne présente pas de dilatation et on note des crottes en formation dans le côlon.

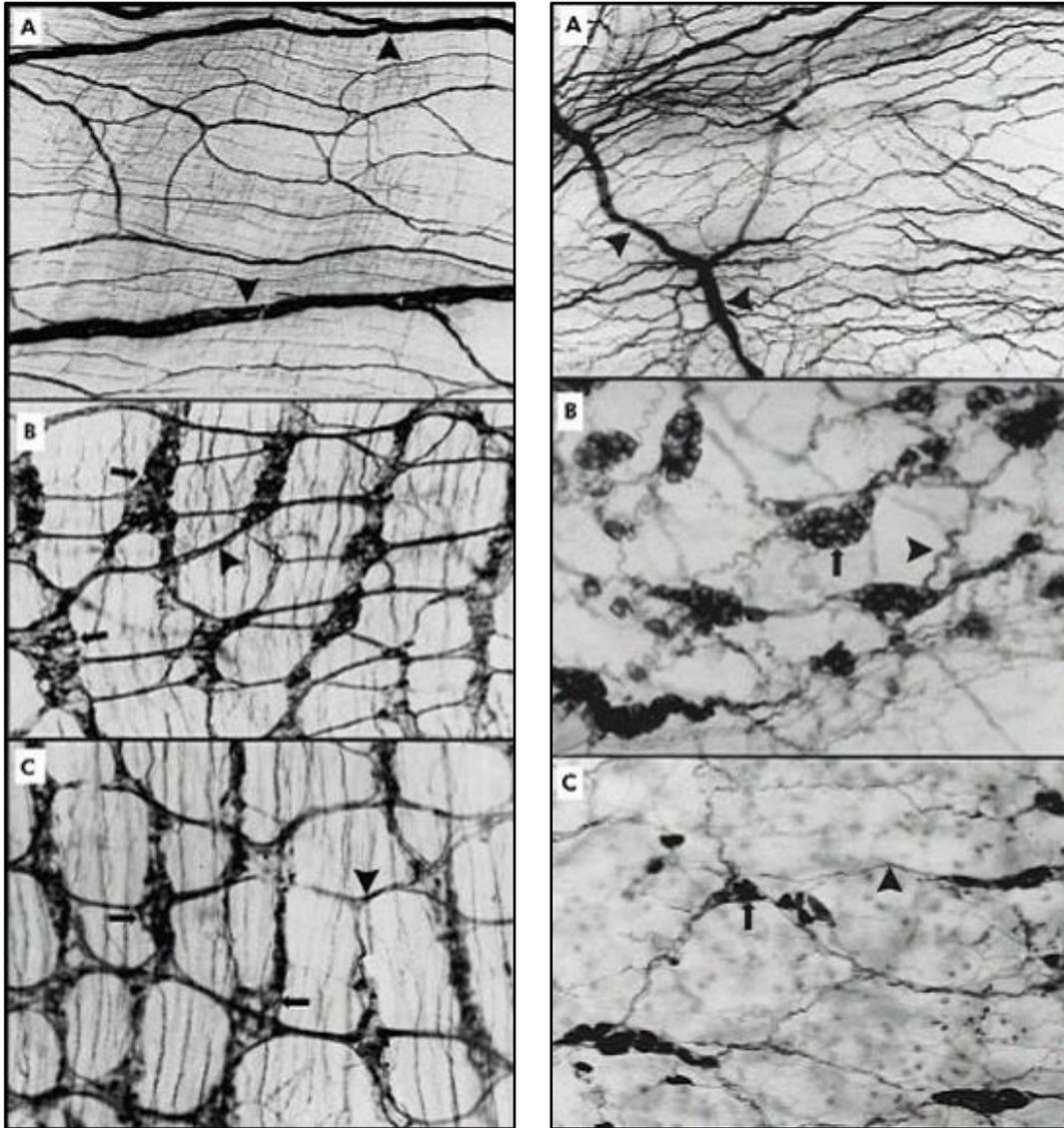
Figure 14 : Rats *spotting lethal* et sauvage et partie distale de leur tube digestif respectifs

(d'après GARIEPY, et al., 1996)

Des études plus précises sur l'innervation du tube digestif de ces rats ont été réalisées. Elles montrent que le système nerveux entérique tout entier est affecté chez les individus homozygotes mutés : les anomalies ne se situent pas simplement dans la partie distale du tube digestif où on note une absence totale de cellules nerveuses. Les parties plus proximales du

tube digestif, paraissant normales macroscopiquement, présentent des plexus nerveux petits, aplatis et vacuolés. Les neurones ainsi que les cellules gliales sont touchés par l'arrêt précoce de la migration des cellules précurseurs (DEMBOWSKI, et al., 2000; VON BOYEN, et al., 2002).

Des études réalisées *in vitro* montrent que la réduction du nombre de récepteurs aux endothélines de type B chez les hétérozygotes a des conséquences biologiques au niveau cérébral (EHRENREICH, et al., 1999). Les animaux hétérozygotes ont donc aussi été étudiés. Il apparaît que les hétérozygotes ont un pourcentage du pelage blanc plus important que les homozygotes non mutés ce que l'on retrouve aussi chez les souris *piebald lethal* (DEMBOWSKI, et al., 2000). En utilisant de la Peripherin comme marqueur neuronal, Dembowski a mis en évidence de subtiles modifications des plexus nerveux entériques des rats hétérozygotes par rapport aux homozygotes sauvages (DEMBOWSKI, et al., 2000). Ceci a été confirmé plus tard par Von Boyen (VON BOYEN, et al., 2002). Les rats hétérozygotes présentent les anomalies structurales suivantes au niveau du tube digestif : le plexus myentérique contient des ganglions de grande taille et les faisceaux des fibres nerveuses primaires sont, *a priori*, légèrement épaissis (différence non significative). Les ganglions des rats hétérozygotes contiennent un nombre plus important de neurones que ceux des rats homozygotes sains et cela va en augmentant le long du tube digestif. Le diamètre des faisceaux de fibres nerveuses du plexus sous-muqueux est augmenté chez les rats hétérozygotes, surtout au niveau du caecum et du côlon (VON BOYEN, et al., 2002) (Figure 15).



(A) rats homozygotes mutés (*sl/sl*), (B) hétérozygotes (*sl/+*) et (C) homozygotes sauvages (*+/+*)

Les plexus myentériques et sous muqueux des rats homozygotes mutés ne contiennent ni ganglion, ni cellules nerveuses et sont composés de faisceaux de fibres nerveuses hypertrophiées ayant une direction crâniocaudale (voir ► sur les photos A).

Les plexus myentériques et sous-muqueux des rats hétérozygotes et homozygotes sauvages contiennent des ganglions (voir ► sur les photos B et C) ainsi que des faisceaux de fibres nerveuses les reliant (voir ► sur les photos B et C). Les ganglions paraissent plus gros chez les rats hétérozygotes que chez les rats homozygotes sauvages, surtout au niveau du plexus sous muqueux. Les faisceaux de fibres nerveuses y ont aussi un diamètre plus élevé chez les rats hétérozygotes.

Figure 15 : Aspect microscopique des plexus myentérique (photo de gauche) et sous muqueux (photo de droite) au niveau du côlon

(d'après VON BOYEN, et al., 2002)

Des études ont montré que le gène *sl* et le gène codant pour le récepteur aux endothélines de type B étaient confondus (CECCHERINI, et al., 1995; GARIEPY, et al., 1996). Une délétion de 301 pb au niveau de la jonction entre l'exon 1 et l'intron 1 (cette délétion comprend 265 pb de l'exon 1) du gène *EDNRB* a été mise en évidence (encadrée sur la Figure 16). Cette délétion chevauche la zone codant pour les deux premiers domaines transmembranaires du récepteur aux endothélines de type B et engendre l'activation d'un site d'épissage 15 pb en amont. Ceci entraîne un raccourcissement de la zone transcrite et ne permet pas la formation du récepteur fonctionnel (GARIEPY, et al., 1996).



Extrémité 3' de l'exon 1, extrémité 5' de l'exon 2 et séquence partielle de l'intron 1. La délétion de 301 pb est indiquée par le cadre. Les lettres indiquées sous la séquence ADN correspondent aux acides aminés, les lettres en italique correspondent aux régions transmembranaires du récepteur mature.

Figure 16 : Séquence partielle du gène *EDNRB* chez le rat

(d'après GARIEPY, et al., 1996)

Une délétion au niveau du gène *EDNRB* engendre donc des malformations au niveau du système nerveux entérique. Une délétion sur les deux exemplaires du gène entraîne une aganglionose complète du côlon et de la partie distale de l'intestin grêle alors qu'une délétion sur un seul des exemplaires du gène entraîne une formation prématurée de « conglomérats ganglionnaires » avant que l'arrangement normal des cellules nerveuses ne soit terminé. Le plexus sous-muqueux est la dernière couche nerveuse qui se forme lors du développement normal. Le développement incomplet du système nerveux entérique engendre donc des malformations plus importantes à ce niveau-là (VON BOYEN, et al., 2002). Le système

EDNRB/EDN3 influence particulièrement le développement du système nerveux dans la partie intestinale distale (PUFFENBERGER, et al., 1994 b). Les analyses morphométriques réalisées par Von Boyen et ses collaborateurs le confirment (VON BOYEN, et al., 2002). Ceci s'explique par le fait que le système EDNRB/EDN3 agit comme un inhibiteur de la différenciation des cellules nerveuses entériques : il permet aux cellules précurseurs des cellules nerveuses entériques de persister jusqu'à ce qu'elles aient fini de coloniser le tube digestif, la différenciation se faisant après (WU, et al., 1999). Une mutation sur les deux exemplaires du gène *EDNRB* entraîne donc une différenciation prématurée à l'origine de l'aganglionose de l'intestin distal. L'étude de Von Boyen met donc en évidence l'importance de la « dose » de gène fonctionnel sur le phénotype et permet d'affirmer que le développement du système nerveux entérique ne se fait pas selon la loi du « tout ou rien » (VON BOYEN, et al., 2002).

CHAPITRE II : LE SYNDROME LETAL DU POULAIN BLANC

Le syndrome létal du poulain blanc est un autre modèle animal de la maladie de Hirschsprung ou plutôt du syndrome de Shah-Waardenburg associant mégacôlon et anomalies pigmentaires.

L'aganglionose du côlon chez le cheval est appelé syndrome létal du poulain blanc ou LWFS pour Lethal White Foal Syndrome ou encore OLWFS pour Overo Lethal White Foal Syndrome.

A. Présentation de la maladie

1. *Signes cliniques*

Ce syndrome apparaît chez des poulains issus de parents Quarter Horse ou Paint Horse (littéralement « chevaux peints »), des races de chevaux américaines de plus en plus représentées en France. Il a été décrit par les éleveurs de ces races depuis qu'elles existent (au moins depuis 1962) puis les scientifiques s'y sont intéressés (TROMMERSHAUSEN-SMITH, 1977). Les poulains naissent blancs ou quasiment blancs (Figure 17) : leur peau est rose et leurs poils sont blancs. Ils ont parfois quelques petites taches colorées au niveau de la queue, des sabots, du nez, du dos ou du ventre. Les yeux peuvent être foncés ou bleus ou encore hétérogènes (JONES, 1979; VONDERFECHT, et al., 1983). Le syndrome touche autant les mâles que les femelles (HULTGREN, 1982).



Figure 17 : Poulain atteint de LWFS

Ces poulains blancs ont un comportement tout à fait normal juste après leur naissance : ils se lèvent, se mettent à téter, ... Par contre, entre 12 et 16 heures après leur naissance, en moyenne, ils commencent à montrer des signes de coliques tout en gardant un examen clinique normal. Ils se regardent les flancs, se roulent et ont des difficultés à se lever. Des analyses de sang réalisées sur ces poulains ne montrent pas d'anomalie hormis une leucocytose pouvant être reliée au stress de l'animal. Puis progressivement, leur état général se dégrade, on note une augmentation de la fréquence cardiaque et de la fréquence respiratoire, le poulain paraît de plus en plus douloureux et l'abdomen commence à se dilater. Ces poulains n'expulsent pas leur méconium dans les 24 premières heures comme cela arrive normalement et, à la palpation, on remarque que le rectum ne contient pas de méconium, mais seulement du mucus. Ces coliques ne répondent pas au traitement médical (analgésie, lavements rectaux) et on observe souvent un reflux important lors de sondage naso-gastrique ce qui est un des signes d'occlusion intestinale. La mort naturelle survient en moyenne au bout de 48h mais la majorité des animaux sont euthanasiés avant (HULTGREN, 1982; VONDERFECHT, et al., 1983; LIGHTBODY, 2002; SANDERSEN, et al., 2003).

Certains auteurs relatent un autre signe : quelques poulains ne répondent pas aux hennissements de leur mère et n'ont aucune réaction face à des bruits de haut volume sonore (VONDERFECHT, et al., 1983). Chez les autres espèces, la surdité congénitale est souvent associée à des anomalies pigmentaires et elle a été décrite chez l'homme et chez la souris atteints de mégacôlon et d'anomalies pigmentaires. L'hypothèse d'une surdité congénitale chez les poulains atteints du syndrome léthal du poulain blanc a donc été émise mais elle n'a été étudiée que très récemment. Trois poulains atteints ont été testés grâce à la méthode des potentiels évoqués auditifs par Magdesian et son équipe (2009) : ils présentaient tous une surdité bilatérale complète. D'autres chevaux ont été testés dans cette étude : des chevaux overo présentent aussi une surdité complète bilatérale. La surdité apparaît comme reliée à certains éléments de la robe : les chevaux sourds avaient presque tous une robe overo « splashed-white » et présentaient tous une large marque blanche sur la tête et les yeux partiellement ou totalement bleus (MAGDESIAN, et al., 2009). Un autre cas de surdité avait été mis en évidence par la même méthode, au Canada, chez un Paint Horse overo aux yeux bleus de 3 ans (HARLAND, et al., 2006). L'étude de Magdesian, étant la première à analyser la surdité du cheval en fonction de sa robe et de son génotype, a été réalisée à une faible échelle. Pour mieux tirer parti des tendances mises en évidence par cette étude, il faudrait analyser un plus grand nombre d'animaux.

2. *Observations post mortem*

A l'autopsie, la plupart des anomalies visibles se situent au niveau intestinal. Il s'agit d'une distension modérée du jéjunum et de l'iléon par du gaz et du mucus et d'une distension plus marquée du caecum et du côlon ascendant (en totalité ou la première partie seulement) qui contiennent du méconium impacté. La partie distale du côlon ascendant, le côlon descendant ainsi que le rectum sont peu développés, sont pâles, ont un faible diamètre et paraissent fortement contractés. La lumière intestinale est présente sur toute la longueur du tube digestif. Le lait ingéré par les poulains se retrouve dans l'estomac et le duodénum (VONDERFECHT, et al., 1983; LOEVEN, 1987). A l'histopathologie du tube digestif, on remarque que les plexus myentérique et sous-muqueux sont présents au niveau de l'estomac et de l'intestin proximal. Par contre, ils sont toujours absents au niveau du côlon descendant et du rectum. La limite proximale du segment non innervé est variable : souvent, l'aganglionose s'étend à tout ou partie du côlon ascendant, du caecum, et va même parfois jusqu'à atteindre la partie distale de l'intestin grêle (iléon, jéjunum) (HULTGREN, 1982; LOEVEN, 1987; SANDERSEN, et al., 2003). Il a été rapporté d'autres anomalies concomitantes à l'aganglionose du côlon : des reins en fer à cheval, des hernies, des contractures des tendons des antérieurs, des hypoplasies du thymus (HULTGREN, 1982; MC CABE, et al., 1990).

Une autre anomalie majeure chez ces poulains est l'anomalie de pigmentation. Il y a une absence totale de mélanocytes dans la peau sauf dans les zones apparaissant colorées à l'œil nu (VONDERFECHT, et al., 1983). Des anomalies de pigmentation des yeux sont aussi rapportées : certains poulains ont les yeux foncés, d'autres les yeux bleus et d'autres présentent une hétérochromie irienne. On retrouve des granules pigmentaires sur la face postérieure de l'iris (SCHNEIDER et LEIPOLD, 1978; VONDERFECHT, et al., 1983).

3. *Diagnostic différentiel*

Il faut cependant rester vigilant et ne pas euthanasier un poulain issu de parents Paint Horse qui nait blanc : certains poulains naissent blancs ou paraissent blancs à la naissance mais ne sont pas atteints d'aganglionose du côlon (METALLINOS, et al., 1998). De plus, les causes de coliques chez le poulain sont nombreuses (Tableau V) et il convient de faire un diagnostic différentiel, incluant l'aganglionose du côlon (SANDERSEN, et al., 2003).

Organe touché	Affection
Estomac	sténose du pylore perforation ulcères
Intestin grêle	entérite volvulus adhésions intussusception infarcissement impaction ulcères et sténose du duodénum hernie inguinale ou ombilicale
Caecum	perforation torsion, associée à une torsion du gros intestin
Côlon ascendant	impaction du méconium colite déplacement dorsal à gauche torsion atrésie du côlon masse intraluminaire infarcissement
Côlon descendant	perforation impaction de méconium atrésie du côlon obstruction extraluminaire obstruction intraluminaire
Rectum	atrésie rectale ou anale prolapsus rectal perforation rectale
Tractus urinaire	rupture de la vessie obstruction de l'urètre rupture du canal de l'ouraque
Cavité péritonéale	péritonite hémopéritoine suite à une hémorragie interne ascite

Tableau V : Les causes de coliques chez le poulain

(d'après SANDERSEN, et al., 2003)

Si certaines hypothèses peuvent être écartées facilement, d'autres le sont plus difficilement comme l'impaction de méconium. Cette dernière, si elle n'est pas due à une aganglionose du côlon répondra au traitement médical.

Le seul diagnostic de certitude existant est un test ADN (ou une histologie du tube digestif réalisée post-mortem).

B. La mutation impliquée dans le syndrome létal du poulain blanc, les méthodes permettant de la détecter et l'étude de sa répartition

Le syndrome létal du poulain blanc est une maladie congénitale décrite au départ par des éleveurs de chevaux. Il a été remarqué qu'en croisant deux chevaux de robe overo (Figure 18), il naissait parfois un poulain blanc atteint d'aganglionose du côlon (VONDERFECHT, et al., 1983). Une origine génétique de la maladie a été suspectée par comparaison à la maladie de Hirschsprung chez l'homme et aux modèles murins de cette maladie.



Figure 18 : Cheval de robe overo

1. Le gène mis en cause et sa mutation

Les anomalies de développement présentes dans le cas du syndrome létal du poulain blanc (aganglionose du côlon, anomalies de pigmentation et surdité) font penser à une anomalie de la migration de la crête neurale au cours du développement embryonnaire. Chez les autres espèces (homme, rat, souris), il a été mis en évidence les mêmes anomalies de développement. On a vu précédemment que le système endothéline-3/récepteur aux endothélines de type B était nécessaire au bon développement de la crête neurale (BAYNASH, et al., 1994; HOSODA, et al., 1994) : des mutations de ces gènes entraînent les mêmes anomalies que chez les poulains blancs. Le gène mis en cause dans le syndrome létal du poulain blanc pourrait donc être un des gènes impliqués dans l'aganglionose du côlon chez les autres espèces.

L'étude du gène *EDNRB* chez le cheval a permis de mettre en évidence une mutation au niveau de ce gène chez les poulains atteints du syndrome létal du poulain blanc par rapport

aux chevaux sains. Cette mutation est une substitution de deux nucléotides (transversion TC→AG) en position 353 et 354 du gène *EDNRB* (METALLINOS, et al., 1998; SANTACHI, et al., 1998; YANG, et al., 1998) (Figure 19).

Allèle sauvage	gcccagcgac gcaccctccc tctctccccg tgcgaaagaa ccatcgagat caaggagact
Allèle muté	gcccagcgac gcaccctccc tctctccccg tgcgaaagaa ccatcgagat caaggagact
Allèle sauvage	ttcaagtaca tcaacacagt agtgtcctgc ctagtgttcg tgctgggcat catcggaaac
Allèle muté	ttcaagtaca tcaacacagt agtgtcctgc ctagtgttcg tgctgggcat ca agg ggaaac
Allèle sauvage	tccacactgc tgagaatcat ttacaagaac aagtgcacgc ggaacggccc taatatcttg
Allèle muté	tccacactgc tgagaatcat ttacaagaac aagtgcacgc ggaacggccc taatatcttg

Figure 19 : Allèle normal et allèle muté sur une partie du gène *EDNRB* du cheval

(d'après METALLINOS, et al., 1998)

Le gène *EDNRB* est situé sur le chromosome 17 et code pour une protéine de 443 acides aminés. Les différents domaines présumés de cette protéine sont décrits dans le Tableau VI.

Régions de la protéine et leur localisation	Position des régions	Longueur
Peptide signal	1-26	26
Domaine extracellulaire	27-102	76
Domaine transmembranaire 1	103-127	25
Domaine cytoplasmique	128-138	11
Domaine transmembranaire 2	139-164	26
Domaine extracellulaire	165-176	12
Domaine transmembranaire 3	177-198	22
Domaine cytoplasmique	199-219	21
Domaine transmembranaire 4	220-244	25
Domaine extracellulaire	245-272	28
Domaine transmembranaire 5	273-297	25
Domaine cytoplasmique	298-325	28
Domaine transmembranaire 6	326-351	26
Domaine extracellulaire	352-363	12
Domaine transmembranaire 7	364-390	27
Domaine cytoplasmique	391-443	53

Tableau VI : Régions présumées de la protéine EDNRB et leur localisation

(d'après UniProt, <http://www.uniprot.org/uniprot/O62709>, 2009)

Les nucléotides mutés font partie du 118^{ème} codon du premier domaine transmembranaire de la protéine EDNRB : le codon ATC (présent chez les chevaux témoins) devient AAG (chez les poulains blancs). Cette mutation a pour conséquence le changement du 118^{ème} acide aminé : l'Isoleucine présente normalement est remplacée par une Lysine (Figure 20). On a donc le remplacement d'un acide aminé à chaîne hydrophobe par un acide aminé à longue chaîne chargée positivement. Ce changement modifie la conformation de la protéine puisqu'il se situe dans un domaine transmembranaire : la protéine n'est plus fonctionnelle et ceci a donc des conséquences sur le développement de la crête neurale (METALLINOS, et al., 1998; SANTACHI, et al., 1998; YANG, et al., 1998).

```

      10      20      30      40      50      60
MQFLPTLCGR VLVALILACG VAGVQGEERR FPPARATPPL LGFEEIMTPP TKTSWPTGSN

      70      80      90      100     110     120
ASVPRLSAPP QMPKAGRTAG AQRRTLPPPP CERTIEIKET FKYINTVVSC LVFVLGIIGN

      130     140     150     160     170     180
STLLRIIYKN KCMRNGPNIL IASLALGDLL HIIIDIPINV YKLLAEDWPF GVEMCKLVPF

      190     200     210     220     230     240
IQKASVGITV LSLCALSIDR YRAVASWSRI KGIGVPKWTÄ VEIVLIWVVS VVLAVPEAVG

      250     260     270     280     290     300
FDMITADYKG SYLRICLLHP TQKTAFMQFY KNAKDWLFS FYFCLPLAIT AFFYTLETCE

      310     320     330     340     350     360
MLRKKSGMQI ALNDHLKQRR EVAKTVFCLV LVFALCWLPL HLSRILKHTL YDQNDPHRCE

      370     380     390     400     410     420
LLSFLLVLEY IGINMASLNS CINPIALYLV SKRFKNCFKW CLCCWCQSF E KQSLQSDKQS

      430     440
CLKFKANDHG YDNFRSSNKY SSS

```

En blanc sur fond noir, l'Isoleucine remplacée par la Lysine dans l'allèle muté.

Figure 20 : Séquence d'acides aminés complète de la protéine EDNRB du cheval

(d'après NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/3299894>, 1998)

Les poulains atteints du syndrome léthal du poulain blanc sont homozygotes pour cette mutation et les parents de ces poulains sont hétérozygotes. Aucun cheval adulte testé n'a présenté le génotype *Lys/Lys* correspondant à l'allèle muté à l'état homozygote ce qui permet de conclure que c'est cette mutation à l'état homozygote qui est à l'origine de la maladie. Les parents des poulains blancs sont pour la plupart des chevaux à la robe overo et sont donc hétérozygotes pour ce gène. De plus, la plupart des chevaux overo testés sont hétérozygotes aussi pour ce gène ce qui pousse à dire que la robe overo serait associée à l'hétérozygotie pour le gène de l'EDNRB (METALLINOS, et al., 1998; SANTSCHI, et al., 1998; YANG, et al., 1998).

2. Le mode de transmission de la maladie

Parmi les poulains atteints du syndrome léthal du poulain blanc, on compte quasiment autant de femelles que de mâles ce qui est compatible avec une transmission autosomale. La transmission de la robe overo a longtemps été considérée comme autosomale récessive mais des modèles réalisés par McCabe et ses collaborateurs (MC CABE, et al., 1990) ont montré que la transmission se fait sur un mode autosomal dominant (Figure 21).

		Parent (robe overo)	
		O	o
Parent (robe overo)	O	OO	Oo
	o	Oo	oo

		Parent (robe unie)	
		o	o
Parent (robe overo)	O	Oo	Oo
	o	oo	oo

Allèles

O - allèle « overo » dominant

o - allèle « uni » récessif

Génotype Phénotype

OO Syndrome létal du poulain blanc

Oo Robe overo

oo Robe unie

L'allèle O muté est dominant, il entraîne le phénotype « overo » à l'état hétérozygote et « syndrome létal du poulain blanc » à l'état homozygote.

L'allèle o est récessif et entraîne le phénotype « uni » à l'état homozygote

Figure 21 : Modèle de transmission du syndrome létal du poulain blanc

(d'après MC CABE, et al., 1990)

Ce modèle a été réalisé en respectant les lois mendéliennes et correspond à ce que l'on peut observer dans la réalité. Cependant, si on analyse plus précisément les chiffres, on voit qu'on devrait obtenir, en cas de croisement de deux overo, 25% de poulains unis, 50% de poulains overo et 25% de poulains atteints du syndrome létal du poulain blanc. Or, dans la réalité, bien moins de 25% de poulains blancs naissent du croisement de deux overo (environ 8%). Ceci peut s'expliquer par le fait que les poulains atteints de ce syndrome ne sont sûrement pas tous déclarés ou par une possibilité de l'implication de plusieurs allèles dans la robe overo ou encore par un phénotypage incorrect des parents (SANTSCHI, et al., 1998).

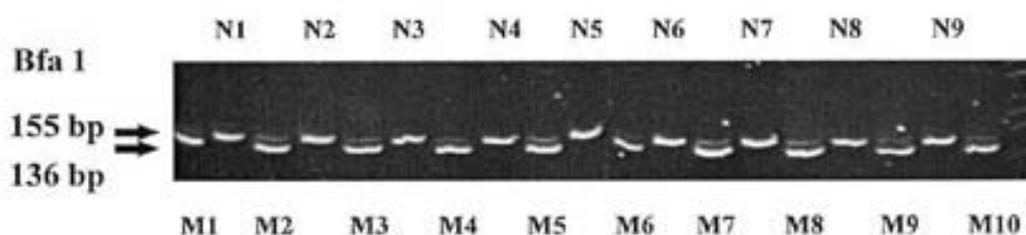
De plus, certains poulains atteints naissent du croisement d'un cheval overo et d'un cheval à robe unie ce qui signifie que certains chevaux unis sont porteurs de l'allèle muté. On remarque donc que le phénotype n'est pas totalement corrélé au génotype et donc seul le test génétique permet de donner un génotype fiable de chaque cheval (SANTSCHI, et al., 1998).

3. Les tests de dépistage de la mutation

a. Dépistage par PCR-RFLP

Ce test a été mis au point par Yang et al. en 1998. Le principe du test est d'amplifier un fragment d'ADN par PCR au niveau du site de la mutation puis de faire digérer ce fragment par une enzyme de restriction : il y a une différence de digestion des fragments suivant s'ils ont été amplifiés à partir de l'allèle muté ou de l'allèle sauvage. En réalité, deux tests ont été créés. Les ADN de dix poulains atteints du syndrome létal du poulain blanc et de neuf chevaux non porteurs de l'allèle muté ont été utilisés pour mettre au point ces tests.

Les amorces utilisées dans le premier test sont ps2 (5'agtgttcgtgctgggcatc 3') et hex1 (5'ctttagacattgatgggat 3') et le mélange réactionnel est ensuite soumis au cycle d'amplification $94^{\circ}\text{C} - 3\text{min}; \frac{94^{\circ}\text{C}-40\text{s}; 63^{\circ}\text{C}-40\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-40\text{s}}{30 \text{ cycles}}; 72^{\circ}\text{C} - 8\text{min}; 8^{\circ}\text{C} - \infty$. Les produits de PCR sont ensuite purifiés puis digérés par l'enzyme de restriction *Bfa*1 dans un incubateur à 37°C pendant toute une nuit. Les produits de la digestion sont ensuite séparés sur un gel de polyacrylamide à 8%. Dans ce test, les produits de PCR sont de 155 pb qu'ils proviennent de l'allèle muté ou de l'allèle sauvage mais seuls les fragments issus de l'amplification de l'allèle muté sont digérés par *Bfa*1 et donnent deux fragments de 136 pb et 19 pb. Le résultat de ce test est visible sur la Figure 22.



N1-9 : produits d'amplification de l'ADN des chevaux non porteurs de l'allèle muté.

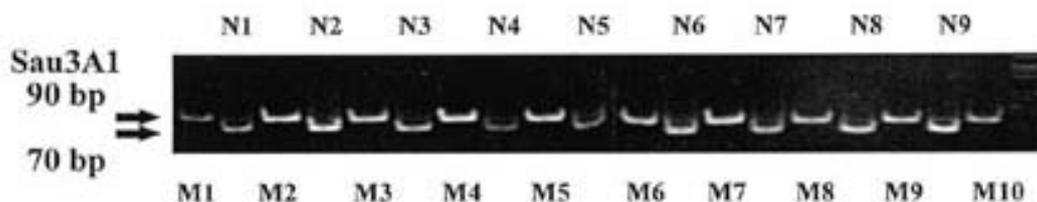
M1-10 : produits d'amplification et de digestion de l'ADN des poulains atteints du LWFS

Figure 22 : Résultat de la PCR-RFLP avec digestion par *Bfa*1

(d'après YANG, et al., 1998)

Le deuxième test a été conçu sur le même principe mais la digestion se fait seulement sur les fragments issus de l'amplification de l'allèle normal. Les amorces utilisées sont ps4 (5'agtgttcgtgctgggcatga 3') et ps5 (5'tcaagatattagggccgttcc 3') et le cycle d'amplification est le même sauf la température d'hybridation qui est de 61°C . L'enzyme de restriction utilisée est Sau3AI. L'amplification par PCR donne des fragments de 90 pb pour l'allèle muté et

l'allèle sauvage. Les produits de la digestion des fragments issus de l'amplification de l'allèle sauvage ont une longueur de 70 et 20 pb. Le résultat de ce test est visible sur la Figure 23.



N1-9 : produits d'amplification de l'ADN des chevaux non porteurs de l'allèle muté.

M1-10 : produits d'amplification et de digestion de l'ADN des poulains atteints du LWFS

Figure 23 : Résultat de la PCR-RFLP avec digestion par *Sau3AI*

(d'après YANG, et al., 1998)

Ces deux tests génétiques par PCR-RFLP ont été utilisés par Yang et al. (1998) sur 22 chevaux appartenant à huit familles pour comprendre comment l'allèle muté était transmis.

b. Dépistage par PCR spécifique d'allèles

Deux tests de dépistage par PCR spécifique d'allèle ont été mis au point en 1998 par deux équipes différentes.

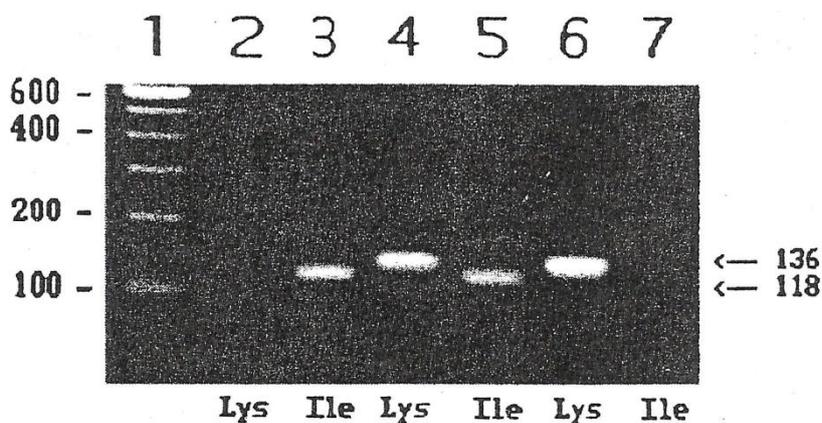
Le premier test qui sera décrit est celui élaboré par Santschi et al. (1998). Les séquences des amorces sens et anti-sens permettant d'amplifier l'allèle normal et l'allèle muté ainsi que la longueur des fragments amplifiés sont données dans le Tableau VII.

Allèle amplifié	Allèle sauvage	Allèle muté
Amorce sens	5'GTTCGTGCTGGGCATCATC 3'	5'GTTCGTGCTGGGCATCAAG 3'
Amorce anti-sens	5'GTGCAGCAAGTCTCCAGAG 3'	5'GGGGATGTCAATGATGATGTG 3'
Longueur du fragment amplifié	118 pb	136 pb

Tableau VII : Séquence des amorces sens et anti-sens utilisées dans le test de Santschi et al. (1998) et longueur des fragments amplifiés

(d'après SANTSCHI, et al., 1998)

Chaque mélange réactionnel contient les amorces nécessaires à l'amplification d'un des deux fragments. Le cycle d'amplification de cette PCR est le suivant : 94°C – 3min ; $\frac{95^{\circ}\text{C}-30\text{s} ; 56^{\circ}\text{C}-2\text{min} ; 72^{\circ}\text{C}-45\text{s}}{35 \text{ cycles}}$; 72°C – 8min ; 8°C – ∞. Les produits amplifiés sont analysés sur un gel d'agarose à 2%. Le résultat de cette PCR est présenté sur la Figure 24.



Colonnes 2 et 3 : Produits amplifiés à partir de l'ADN d'un cheval uni (« solid »)

Colonnes 4 et 5 : Produits amplifiés à partir de l'ADN de la mère d'un poulain atteint du LWFS

Colonnes 6 et 7 : Produits amplifiés à partir de l'ADN d'un poulain atteint du LWFS

Figure 24 : Résultat de la PCR spécifique d'allèle réalisée par Santschi et al. (1998)

(d'après SANTSCHI, et al., 1998)

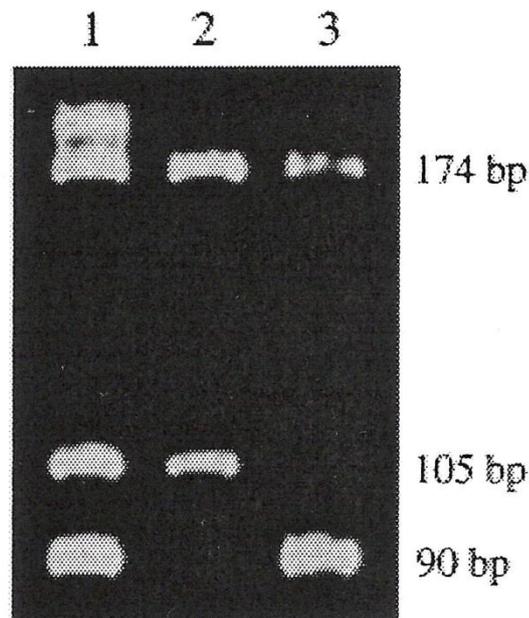
Ce test a été réalisé sur 22 poulains atteints du syndrome léthal du poulain blanc (tous homozygotes mutés) ainsi que sur trente-cinq des parents de ces poulains (tous hétérozygotes). Vingt-cinq chevaux « solids » ont aussi été testés : ils étaient tous homozygotes sains.

Le deuxième test décrit est celui de Metallinos et al. (1998) qui ont aussi mis au point une PCR spécifique d'allèle permettant de détecter l'allèle muté. Les amorces sens utilisées sont E1-2.F (5'GAA CCA TCG AGA TCA AGG AGA C 3') et lw2.F (5'CAT CAA GGG AAA CTC CAC AC 3') et les amorces anti sens sont wt2.R (5'GTG TGG AGT TTC CGA TGA TG 3') et E1.R (5'TGC AGC AGA GTC TCC CAG AGC 3'). Dans cette PCR, le mélange réactionnel contient les 4 amorces. La taille des fragments amplifiés entre les différentes amorces est exposée dans le Tableau VIII.

Amorces	E1-2.F	lw2.F
wt2.R	90 pb	impossible
E1.R	174 pb	105 pb

Tableau VIII : Taille des fragments amplifiés entre les différentes amorces utilisées par Metallinos et al. (1998)

Le cycle d'amplification est $94^{\circ}\text{C} - 12\text{min}$; $\frac{94^{\circ}\text{C} - 5\text{s} ; 58^{\circ}\text{C} - 10\text{s} ; 72^{\circ}\text{C} - 30\text{s}}{35 \text{ cycles}}$; $72^{\circ}\text{C} - 8\text{min}$; $8^{\circ}\text{C} - \infty$. Les produits de PCR sont visualisés après migration sur un gel de polyacrylamide 12%. Le résultat de ce test est visible sur la Figure 25.



Colonne 1 : Produits amplifiés à partir de l'ADN d'un cheval frame ovéro hétérozygote

Colonne 2 : Produits amplifiés à partir de l'ADN d'un poulain atteint du LWFS

Colonne 3 : Produits amplifiés à partir de l'ADN d'un cheval homozygote sain

Figure 25 : Résultat de la PCR spécifique d'allèle réalisée par Metallinos et al. (1998)

(d'après METALLINOS, et al., 1998)

Ce test a été réalisé sur 138 chevaux pour permettre leur génotypage.

4. *La répartition de la mutation dans la population équine*

Le génotype semble ne pas être exactement relié au phénotype dans le syndrome létal du poulain blanc. Pour mieux appréhender les différents cas, des études ont été réalisées pour montrer la répartition de l'allèle muté dans la population équine.

a. La mutation rencontrée chez différentes races

Le syndrome létal du poulain blanc est surtout présent chez la race Paint Horse. Cette race a été créée en 1962 pour regrouper les chevaux « de couleur », c'est-à-dire des chevaux avec des taches blanches sur le corps, et ayant la conformation des chevaux servant à la conduite du bétail. Les Paint Horses sont de petits chevaux avec une arrière main puissante et des membres musclés (Figure 26) : leur conformation est adaptée au travail qui leur est demandé. Ils sont aujourd'hui utilisés en compétition de western ou en chevaux de loisir car ce sont des chevaux vifs mais dociles. Les taches de ces chevaux sont irrégulières et la peau est rose au niveau des poils blancs. Aux Etats-Unis, c'est la deuxième race dans le classement par nombre d'enregistrements annuels. Les Paint Horses deviennent de plus en plus nombreux en France chaque année : leur robe originale et leur caractère y sont pour beaucoup (American Paint Horse Association, <http://www.apha.com>).

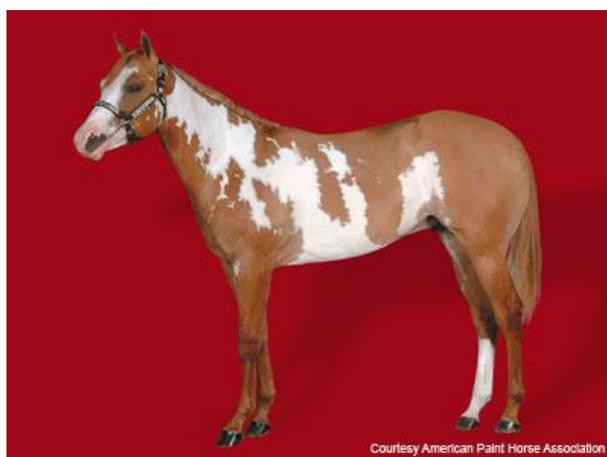


Figure 26 : Cheval Paint Horse

(American Paint Horse Association, <http://www.apha.com>)

Une étude a montré que la fréquence de l'allèle responsable du syndrome létal du poulain blanc était de 10,7% chez les Paint Horses (TRYON, et al., 2009). Pour appartenir à la race Paint Horse, un poulain doit avoir au moins un de ses parents inscrit au livre des Paint Horses et l'autre inscrit au livre des Paint Horses ou des Quarter Horses ou des Pura sang anglais (American Paint Horse Association, <http://www.apha.com>). On retrouve aussi des chevaux porteurs de l'allèle muté chez les Quarter Horses, les Pura Sang anglais et les

chevaux miniatures (METALLINOS, et al., 1998). Les Chevaux Crème et les Appaloosas peuvent aussi être porteurs, même si aucun cas n'est décrit dans la littérature, car leur Stud Book (livre de la race) accepte les Quarter Horses comme reproducteurs.

Des chevaux n'appartenant pas à une race, c'est-à-dire n'étant pas inscrit à un livre, peuvent aussi être porteurs de l'allèle muté s'ils sont issus de chevaux Paint Horse ou Quarter Horse, même s'ils n'ont pas une robe tachée.

b. La mutation et les différentes robes

Chez les Paint Horses, plusieurs robes sont reconnues. Les robes bicolores (blanc et une autre couleur) sont appelées les robes « pie ». Des études ont montré une répartition différente de l'allèle muté en fonction de la robe. C'est pourquoi nous allons d'abord détailler les différentes robes puis étudier la répartition de l'allèle muté dans ces différentes robes.

i. Etude préalable des robes

Chez les Paint Horses, 4 types de robes sont reconnus.

Premièrement, pour robe Tobiano, les marques blanches présentes sur la tête ne sont pas différentes des marques retrouvées communément chez les chevaux unis. Les quatre membres sont généralement blancs et les marques blanches sur le corps sont régulières, ovales ou rondes, plutôt orientées verticalement et traversent souvent la ligne du dos. Au moins un des flancs est coloré et la queue est toujours bicolore comme on peut le voir sur la Figure 27 (American Paint Horse Association, <http://www.apha.com>; VROSTOS, et al., 2001).

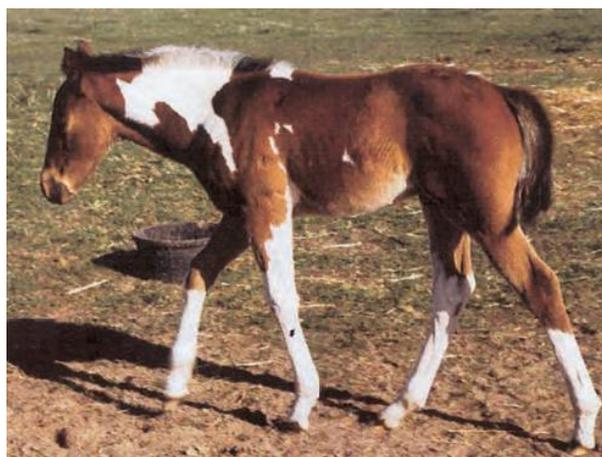


Figure 27 : Cheval de robe Tobiano

(d'après VROSTOS, et al., 2001)

Deuxièmement, la robe Overo qui est caractérisée par des marques blanches importantes sur la tête qui peuvent s'étendre sur la face, les oreilles ou encore l'auge et les lèvres. Les taches blanches du corps vont des petites taches en éclaboussures aux grandes plages blanches aux contours irréguliers ou réguliers et ne traversent pas la ligne du dos entre le garrot et la queue. Au moins un des membres est coloré et la queue est toujours unicolore (Figure 28) (American Paint Horse Association, <http://www.apha.com>; SANTSCH, et al., 2001).



Figure 28 : Cheval de robe Overo

Troisièmement, la robe Tovero qui regroupe les caractéristiques des deux robes précédentes. Des zones colorées sont présentes au niveau des oreilles, autour de la bouche, au niveau du poitrail et au niveau des flancs, de plus ou moins grande taille. Les chevaux tovero peuvent avoir un œil bleu ou les deux (Figure 29) (American Paint Horse Association, <http://www.apha.com>).



Figure 29 : Cheval de robe Tovero

Enfin, la robe Solid qui correspond à des chevaux issus de Paint Horses mais de robe unie, colorée ou blanche.

Parmi les chevaux Overo, il existe une grande variation de robes différentes. Des sous-types de la robe overo ont donc été créés et ils sont détaillés dans le Tableau IX.

Nom de la robe	Description de la robe	Photo
Frame overo	La robe Frame overo est caractérisée par des taches blanches aux bords nets sur les côtés du cheval qui traversent rarement la ligne du dessus. Au moins un de membres est coloré. La tête est souvent très blanche et les yeux sont souvent bleus (un seul ou les deux)	
Splashed white overo	Les chevaux Splashed-white ont les membres blancs ainsi que la partie ventrale du corps. La tête est en grande partie blanche voire même totalement dans certains cas. Les yeux sont très souvent bleus.	
Sabino overo	La robe Sabino est une robe où les membres ont de larges marques blanches. Les marques blanches du corps sont surtout sur le ventre. Il y a souvent des zones où les poils blancs et les poils colorés sont mélangés et des zones truitées (mouchetures). Les yeux bleus sont là aussi fréquents.	

Tableau IX : Les trois sous-types de la robe Overo

(d'après American Paint Horse Association, <http://www.apha.com>; SANTSCHI, et al., 2001)

Ces trois sous-types sont les sous-types officiels reconnus par l'association américaine des Paint Horses (APHA). Santschi et ses collaborateurs (2001) en ont décrit trois autres pour étudier la répartition de l'allèle muté.

Tout d'abord, le Calico qui est une robe Frame overo avec des taches blanches à bords irréguliers. Ensuite, le Medicine hat qui est une forme de Sabino overo avec énormément de blanc ce qui fait que les zones colorées se retrouvent au niveau des oreilles et parfois de la ligne du dos. Enfin, le Bald-face qui est un Splashed white overo avec pas ou peu de blanc sur la partie ventrale et dont les marques blanches des membres ne rejoignent pas celles du corps. Ces trois robes sont visibles sur la Figure 30.

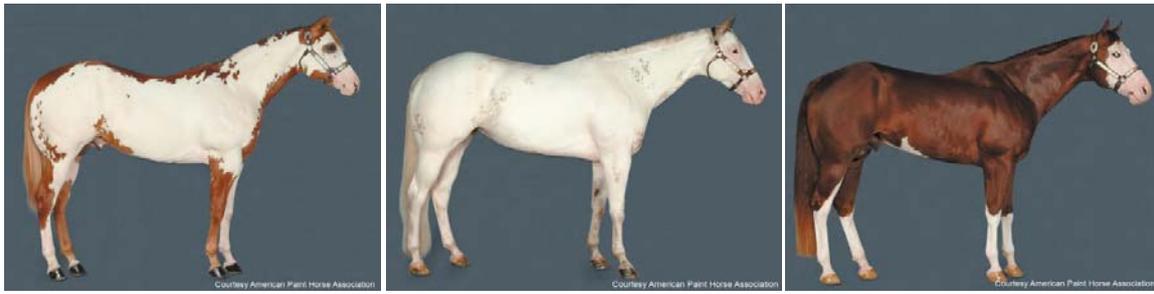


Figure 30 : Chevaux de robe Calico, Medicine hat et Bald-face

(d'après American Paint Horse Association, <http://www.apha.com>)

ii. Fréquence de l'allèle muté dans les différentes robes

Une première étude, utilisant le test par PCR spécifique d'allèle mise au point par Metallinos et al. (1998) et réalisée sur un petit nombre de chevaux, a montré que l'allèle létal pouvait être retrouvé à l'état hétérozygote chez des chevaux overo, tobiano, tovero et solid, donc chez toutes les robes de chevaux. Les seuls sujets homozygotes pour l'allèle muté sont ceux atteints du syndrome létal du poulain blanc (METALLINOS, et al., 1998).

Une autre étude à plus grande échelle (945 chevaux « pie » et 55 chevaux unis) a été réalisée. Les génotypes, révélés grâce au test par PCR spécifique d'allèle mis au point par Santschi et al. (1998), sont indiqués en fonction de la robe dans le Tableau X.

Robe	Nombre de chevaux	Homozygotes sains	Hétérozygotes (%)	Homozygotes mutés
Overo				
- Frame	188	10	178 (95%)	0
- Calico : blanc > 75%	37	0	37 (100%)	0
blanc < 75%	38	17	21 (55%)	0
membres blancs	67	61	6 (9%)	0
- Splashed white	26	23	3 (12%)	0
- Sabino	15	12	3 (20%)	0
- Bald-faced	17	11	6 (35%)	0
- Medicine hat	13	4	9 (69%)	0
OLWS foals	28	0	0	28
Tobiano	109	98	11 (10%)	0
Tovero	84	35	49 (58%)	0
Solid coloré	146	120	26 (18%)	0
Solid blanc	5	1	4 (80%)	0

Tableau X : Génotype pour le gène *EDNRB* en fonction de la robe

(d'après VROSTOS, et al., 2001)

De cette étude, on peut conclure que les phénotypes les plus porteurs de l'allèle muté sont les Frame overo et les Calico avec plus de 95% de porteurs. Viennent ensuite les Solid blancs, les Medicine hat, les Tovero, les Calico (avec moins de 75% de blanc) et les Bald-faced avec une fréquence de portage moyenne (entre 35 et 80%). Les robes où l'on a peu de portage de l'allèle muté sont les Solid colorés, les Tobiano, les Sabino et les Splashed white (portage entre 10 et 20%). Les robes où l'on rencontre très peu l'allèle muté sont les Calico avec seulement les membres blancs (avec limite des taches blanches irrégulières) et les chevaux unis d'autres races (VROSTOS, et al., 2001).

La présence de l'allèle muté paraît reliée au phénotype Frame overo. Cependant, les chevaux Calico ayant une grande quantité de blanc ont aussi une fréquence très élevée de portage (100% dans l'étude du Tableau X) : le phénotype Frame overo serait « masqué » par le phénotype Calico qui contient beaucoup de blanc. Cette information est très importante pour les éleveurs qui peuvent choisir en conséquence leurs croisements.

L'hétérozygotie pour le gène de l'EDNRB n'est pas toujours reliée au phénotype Frame overo. Certains chevaux sont hétérozygotes et ne manifestent pas le phénotype Frame. Il existe deux explications probables de ce phénomène. Premièrement, le phénotype Frame peut être masqué par un autre « patron » de blanc qui peut être dû à un autre gène : c'est ce qui doit se passer chez les Tobiano, les Splashed white overo, les Calico (avec moins de 75% de blanc), et chez les Sabino. Deuxièmement, parfois le phénotype Frame n'est pas masqué mais tout simplement absent comme chez les Bald-faced et chez les Solid. Il pourrait y avoir une expression variable de l'allèle muté, probablement à cause de l'influence d'autres gènes (c'est ce qui a été démontré chez la souris par Pavan et ses collaborateurs (PAVAN, et al., 1995)).

A l'inverse, il existe quelques chevaux présentant le phénotype Frame overo mais qui ne sont pas porteurs de l'allèle muté (Figure 31). Ce sont souvent des chevaux avec une unique tache blanche sur la partie ventrale de l'abdomen qui s'étend sur les côtés. C'est sûrement l'expression variable d'autres gènes entraînant des taches blanches qui est en cause comme par exemple l'expression minimale d'un patron Splashed white qui pourrait entraîner un patron Frame overo.



Figure 31 : Cheval Frame overo non porteur de l'allèle muté

Il existerait quatre patrons distincts de chevaux overo : Frame, Calico, Splashed white et Sabino. Les autres patrons seraient dus à des gènes modificateurs. La présence de l'allèle muté chez les chevaux autres que Frame overo augmente la quantité de blanc dans la robe, sur le corps et sur la tête (SANTSCHI, et al., 2001).

C. Intérêts de l'étude du syndrome léthal du poulain blanc

1. *Intérêt en biologie cellulaire*

Premièrement, l'étude du syndrome léthal du poulain blanc permet d'illustrer l'importance de la séquence d'ADN ainsi que des mutations pouvant survenir sur celle-ci. En effet, le seul changement de deux paires de bases (TC→AG en position 353-354 du gène de l'EDNRB) de l'ADN du poulain dans cette maladie entraîne sa mort.

L'étude de cette maladie permet donc de montrer que des mutations de l'ADN peuvent avoir des répercussions au niveau de la séquence d'acides aminés des protéines et, dans ce cas, il y a remplacement d'un seul acide aminé : l'isoleucine (hydrophobe) est remplacée par une lysine (hydrophile) dans le premier domaine transmembranaire de la protéine, très conservé chez les Mammifères (Figure 32).

Domaine transmembranaire I

Souris	CQRNIEOSKT FKYINTIVSC LVFVLGIIGN STLLRIYKN KCMRNGPNIL
Rat	CQRKIEONKT FKYINTIVSC LVFVLGIIGN STLLRIYKN KCMRNGPNIL
Homme	CQGPiEOKET FKYINTVVSC LVFVLGIIGN STLLRIYKN KCMRNGPNIL
Bovin	CDGPiEOKET FKYINTVVSC LVFVLGIIGN STLLRIYKN KCMRNGPNIL
Cheval	CDRTiEOKET FKYINTVVSC LVFVLGIIGN STLLRIYKN KCMRNGPNIL
LWFS	CDRTiEOKET FKYINTVVSC LVFVLGIIGN STLLRIYKN KCMRNGPNIL

Figure 32 : Alignement de séquences d'acides aminés du premier domaine transmembranaire et des régions voisines de la protéine EDNRB chez différentes espèces

(d'après SANTSCHI, et al., 1998)

Ce remplacement d'un acide aminé entraîne une modification majeure de la conformation de la protéine qui devient ainsi incapable de fixer son ligand et qui par conséquent devient inactive. La protéine impliquée dans le syndrome létal du poulain blanc est un récepteur couplé à la protéine G. Or, d'autres maladies sont dues à une mutation dans le domaine transmembranaire de récepteurs couplés à la protéine G (par exemple, la rétinite pigmentaire ou l'hypothyroïdie). L'étude de cette maladie permet donc d'avoir un modèle supplémentaire pour mieux comprendre le fonctionnement de ces récepteurs et l'importance de leur structure pour assurer leur fonction (TAO, 2006).

L'étude du syndrome létal du poulain blanc permet aussi d'analyser le rôle joué par le récepteur aux endothélines de type B. Ce récepteur s'exprime dans de nombreux tissus dont le cortex cérébral, le placenta, les poumons, les reins, le côlon, le duodénum, ... Lorsque le récepteur se lie avec un de ses ligands (les endothélines 1, 2 ou 3), il se met en place une série de réactions qui entraînent des effets biologiques tels qu'une régulation de la vasomotricité, une contraction de l'arbre bronchique ou encore une contraction des muscles lisses intestinaux (AURICCHIO, et al., 1996). L'étude de cette maladie a aussi permis de constater que ce récepteur, et son ligand l'endothéline 3, ont un rôle, au cours de l'ontogénèse, dans la migration des cellules nerveuses entériques dérivées de la crête neurale et des mélanoblastes eux aussi dérivés de la crête neurale.

2. Intérêt pour l'étude de la maladie de Hirschsprung

L'étude du syndrome létal du poulain blanc a permis de mettre en évidence un nouveau modèle de maladie de Hirschsprung et plus précisément de syndrome de Shah-Waardenburg. Elle a aussi permis de comparer les différents modèles animaux entre eux et avec l'homme.

Premièrement, au niveau des gènes atteints, on remarque que chez le cheval, seul le gène *EDNRB* est atteint alors que chez les souris, les gènes *EDNRB*, *EDN3* et *SOX10* peuvent être atteints. Chez l'homme, les mêmes gènes que chez la souris sont touchés pour le syndrome de Shah-Waardenburg mais de nombreux autres gènes sont atteints dans les cas de maladie de Hirschsprung. Les gènes atteints ainsi que leur localisation sont synthétisés dans le Tableau XI.

	Homme	Souris	Rat	Cheval
<i>EDNRB</i>	13q22 WS4 4 mutations différentes	Chr 14, 51 cM <i>Piebald lethal</i> Délétion 318 pb	Chr 15 <i>Spotting lethal</i> Délétion 301 pb	Chr 17 <i>Lethal white foal</i> TC→AG 353-354 ^{ème} pb
<i>EDN3</i>	20q13 WS4 4 mutations différentes	Chr 2, 104 cM <i>Lethal spotting</i> C→T 409 ^{ème} pb		
<i>SOX 10</i>	22q13 WS4 (ou WS4 et PCWH) 18 mutations différentes dont 2 avec association WS4 et PCWH	Chr 15, 46,6 cM Dom A→T 32 ^{ème} pb et insertion G après 579 ^{ème} pb		

Les différentes mutations chez l'homme sont répertoriées dans le Tableau IV.

Tableau XI : Gènes impliqués dans le syndrome de Shah-Waardenburg chez l'homme et chez les modèles animaux, mutations et localisation

(d'après Mouse Genome Database, <http://www.informatics.jax.org>, 2006; AMIEL, et al., 2008)

D'après le Tableau XI, on peut remarquer que, pour un même phénotype, plusieurs gènes peuvent être atteints. Et, pour un même gène atteint, peuvent exister des mutations complètement différentes (délétion de plusieurs centaines de bases ou substitution de 2 paires de bases) aboutissant finalement au même phénotype.

Outre la comparaison des gènes atteints, il est aussi intéressant de comparer les modes de transmission de la maladie, notamment lors d'atteinte du gène *EDNRB*.

Chez le cheval, les défauts de pigmentation apparaissent chez les animaux hétérozygotes pour le gène *EDNRB* alors que chez l'homme et chez les modèles murins, ces défauts n'apparaissent que chez les individus homozygotes mutés pour ce gène (ou pour le gène *EDN3*). Par contre, concernant la présence du mégacôlon, les hommes hétérozygotes peuvent être touchés alors que chez les chevaux, les souris et les rats, seuls les individus homozygotes mutés sont atteints. Chez les rats hétérozygotes, sont notés des anomalies du

développement des cellules nerveuses entériques mais elles n'entraînent pas de dysfonctionnements majeurs de la fonction digestive.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces différences interspécifiques :

- Les différents types cellulaires peuvent être plus ou moins sensibles au taux de récepteur aux endothélines de type B fonctionnels suivant les espèces. Par exemple, les cellules ganglionnaires entériques humaines seraient plus sensibles à la mutation que les mêmes cellules chez le cheval.

- D'autres gènes pourraient intervenir chez les différentes espèces, ayant pour conséquence d'amplifier ou de minimiser les effets de la mutation. Par exemple, chez le cheval, on suspecte que les problèmes de pigmentation ne viennent pas uniquement de la mutation du gène *EDNRB*. Une ou plusieurs mutations sur des gènes différents ou sur des gènes modificateurs du gène *EDNRB* sont envisagées (METALLINOS, et al., 1998).

L'étude de la maladie chez le cheval a un intérêt pour l'étude de la maladie humaine mais pas autant que l'étude chez les souris ou les rats car le cheval demeure un animal peu adapté au développement d'études sur un grand nombre d'individus.

3. Intérêt en médecine vétérinaire et en élevage

Le principal intérêt de l'étude du syndrome léthal du poulain blanc reste du domaine de la médecine vétérinaire et de l'élevage.

Cette maladie est connue depuis de nombreuses années mais la nature de son mode de transmission exact, de son origine et de son diagnostic moléculaire sont récentes.

La connaissance de la mutation et de son mode de transmission a permis aux éleveurs de choisir consciencieusement les accouplements de chevaux afin d'éviter l'obtention de poulains blancs et ainsi ne pas subir les conséquences économiques importantes dues à la perte d'un poulain.

L'apparition du test de diagnostic moléculaire par PCR (Polymérase Chain Reaction) a permis un diagnostic fiable et précoce de la maladie. Ce test peut aussi bien s'appliquer aux chevaux reproducteurs, afin de connaître leur statut vis-à-vis de l'allèle muté (porteurs ou non), et aux poulains blancs nouveau-nés.

Il est important de tester tous les chevaux Paint Horse, Quarter Horse ainsi que les chevaux ayant des ancêtres dans ces deux races car, comme on l'a vu précédemment, ils sont tous susceptibles de porter la mutation. Dans la mesure du possible, les chevaux porteurs

doivent être écartés de la reproduction (notamment lorsqu'il s'agit de chevaux Quarter Horse et « OI » (Origine Inconnue) chez lesquels il y a de nombreux reproducteurs non porteurs). Dans la race Paint Horse, ceci semble plus difficile car de nombreux chevaux overo sont porteurs (mais pas tous donc il faut privilégier les non porteurs).

Il est aussi très important de tester les poulains blancs nouveau-nés et de ne pas les euthanasier tout de suite après la naissance car certains poulains blancs ne sont pas atteints. C'était le cas de « Boo », un poulain né entièrement blanc issu de parents overo (Figure 33). A sa naissance, sa propriétaire a immédiatement contacté son vétérinaire pour euthanasier le poulain avant qu'il ne présente des signes de colique et ne meure de lui-même. En attendant le vétérinaire, le poulain s'est comporté normalement, s'est levé et a têté. Sur les conseils du laboratoire vétérinaire commercialisant le test de diagnostic, ils ont attendu que des signes de la maladie se présentent avant d'euthanasier le poulain. Deux jours plus tard, le poulain était toujours en pleine forme. Ce poulain entièrement blanc aux yeux bleus a donc échappé de peu à l'euthanasie. Le test génétique de diagnostic du syndrome létal du poulain blanc a été réalisé et a révélé que Boo n'était pas porteur de l'allèle muté. Boo présentait un autre caractère de poulains blancs atteints de mégacôlon : il était sourd mais cela n'a pas posé de problèmes majeurs. Boo fait donc partie des rares chevaux entièrement blancs aux yeux bleus non porteurs de l'allèle muté. Cet exemple montre l'importance d'attendre les éventuels signes cliniques avant de réaliser l'euthanasie. Il montre aussi l'importance du test génétique chez les parents car, si ce test avait été réalisé, aucun doute n'aurait été émis : Boo est le fils d'un étalon overo non porteur de la mutation. Il n'aurait donc pas pu engendrer de poulain atteint (ANON, 2002).



Figure 33 : "Boo", un exemple de cheval entièrement blanc non atteint

(d'après ANON, 2002)

Le syndrome létal du poulain blanc est une maladie assez fréquente aux Etats-Unis car la proportion de Paint Horses et de Quarter Horses dans la population équine est importante. Dans la race Paint Horse, 10,7% des chevaux sont porteurs de l'allèle muté. En France, ces chevaux ont un succès grandissant et l'on voit de plus en plus d'éleveurs qui subissent les conséquences économiques et morales importantes de cette maladie. L'étude du syndrome létal du poulain blanc possède des intérêts multiples tant en biologie moléculaire que dans la progression des connaissances sur le syndrome de Shah-Waardenburg chez l'Homme. Mais l'intérêt principal réside dans l'importance de la détection des animaux porteurs, dans le cadre de l'élevage, ainsi que dans le diagnostic de certitude de la maladie chez les poulains atteints. Devant le nombre grandissant de chevaux Paint Horse et Quarter Horse en France, cette thèse a été réalisée dans le but de mettre au point un test de diagnostic moléculaire accessible en France, alors qu'il n'était auparavant disponible qu'aux Etats-Unis.

DEUXIEME PARTIE :

MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE PCR POUR LA DETECTION DE L'ALLELE LETAL RESPONSABLE DU LWFS

CHAPITRE I : OBJECTIFS DE L'ETUDE EXPERIMENTALE

La première partie consistait en l'étude bibliographique du syndrome léthal du poulain blanc et des maladies analogues dans d'autres espèces, chez l'Homme notamment. La deuxième partie a pour objectif de décrire la mise au point d'un test de diagnostic moléculaire de cette maladie.

Devant le nombre croissant de chevaux de race Paint Horse et Quarter Horse en France, il était important qu'un test soit disponible dans ce pays. Les quelques éleveurs contactés ont immédiatement été intéressés par ce projet et m'ont permis de réaliser des prélèvements sur leurs chevaux, que leur statut vis-à-vis de la maladie soit connu ou inconnu. L'Association Française du Paint Horse ainsi que d'autres éleveurs ont aussi été contactés et ont tout de suite diffusé l'information. La finalisation de ce test a été permise grâce à l'un de mes maîtres de stage qui, s'étant souvenu de mon sujet de thèse, m'a envoyé des prélèvements de sang d'un poulain blanc suspect de syndrome léthal et de sa mère.

Le but est donc de mettre au point un test de diagnostic du syndrome léthal du poulain blanc, grâce au support logistique du Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône (LVD69). Cette maladie est due à une substitution de deux paires de bases dans le gène de l'EDNRB (METALLINOS, et al., 1998; SANTSCHI, et al., 1998; YANG, et al., 1998). Ce type d'anomalie est difficile à mettre en évidence car la différence entre l'allèle normal et l'allèle muté est très faible. La technique de PCR et l'utilisation d'amorces spécifiques d'allèle ont été choisies à la place d'une PCR-RFLP moins rapide.

Le test a été mis au point sur sang et sur crins, le but étant de permettre aux éleveurs et aux propriétaires de réaliser eux-mêmes les prélèvements. L'envoi des crins est aussi moins risqué que l'envoi de tubes de sang. Au niveau expérimental, j'ai participé aux différentes étapes de la mise au point du test en réalisant plusieurs stages au LVD69.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODE

A. Matériel

1. *Matériel biologique*

a. Les chevaux

L'étude a été réalisée grâce à l'emploi d'ADN de 21 chevaux, dont 13 femelles et 8 mâles. Le statut vis-à-vis du syndrome létal du poulain blanc était connu pour 9 d'entre eux, totalement inconnu pour 10 d'entre eux et à confirmer (suspicion clinique) pour 2 d'entre eux. Les chevaux utilisés sont de différents types :

- des chevaux de race Paint Horse ayant engendré des poulains blancs donc porteurs de l'allèle muté constituant des témoins positifs hétérozygotes (Cv5, Cv8, Cv9, Cv10, Cv13 : voir Tableau XII)

- des chevaux « tout venant » de robe unie supposés homozygotes sains (Cv1, Cv2, Cv3, Cv4 : voir Tableau XII)

- des chevaux de race Paint Horse de statut inconnu vis-à-vis de la maladie (chevaux « à tester ») (Cv6, Cv7, Cv11, Cv12, Cv14 : voir Tableau XII) et des chevaux dont les propriétaires ont demandé le test une fois celui-ci mis au point (Cv17, Cv18, Cv19, Cv20, Cv21 : voir Tableau XIII)

- un poulain blanc ayant présenté des signes de coliques (Cv16) et sa mère de robe unie (Cv15) ayant des papiers « origine inconnue » mais avec une morphologie de Paint Horse. Les génotypes sont à vérifier pour confirmer la maladie et le portage

Le Tableau XII répertorie les animaux prélevés pour la mise au point du test ainsi que leur sexe, leur âge, leur robe, leur statut génétique ainsi que leur photographie.

Dans le Tableau XII, toutes les photos sont des photos personnelles. Les tirets correspondent aux informations non disponibles.

Le Tableau XIII répertorie les animaux testés à la demande de leur propriétaire suite à la commercialisation du test.

Numéro du cheval	Sexe	Age	Robe	Statut génétique	Photo du cheval
Cv1	étalon	-	-	homozygote	non disponible
Cv2	jument	-	-	homozygote	non disponible
Cv3	Poney mâle	-	Gris	homozygote	non disponible
Cv4	Poney femelle	-	-	homozygote	non disponible
Cv5	jument	5 ans	Black overo	hétérozygote	
Cv6	jument	2 ans	Black overo	“à tester”	
Cv7	jument	2 ans	Black overo	“à tester”	
Cv8	étalon	5 ans	Sorrel overo	hétérozygote	
Cv9	jument	5 ans	Bay tovero	hétérozygote	
Cv10	jument	7 ans	Bay overo	hétérozygote	
Cv11	étalon	2 ans	Black overo	“à tester”	
Cv12	jument	18 mois	Bay overo	“à tester”	
Cv13	jument	10 ans	Sorrel overo	hétérozygote	
Cv14	jument	5 ans	Sorrel overo	“à tester”	
Cv15	jument	-	Palomino solid	hétérozygote?	
Cv16	Poulain mâle	1 jour	Blanc	homozygote muté?	

Tableau XII : Description phénotypique et génotypique des animaux prélevés en vue de la mise au point du test

Numéro	Sexe	Age	Robe
Cv17	jument	2 ans	Black overo
Cv18	étalon	1 an	Sorrel tovero
Cv19	jument	16 ans	Sorrel overo
Cv20	étalon	5 ans	Sorrel overo
Cv21	étalon	4 ans	Bay tobiano

Tableau XIII : Commémoratifs des chevaux dont les propriétaires ont demandé le test

b. Les prélèvements

Les prélèvements ont été de deux natures différentes : du sang et des crins (Tableau XVI).

Dix-sept prélèvements de sang ont été réalisés sur des chevaux de statut génétique différent, connu ou inconnu (Cv1, Cv2, Cv5, Cv6, Cv7, Cv8, Cv9, Cv10, Cv11, Cv12, Cv13, Cv14, Cv15, Cv16, Cv17, Cv19, Cv20).

Des prélèvements de crins ont été faits sur deux poneys supposés homozygotes sains (Cv3 et Cv4) dans le but d'extraire l'ADN des bulbes pileux et de développer le test à partir de ce matériel biologique puis sur deux chevaux à tester suite à la demande de leurs propriétaires (Cv18 et Cv21).

2. Matériel expérimental

a. Matériel commun à toute les étapes

Ce matériel est présent dans les différentes pièces du laboratoire et est utilisé dans toutes les étapes de la manipulation : des jeux de pipettes, des cônes avec ou sans filtre et des tubes eppendorf de tailles différentes.

b. Matériel nécessaire à l'extraction de l'ADN

i. Les kits d'extraction (Annexe 1)

Pour extraire l'ADN à partir du sang collecté, a été utilisé le kit d'extraction manuelle NucleoSpin® Blood Quickpure (laboratoire Macherey-Nagel).

Pour extraire l'ADN à partir des crins prélevés, ont été employés deux kits différents : le kit NucleoSpin® Tissue (laboratoire Macherey-Nagel) pour l'extraction manuelle et le kit MagneSil® KingFisher, genomic system (laboratoire Promega) pour l'extraction automatisée, utilisé avec le KingFisher™. Pour cette extraction automatisée, nous avons aussi besoin de

barrettes de 5 puits et d'embouts de protection des tiges métalliques qui sont fournis par THERMO ELECTRON CORPORATION®.

ii. Le KingFisher™

C'est une machine commercialisée par THERMO LABSYSTEMS® (Annexe 2). Elle permet une extraction semi-automatique de l'ADN de 15 échantillons en même temps. Son fonctionnement est basé sur l'utilisation de billes magnétiques, sur lesquelles se fixe l'ADN. Ces billes sont transférées d'un milieu réactionnel au suivant grâce à une attraction électromagnétique via des tiges métalliques plongeant successivement dans les différents milieux.

c. Les amorces

Les amorces utilisées pour la mise au point de ce test sont, d'une part, des amorces déjà parues dans la littérature, et d'autre part, des amorces élaborées par nos soins à partir des séquences de l'allèle normal et de l'allèle muté.

- *Les amorces déjà publiées*

Ces amorces sont extraites de l'article de Metallinos DL et son équipe (METALLINOS, et al., 1998) (Tableau XIV).

Amorce	Séquence	Tm (°C)
LWFm-s5	catcaAGggaaactccacac	60
LWFwt-as6	gtgtggagttccGAtgatg	60
LWF-s3	gaaccatcgagatcaaggagac	66
LWF-s1	caaatgcctaaagcaggg	54
LWF-as2	tgcagcagagtctccagagc	68

Tableau XIV : Les amorces : séquence et température de fusion Tm

(METALLINOS, et al., 1998)

- *Les amorces créées*

Les amorces définies sont : LWF-s7 et LWF-s9, des amorces sens spécifiques de l'allèle muté, et LWF-as4, une amorce anti-sens commune aux deux allèles. Les séquences de ces amorces sont confidentielles.

Amorce	Tm (°C)
LWF-s7	60
LWF-s9	60
LWF-as4	66

Tableau XV : Les amorces créées et leur température de fusion Tm

- *La position des amorces sur le gène*

La position des différentes amorces est indiquée sur la Figure 31.

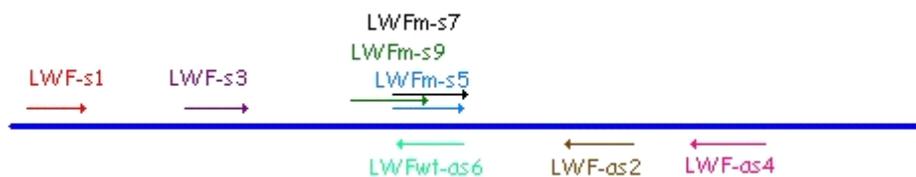


Figure 34 : Emplacement schématique des amorces sur le gène *EDNRB*

d. Matériel et réactifs

Les réactifs et le matériel utilisé sont respectivement décrits en Annexe 1 et 2.

B. Méthode

1. Les prélèvements

a. Méthode de prélèvement

Les prélèvements de sang ont été réalisés par ponction à l'aiguille de la veine jugulaire et le sang a été placé dans des tubes avec EDTA pour empêcher sa coagulation.

Les crins ont été arrachés au niveau de la crinière. Le nombre de crins arrachés était d'au moins 50 crins par cheval en prenant soin que les bulbes pileux soient présents.

b. Conservation

Le sang est réparti dans des tubes eppendorf de 2 mL à raison de 5 aliquotes pour chaque échantillon de sang. Ces aliquotes sont ensuite congelées et conservées à -20°C . Une aliquote est conservée à 4°C afin d'extraire l'ADN dès réception.

Les crins sont, quant à eux, conservés à 4°C . Après avoir coupé les bulbes du reste du poil, ils sont mis dans un tube eppendorf à 4°C .

2. *Les amorces*

a. Définition des amorces

Les amorces sont élaborées grâce au logiciel Amplify® à partir des séquences de l'allèle sain et de l'allèle muté (séquence AF19072 sur Pubmed genome). Ce logiciel permet de simuler des amplifications à partir des amorces dont la séquence a été définie. Il analyse les différentes combinaisons possibles entre les oligonucléotides créés et détermine quelles régions de l'ADN sont amplifiées. Le résultat obtenu indique les positions de fixation des oligonucléotides sur l'ADN, la position et la longueur des fragments les plus probablement amplifiés, y compris d'éventuels fragments non spécifiques.

b. Préparation et conservation des solutions d'amorces

Les amorces sont commandées à la société EUROGENTEC S.A. Elles sont reçues sous forme lyophilisée accompagnée d'une fiche technique mentionnant la méthode de mise en solution (Annexe 3).

Pour chaque amorce, une solution mère de concentration 0,5 mM est préparée en ajoutant de l'eau ultra pure au lyophilisat reçu. Ensuite, des solutions filles de concentration 10 µM sont préparées à partir de la solution mère. Toutes ces solutions sont conservées à -20°C. Cette méthode permet d'éviter les trop nombreuses phases de congélation/décongélation qui pourraient altérer la qualité des amorces.

3. *Les autres réactifs*

La Red Taq polymérase, les dNTP, l'ADN extrait, les ladder 100 et 20 et le tampon de charge sont conservés à -20°C. Ils sont remis à température ambiante avant leur utilisation.

Les kits d'extraction sont conservés à température ambiante.

4. *Extractions d'ADN*

a. Extraction de l'ADN à partir des échantillons de sang

L'extraction d'ADN à partir du sang a été réalisée par méthode manuelle avec le kit Macherey-Nagel NucleoSpin® Blood Quick Pure.

A partir du sang veineux prélevé sur tube EDTA, une lyse des membranes cellulaires ainsi qu'une digestion des protéines, qui pourraient inhiber la Taq polymérase, sont réalisées. L'ADN est ensuite adsorbé sur une membrane de silice puis subit plusieurs rinçages afin d'éliminer les impuretés.

La dernière étape consiste en une remise en solution de l'ADN dans un tampon (qui permet à l'ADN de se séparer de la membrane de silice). La solution d'ADN est ensuite conservée à -20°C jusqu'à son utilisation (Annexe 4).

b. Extraction de l'ADN à partir des échantillons de crins

L'extraction d'ADN à partir de crins a aussi été réalisée de deux manières différentes : une extraction manuelle avec le kit Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue et une extraction semi-automatisée grâce au Kingfisher™ pour laquelle on a utilisé le kit d'extraction Magnesil Kingfisher genomic system.

- *Extraction manuelle avec le kit Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue*

La première étape consiste à couper les crins au niveau du bulbe de manière à ne récupérer que celui-ci (sur 20 à 30 crins) puis de placer ces bulbes dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Dans ce tube, 180 µL de tampon T1 et 25 µL de protéinase K sont ajoutés. Ce mélange est ensuite laissé à 56°C toute une nuit. Le lysat est ensuite récupéré et subit l'étape d'extraction de l'ADN grâce à l'adsorption d'ADN sur une membrane de silice. La dernière étape d'élution est la même que pour l'extraction manuelle à partir du sang (Annexe 5).

- *Extraction semi-automatisée avec le kit MagneSil® Kingfisher genomic system*

Les bulbes sont coupés de la même manière que pour la méthode manuelle puis on ajoute 200 µL de tampon de lyse KF et 25 µL de protéinase K. L'incubation dure toute la nuit à 56°C. Le lysat est ensuite versé dans le premier tube du Kingfisher™, puis les étapes sont identiques à celles de l'extraction semi automatisée à partir du sang (Annexe 6).

c. Tableau récapitulatif des extractions en fonction du matériel biologique

Le Tableau XVI donne les numéros d'échantillons d'ADN pour chaque cheval en fonction du matériel biologique et de la méthode d'extraction utilisés.

Numéro du cheval	Nature du prélèvement	Numéro de l'extrait d'ADN	
		manuelle	automatisée
Cv1	Sang	05-55	
Cv2	Sang	04-03	
Cv3	Crins	05-188	
Cv4	Crins		05-189
Cv5	Sang	05-158 et 05-172	
Cv6	Sang	05-173	
Cv7	Sang	05-174	
Cv8	Sang	05-159	
Cv9	Sang	05-175	
Cv10	Sang	05-176	
Cv11	Sang	05-160	
Cv12	Sang	05-161	
Cv13	Sang	05-162	
Cv14	Sang	05-163	
Cv15	Sang	07-58	
Cv16	Sang	07-59	
Cv17	Sang	LWF1	
Cv18	Crins	LWF2	
Cv19	Sang	LWF3	
Cv20	Sang	LWF4	
Cv21	Crins	LWF5	

Tableau XVI : Nature des prélèvements et numéro d'extrait d'ADN pour chaque cheval

5. Réalisation de l'amplification par PCR

Toutes les conditions de PCR réalisées sont regroupées dans un tableau en Annexe 7.

a. Milieu réactionnel

i. Préparation du mélange réactionnel (= MIX)

Un mélange réactionnel contient de l'eau, des dNTP (désoxynucléotides triphosphates), les différentes amorces que l'on veut utiliser, la Red Taq polymérase, un

tampon et du $MgCl_2$. Les volumes à utiliser pour chaque réactif sont déterminés en fonction de la concentration finale voulue dans le MIX et en fonction de la concentration initiale de la solution utilisée. Le mélange réactionnel est réalisé dans une salle spécifique sous une hotte à flux laminaire.

La concentration en $MgCl_2$ est choisie en fonction du degré de stringence exigé. On réalise donc une gamme de $MgCl_2$ avec les concentrations 1 mM, 1,5 mM et 2 mM. Plus la concentration en $MgCl_2$ est faible et plus la stringence est augmentée c'est-à-dire qu'il y aura plus de spécificité dans la fixation des amorces sur l'ADN.

La concentration en amorce peut aussi être choisie pour favoriser l'amplification d'un fragment par rapport aux autres. Le Tableau XVII regroupe toutes les concentrations des différents réactifs utilisés pour les mélanges réactionnels.

Réactifs	Concentration de la solution mère	Concentration finale	Volume par tube (en μL)
H ₂ O Aiguettant			qsp 17 ou 19 μL
Tampon	10x	1X	2
MgCl ₂	25 mM	1 mM	0,8
		1,5 mM	1,2
		2 mM	1,6
DNTP (17905)	10 mM	200 μM	0,4
Red Taq polymérase	1U/ μL	0,5 U/20μL	0,5
Amorces			
LWF-s1	10 μM	0,4 μM	0,8
LWF-s3	10 μM	0,2 μM	0,4
		0,3 μM	0,6
		0,4 μM	0,8
		1 μM	2
LWF-s5	10 μM	0,4 μM	0,8
		1 μM	2
LWF-s7	10 μM	0,4 μM	0,8
LWF-s9	10 μM	0,4 μM	0,8
		0,6 μM	1,2
LWF-as2	10 μM	0,4 μM	0,4
		1 μM	2
LWF-as4	10 μM	0,4 μM	0,8
LWFwt-as6	10 μM	0,2 μM	0,4
		0,3 μM	0,6
		0,4 μM	0,8
		1 μM	2

Tableau XVII : Caractéristiques du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel est ensuite réparti entre les différents tubes nécessaires pour la PCR : témoin positif, échantillons et témoin négatif. Le témoin négatif est toujours rempli en dernier.

ii. Addition des échantillons d'ADN

Chaque échantillon d'ADN extrait est décongelé (si la PCR n'est pas faite immédiatement après l'extraction). La quantité d'ADN agit sur la sensibilité du test : la quantité d'ADN ajoutée est de 1 µL par tube pour l'ADN extrait du sang et de 1 ou 3 µL pour l'ADN extrait des crins. L'ADN est ajouté en dernier, hors de la hotte, en utilisant des cônes à filtre et un jeu de pipettes spécifique pour éviter toute contamination.

Le témoin négatif est nécessaire dans chaque PCR et permet de vérifier que le MIX n'a pas été contaminé par de l'ADN pendant sa préparation. 1 ou 3 µL d'eau Aqueux sont ajoutés au mélange.

b. Cycles de PCR

Les différentes étapes du cycle se déroulent dans un thermocycleur, programmé par l'opérateur. Les paramètres variables sont le temps et la température des différentes étapes de l'amplification ainsi que le nombre de cycles. On a utilisé différents programmes (Tableau XVIII).

		Phases du programme	Température (°C)	Durée			
		Dénaturation initiale	94	3 min			
Cycle		Dénaturation	94	1 min	10 s	10 s	5 s
		Hybridation	*	1 min	20 s	20 s	10 s
		Elongation	72	1 min	40 s	30 s	30 s
		Elongation finale	72	10 min			
		Conservation	8	∞			

* Température variable en fonction des différents tests réalisés

Tableau XVIII : Programmes du thermocycleur utilisés

Le nombre de cycles était de 35 cycles pour trois PCR puis de 45 cycles pour toutes les autres.

La température est le deuxième paramètre de stringence : la stringence augmente avec la température. C'est donc un paramètre que l'on fait beaucoup varier. La température classique de départ est $T_m - 5^\circ\text{C}$ ($T_m = (\text{nombre de C et G}) \times 4 + (\text{nombre de A et T}) \times 2$). En pratique, il est nécessaire de tester un gradient de températures pour trouver les conditions optimales.

c. Analyse des produits amplifiés

i. Réalisation de l'électrophorèse

Cette étape se fait en deux temps : tout d'abord la préparation du gel d'électrophorèse et du tampon puis, après dépôt des produits amplifiés, l'électrophorèse proprement dite.

Le gel préparé est un gel d'agarose à 3% qui permet de bien séparer les fragments de petite taille (inférieurs à 100 pb). On dissout, par chauffage, 3 g d'agarose solide dans 100 mL de solution de TBE (Tris Borate EDTA) 0,5x. Après cette dissolution, est ajouté du bromure d'éthidium, qui permet la localisation des fragments amplifiés après migration, afin que la concentration finale dans le gel soit de 0,5 µg/mL. La solution obtenue est coulée dans un support sur lequel est fixé un peigne qui va permettre la formation des puits nécessaires au dépôt des amplifiats obtenus après la PCR. Une fois le gel polymérisé, il est démoulé et placé dans la cuve à électrophorèse, contenant le tampon d'électrophorèse.

Deux autres types de gel ont été utilisés : un gel de nusieve® 3% et en gel d'agarose HD® 3%. Le mode de fabrication de ces gels est identique au gel d'agarose 3% : seule la nature du composant solide change.

Le tampon d'électrophorèse est constitué de TBE 0,5x dans lequel on a ajouté du bromure d'éthidium pour obtenir une concentration finale de 0,5 µg/mL.

Le dépôt des échantillons est réalisé dans l'ordre prédéfini lors de la réalisation du plan de dépôt. Dans chaque puits, sont déposés 9 µL d'amplifiat et 1 µL de tampon de charge mélangés préalablement. Dans le puits restant, on ajoute 10 µL de ladder (20 pb ou 100 pb) mélangé à du tampon de charge et à de l'orange G, qui marque le front de migration.

Ensuite, un courant de 100 V est appliqué à la cuve pendant environ 40 minutes. En pratique, il est nécessaire d'aller régulièrement vérifier le déroulement de la migration pour éviter une migration trop importante et donc une sortie des fragments du gel.

ii. Révélation des fragments

L'électrophorèse est arrêtée puis le gel et son support sont retirés de la cuve et sont placés sur un transilluminateur (table éclairant le gel par dessous avec des UV) dans une chambre noire. Les fragments apparaissent sous forme de petites bandes fluorescentes. La distance de migration est fonction de la taille des fragments : les fragments les plus petits

migrent le plus loin. Une photographie du gel grâce à un appareil photographique Polaroid® est ensuite réalisée pour être analysée ultérieurement.

iii. Conservation des fragments amplifiés

Après l'électrophorèse, les restes des solutions d'amplifiats sont conservées à -20°C pour permettre de les réutiliser éventuellement pour d'autres dépôts.

6. *Suivi des bonnes pratiques de laboratoire*

D'une part, lors de la réalisation d'une PCR, le risque de contamination des nouveaux prélèvements par d'anciens n'est pas négligeable. D'autre part, certains produits sont dangereux et sont à manipuler avec précaution. Le laboratoire et la méthode adoptée doivent donc être adaptés pour pallier à ces risques.

a. *Risques de contamination des échantillons et prévention*

i. Définition des risques

Dans le laboratoire, il existe plusieurs sources d'aérosols d'ADN susceptibles de contaminer les nouveaux échantillons et donc d'aboutir à des faux positifs. Il est donc important de connaître les points critiques tout au long de l'enchaînement des étapes expérimentales afin de prévenir les éventuelles contaminations. Les différentes étapes que sont la phase de prélèvement, l'extraction d'ADN, la préparation des MIX, l'amplification et la révélation peuvent toutes être des phases de contamination potentielle.

ii. Prévention des risques

- *La rigueur lors des prélèvements*

Les prélèvements de sang doivent être réalisés avec du matériel stérile, neuf et à usage unique (aiguille, tube) et après désinfection de la zone de ponction.

Les prélèvements de crins doivent être faits après un brossage soigné de la crinière réalisé avec une brosse propre, ceci pour éviter toute contamination par un ou des crins provenant d'un autre animal.

- *L'adaptation des locaux*

Les locaux doivent permettre une séparation des étapes, dans le temps mais aussi dans l'espace et permettre le principe de marche en avant.

Le principe de marche en avant est défini par le fait qu'un échantillon ne doit pas revenir à une étape après l'avoir quittée. Il entre d'un côté du laboratoire et en ressort modifié de l'autre côté.

La séparation des étapes consiste à utiliser, idéalement, une pièce par étape de PCR. Il y a une pièce de stockage des prélèvements, une d'extraction, une pour la préparation du MIX et l'addition d'ADN, une pour l'amplification où se trouve le thermocycleur et une de révélation où se trouve la cuve à électrophorèse et une chambre noire pour permettre la révélation. Les étapes les plus cruciales sont la préparation des MIX et la révélation des fragments amplifiés : les deux pièces servant à ces étapes sont équipées d'un sas dans lequel le manipulateur change de blouse et de sabots et porte une charlotte. Le matériel nécessaire à chaque étape est dans la pièce qui lui est dédiée.

Après chaque manipulation, le plan de travail est nettoyé à l'alcool.

- *La prévention lors de la préparation des MIX*

Plusieurs mesures sont mises en œuvre pour éviter la contamination des MIX. Tout d'abord, les divers réactifs sont aliquotés (dNTP, amorces, $MgCl_2$, eau Aguetant) : certains sont à usage unique ($MgCl_2$, eau Aguetant) et d'autres sont à usages multiples mais si une contamination est révélée, ils peuvent être éliminés rapidement. Le fait d'aliquoter permet de ne perdre qu'une petite quantité de produit si une contamination survient. Tous les éléments en contact avec les réactifs sont à usage unique (cônes, tubes,...). Les micropipettes sont à usage multiple mais les cônes sont équipés de filtre pour éviter leur contamination. Deuxièmement, le mélange des réactifs se fait sous une hotte à flux laminaire, toujours pour éviter les contaminations. Il se fait dans un ordre bien précis et se termine par l'ajout des amorces. L'ajout d'ADN ne se réalise pas sous la hotte, toujours dans le même but. Cet ajout se fait avec une micropipette et des cônes réservés à cet effet.

- *Le contrôle des contaminations*

Pour chaque PCR, on réalise un témoin négatif dont le parcours est identique à celui des autres échantillons : ceci permet de repérer immédiatement une éventuelle contamination.

- *Identification des échantillons*

Chaque réactif et chaque échantillon, tout au long des étapes, est scrupuleusement identifié afin d'éviter les mélanges, sources d'erreurs. Chaque prélèvement arrivant au laboratoire est associé à un numéro de dossier (dossier répertoriant la nature du prélèvement, les commémoratifs et l'anamnèse de chaque animal) et, une fois l'extraction d'ADN réalisée, ce numéro de dossier est associé à un ou plusieurs numéros d'extraction (ex : 05-158 signifie 158^{ème} extraction de l'année 2005). Le numéro d'extraction suit ensuite l'échantillon jusqu'au résultat de la PCR.

b. Risques de manipulation des réactifs et prévention

Le personnel qui manipule les réactifs est exposé aux risques de chaque réactif. C'est pour cela que chaque personne porte une blouse blanche et des sabots restant au laboratoire. Chaque manipulateur doit aussi porter des gants pour se protéger des différents tampons (certains lysent les cellules) et du bromure d'éthidium (qui est cancérigène). La protection vis-à-vis des UV se fait derrière une vitre dans la chambre noire.

Les déchets sont éliminés selon leur origine et leur degré de dangerosité.

CHAPITRE III : RESULTATS

A. Résultats des PCR lors de la mise au point du test

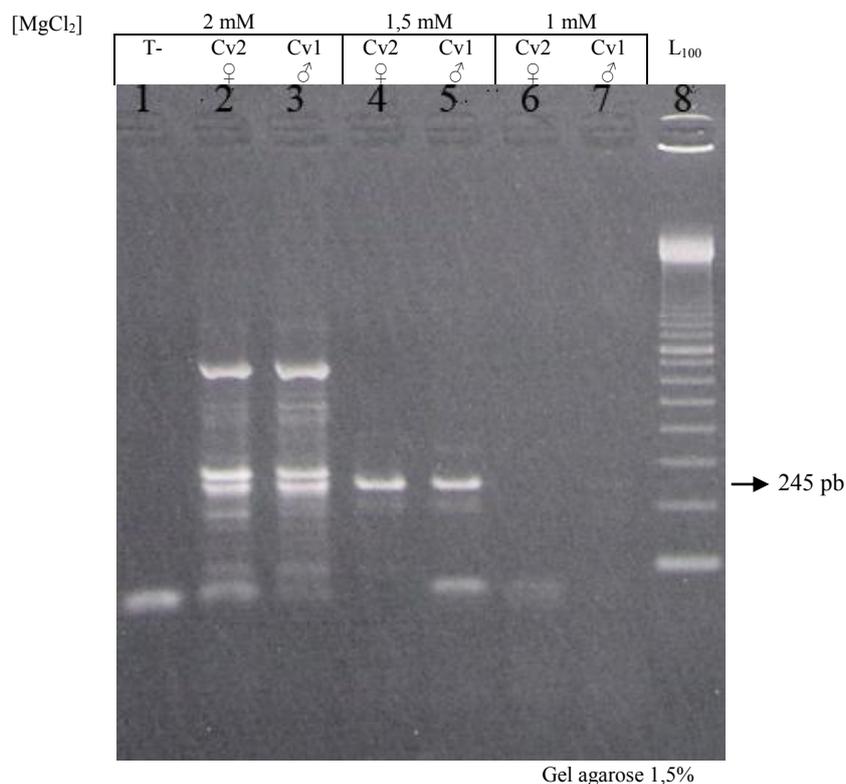
La mise au point du test a été réalisée en utilisant en majorité le sang de deux chevaux : le Cv1 (extrait d'ADN 05-55) qui est un mâle homozygote sain (+/+) et le Cv8 (extrait d'ADN 05-159) qui est un mâle hétérozygote (+/-).

1. *Avec les amorces déjà publiées*

Ces amorces ont été publiées dans l'article de Metallinos (METALLINOS, et al., 1998). Elles sont décrites en détail dans le Tableau XIV.

a. Amorces LWF-s1/LWF-as2

Pour cette PCR, les ADN de deux chevaux sains ont été utilisés : le Cv1 (mâle) et le Cv2 (femelle). Le signal attendu pour les deux chevaux est un fragment à 245 pb.



Conditions expérimentales : température d'hybridation de 60°C.

Concentration en amorces de 0,2 µM

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-1\text{min} ; 60^{\circ}\text{C}-1\text{min} ; 72^{\circ}\text{C}-1\text{min}}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₁₀₀ : ladder 100

Cv 1 et 2 : produits amplifiés des chevaux 1 et 2

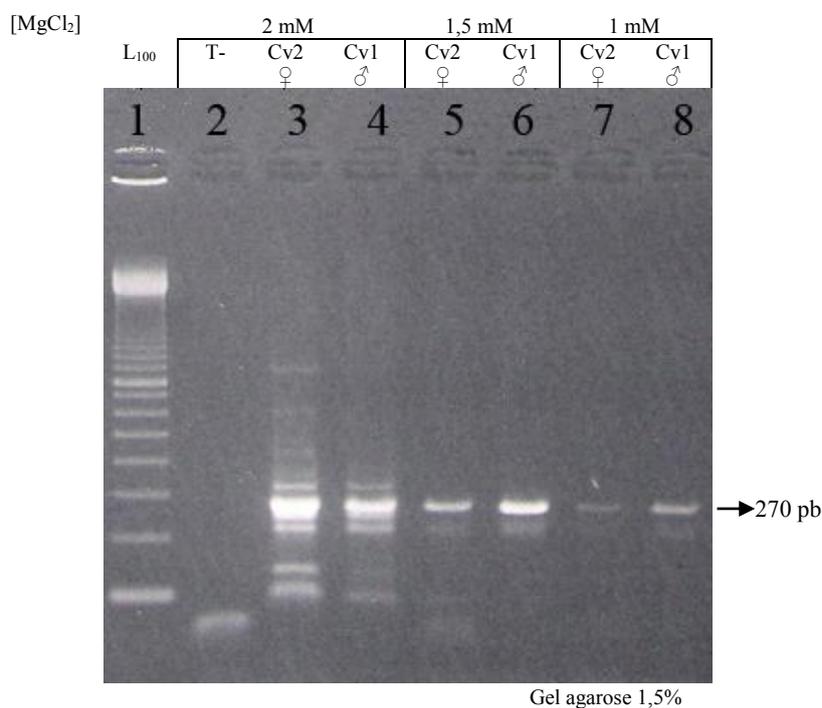
♂ : mâle ; ♀ : femelle

Figure 35 : Résultat de la PCR avec les amorces LWF-s1/LWF-as2

Les signaux chez le mâle et la femelle sont identiques. A [MgCl₂]=2 mM, on a de nombreuses bandes non spécifiques, à [MgCl₂]=1,5 mM, il reste quelques bandes non spécifiques mais la bande à 245 pb est bien marquée, par contre, à [MgCl₂]=1 mM, on perd totalement le signal.

b. Amorces LWF-s1/LWF-as4

Les chevaux utilisés sont les mêmes que pour les amorces LWF-s1/LWF-as2. Ce sont deux chevaux sains et le fragment attendu est de 270 pb.



Conditions expérimentales : température d'hybridation de 60°C.

Concentration en amorces de 0,2 µM

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-1\text{min} ; 60^{\circ}\text{C}-1\text{min} ; 72^{\circ}\text{C}-1\text{min}}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₁₀₀ : ladder 100

Cv 1 et 2 : produits amplifiés des chevaux 1 et 2

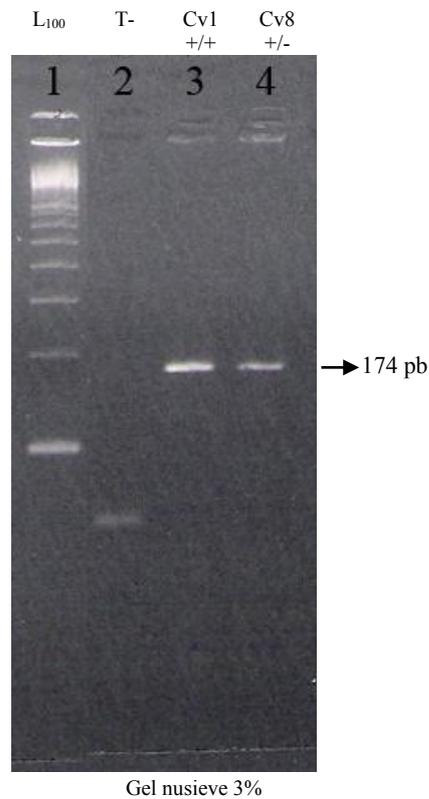
♂ : mâle ; ♀ : femelle

Figure 36 : Résultat de la PCR avec les amorces LWF-s1/LWF-as4

On a une différence d'amplification entre le mâle et la femelle : le signal est plus important chez le mâle aux trois concentrations en MgCl₂. A [MgCl₂]=2 mM, on a de nombreuses bandes non spécifiques, à [MgCl₂]=1,5 mM, il reste quelques bandes non spécifiques mais la bande à 270 pb est bien visible. Enfin, à [MgCl₂]=1 mM, on n'a plus de bandes non spécifiques mais le signal est faible, notamment chez la femelle.

c. Amorces LWF-s3/LWF-as2

Les chevaux utilisés pour cette PCR sont deux mâles : le Cv8 qui est hétérozygote (+/-) et le Cv1 qui est homozygote sain (+/+). Le fragment attendu est un fragment à 174 pb.



Conditions expérimentales : température d'hybridation de 58°C.

[MgCl₂]=1,5 mM

Concentration en amorces de 0,4 μM

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-5\text{s}; 58^{\circ}\text{C}-10\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{35 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₁₀₀ : ladder 100

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

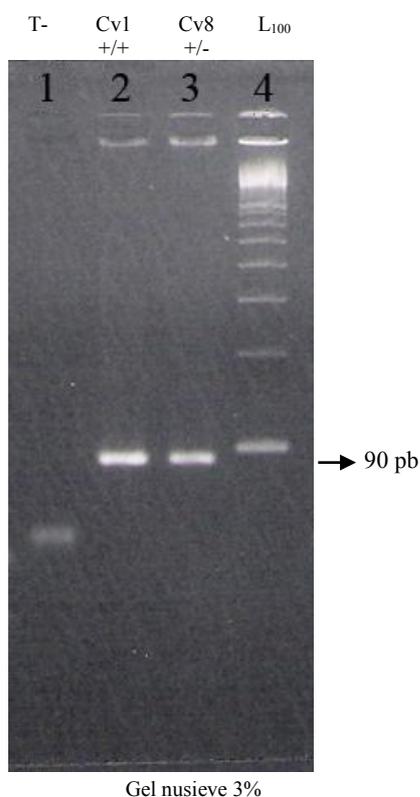
+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

Figure 37 : Résultat de la PCR avec les amorces LWF-s3/LWF-as2

Les fragments à 174 pb sont visibles chez les deux chevaux. Il n'y a pas de bandes non spécifiques.

d. Amorces LWF-s3/LWF-as6

Les chevaux utilisés sont les mêmes que pour le couple LWF-s3/LWF-as2 et le fragment attendu est de 90 pb chez les deux chevaux.



Conditions expérimentales : température d'hybridation de 58°C.

[MgCl₂]=1,5 mM

Concentration en amorces de 0,4 μM

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-5\text{s}; 58^{\circ}\text{C}-10\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{35 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₁₀₀ : ladder 100

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

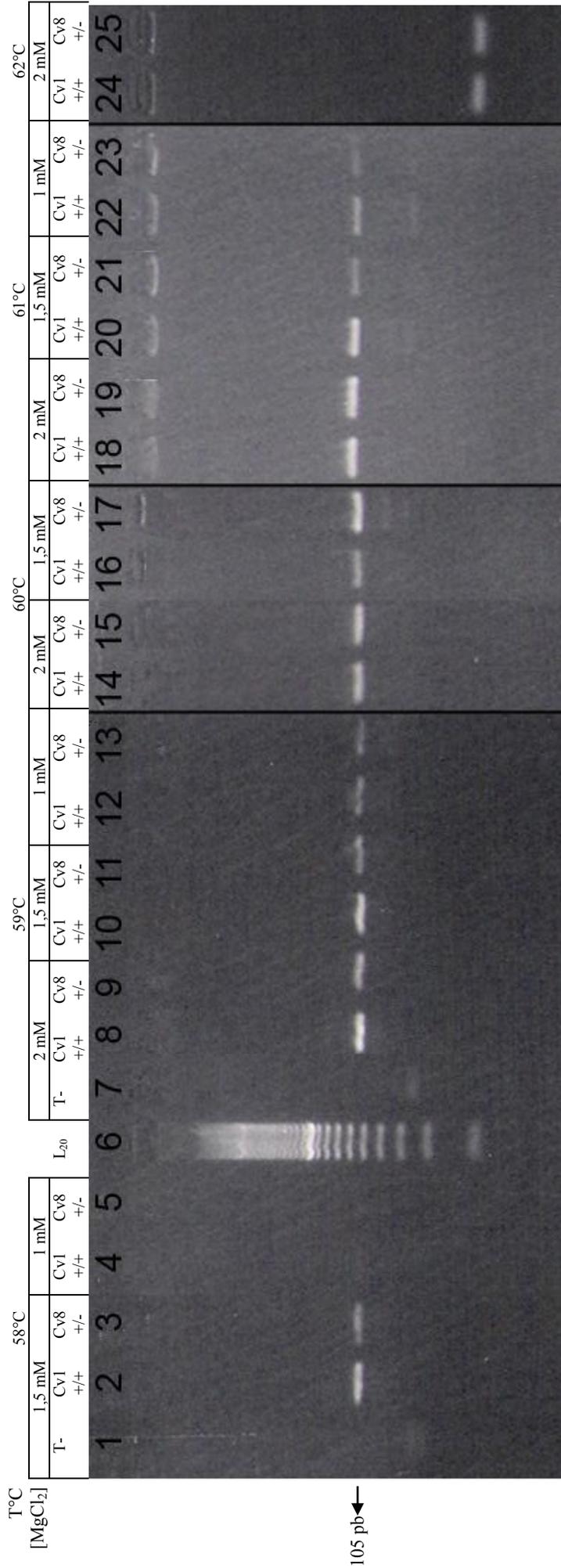
+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

Figure 38 : Résultat de la PCR avec les amorces LWF-s3/LWF-as6

La bande à 90 pb est présente chez les deux chevaux mais plus intense chez l'homozygote sain (Cv1).

e. Amorces LWFm-s5/LWF-as2

C'est le couple d'amorces qui permet de révéler l'allèle muté. Pour les PCR avec ce couple d'amorces, on a utilisé un cheval homozygote sain (Cv1) et un cheval hétérozygote (Cv8). Le fragment amplifié est de 105 pb et ne doit être amplifié que chez le cheval hétérozygote.



Conditions expérimentales : Concentration en amorces de 0,4 μM

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-5\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-10\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T°C : Température d'hybridation

[MgCl₂] : Concentration en MgCl₂

T⁻ : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

Figure 39 : Résultats des PCR avec les amorces LWFm-s5/LWF-as2

A 58°C et $[MgCl_2]= 1,5$ mM, le signal à 105 pb est présent pour les deux chevaux et même plus intense pour le cheval homozygote sain. On perd ce signal chez les deux chevaux en diminuant la $[MgCl_2]$ à 1 mM.

A 59°C, dans toute la gamme de concentration en $MgCl_2$, le signal est présent chez les deux chevaux, plus intense chez l'homozygote sain que chez l'hétérozygote.

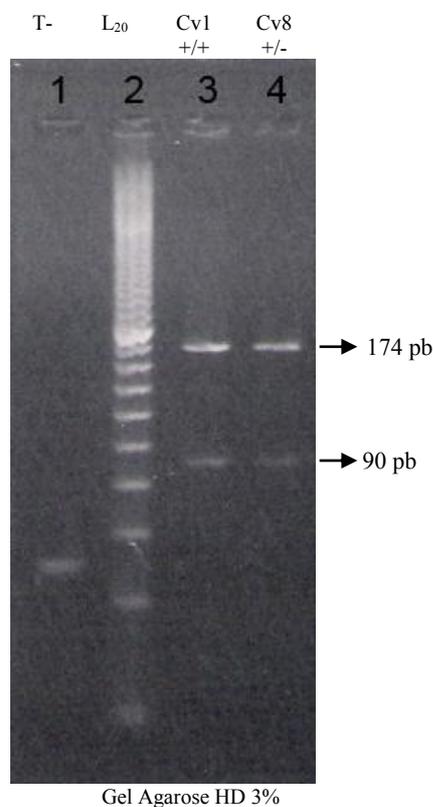
A 60°C, le signal est présent chez les deux chevaux à $[MgCl_2]= 2$ mM et 1,5 mM. Par contre, l'intensité du signal est plus importante chez l'hétérozygote.

A 61°C, dans toute la gamme de concentration en $MgCl_2$, le signal est visible pour les deux chevaux et plus intense pour l'homozygote à $[MgCl_2]= 1,5$ mM et 1 mM.

A 62°C et $[MgCl_2]= 2$ mM, on perd tout signal chez les deux chevaux.

f. Amorces LWF-s3/LWF-as2/LWF-as6

La combinaison d'amorces LWF-s3/LWF-as2/LWF-as6 permet d'amplifier deux fragments : un de 174 pb et un de 90 pb chez les chevaux homozygotes ainsi que chez les hétérozygotes. Pour réaliser cette PCR, les chevaux 1 et 8 ont été utilisés.



Conditions expérimentales : Température d'hybridation de 58°C.

$[MgCl_2]=1,5\text{ mM}$

Concentration en amorces de 0,4 μM

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^\circ\text{C}-5\text{s}; 58^\circ\text{C}-10\text{s}; 72^\circ\text{C}-30\text{s}}{35\text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

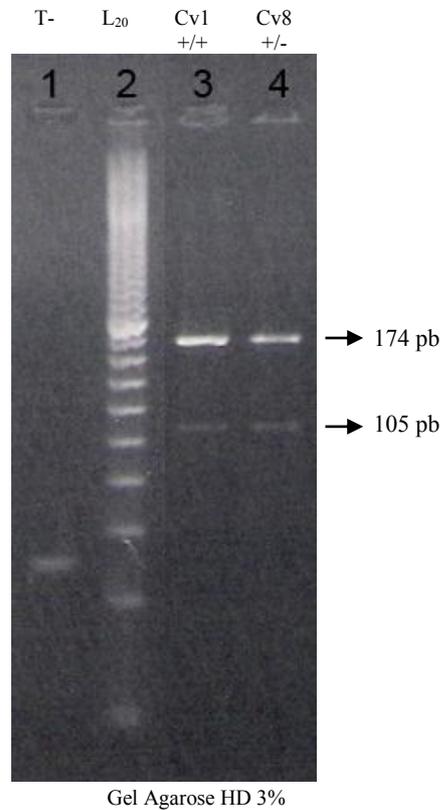
+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

Figure 40 : Résultat de la PCR avec les amorces LWF-s3/LWF-as2/LWF-as6

Le fragment à 174 pb est bien présent chez les deux chevaux mais plus intense chez l'homozygote. Le fragment à 90 pb est lui aussi présent chez les deux chevaux mais de plus faible intensité.

g. Amorces LWF-s3/LWFm-s5/LWF-as2

La combinaison d'amorces LWF-s3/LWFm-s5/LWF-as2 permet d'amplifier un fragment à 174 pb chez l'homozygote et l'hétérozygote et un fragment à 105 pb chez l'hétérozygote uniquement.



Conditions expérimentales : Température d'hybridation de 58°C.

$[MgCl_2]=1,5\text{ mM}$

Concentration en amorces de 0,4 μM

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^\circ\text{C}-5\text{s}; 58^\circ\text{C}-10\text{s}; 72^\circ\text{C}-30\text{s}}{35\text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

Figure 41 : Résultat de la PCR avec les amorces LWF-s3/LWFm-s5/LWF-as2

Le fragment à 174 pb est bien visible pour les deux chevaux mais plus intense chez l'homozygote. Le fragment à 105 pb est présent chez l'hétérozygote mais aussi chez l'homozygote.

h. Amorces LWF-s3/LWFm-s5/LWF-as2/LWF-as6

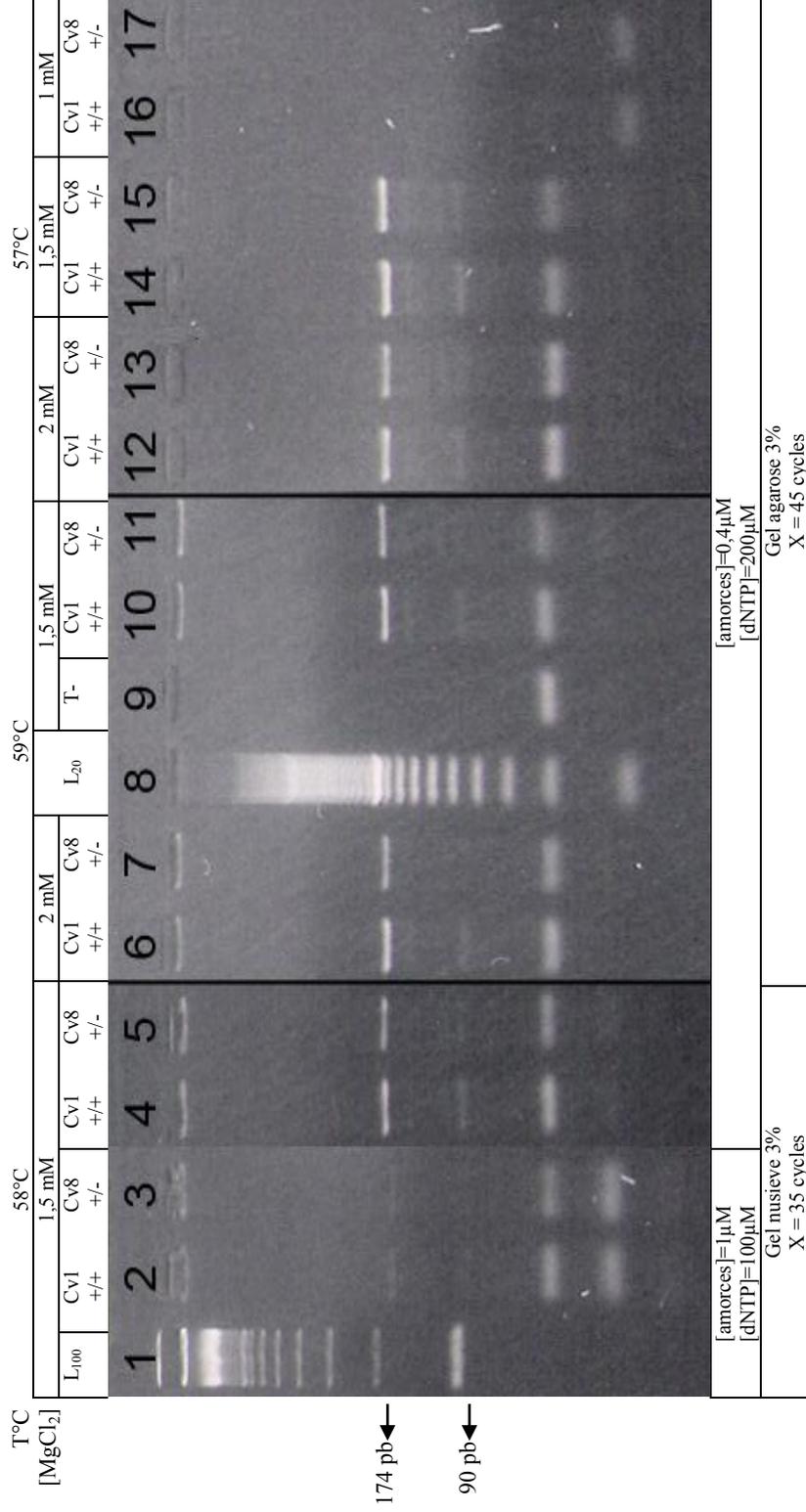
La combinaison d'amorces LWF-s3/LWFm-s5/LWF-as2/LWF-as6 est la combinaison d'amorces décrite dans l'article de Metallinos (METALLINOS, et al., 1998) pour le test du syndrome léthal du poulain blanc. La PCR telle qu'elle est décrite dans les conditions de l'article a été réalisée ainsi que d'autres PCR utilisant la même combinaison d'amorces mais des conditions expérimentales différentes. Pour ces PCR, les chevaux 1 (homozygote sain) et 8 (hétérozygote) ont été utilisés. Les fragments attendus sont un fragment à 174 pb et un à 90 pb chez l'homozygote sain et les mêmes fragments plus un à 105 pb chez l'hétérozygote (Figure 42).

Dans les conditions de l'article ([amorces]=1 μ M ; [dNTP]=100 μ M ; [MgCl₂]=1,5mM ; T°C=58°C), pour les deux chevaux, on a un fragment à 174 pb mais le signal est faible. Les autres fragments attendus (90 pb chez les deux chevaux et 105 pb chez l'hétérozygote) sont absents. Par contre, on a des fragments bien visibles pour les deux chevaux aux alentours de 20 et 40 pb : ces fragments correspondent aux amorces.

Avec les conditions plus habituelles du laboratoire ([amorces]=0,4 μ M ; [dNTP]=200 μ M) et en conservant les autres conditions de l'article, le fragment à 174 pb est bien visible chez les deux chevaux. Le fragment à 90 pb est visible, mais faiblement, chez le cheval homozygote et très faiblement chez l'hétérozygote. Le signal du fragment à 105 pb est extrêmement faible sur le gel et non visible sur la photographie.

A 59°C et 45 cycles de PCR, chez l'homozygote, que ce soit à [MgCl₂]=1,5mM ou 2mM, les fragments à 174 pb et 90 pb sont visibles mais celui à 90 pb est faible. Un fragment non spécifique apparaît vers 160 pb. Chez l'hétérozygote, à [MgCl₂]=2mM, seul le fragment à 174 pb est présent et, à [MgCl₂]=1,5mM, on a, en plus du fragment en 174 pb, les fragments à 105 et 90 pb mais de très faible intensité.

A 57°C et toujours 45 cycles de PCR, on obtient, chez l'homozygote, des fragments à 174 et 90 pb visibles (90 pb faible) pour des [MgCl₂]=1,5 et 2mM. A 1,5 mM, une bande non spécifique à 160 pb apparaît. Chez l'hétérozygote, à [MgCl₂]=2mM, les trois fragments sont présents mais ceux à 105 et 90 pb sont très faibles. A [MgCl₂]=1,5mM, les trois fragments sont à nouveau présents (105 et 90 pb toujours faibles) et une bande non spécifique apparaît à 160 pb. Pour une [MgCl₂]=1mM, aucun signal n'est visible chez les deux chevaux.



Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-5\text{s} ; 72^{\circ}\text{C}-10\text{s} ; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{X \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

L₁₀₀ : ladder 100

Cv1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

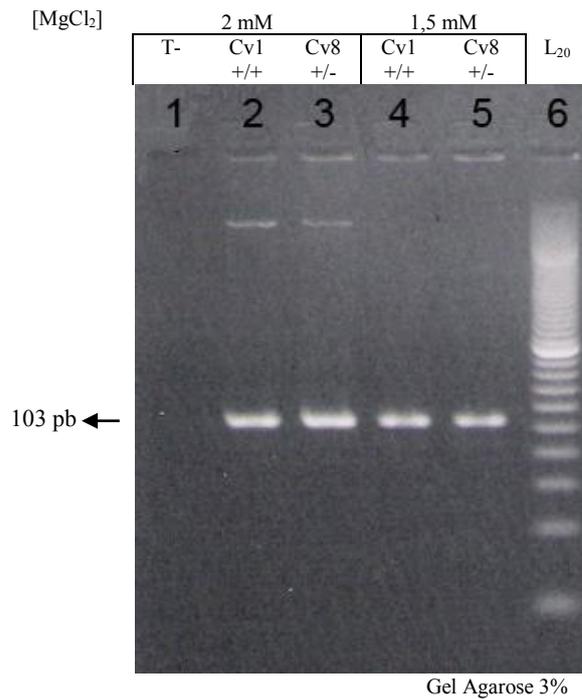
Figure 42 : Résultats des PCR avec les amorces LWF-s3/LWFM-s5/LWF-as2/LWF-as6

2. Avec les amorces créées

Les amorces créées sont deux amorces sens spécifiques de l'allèle muté (LWFm-s7 et LWFm-s9) et une amorce anti-sens non spécifique d'allèle (LWF-as4). Elles ont été utilisées en combinaison avec des amorces publiées dans l'article de Metallinos (METALLINOS, et al., 1998). Les chevaux 1 (homozygote sain) et 8 (hétérozygote) ont été utilisés pour ces PCR

a. Avec les amorces LWFm-s7/LWF-as2

Le fragment attendu est un fragment à 103 pb chez l'hétérozygote uniquement.



Conditions expérimentales : Température d'hybridation de 60°C.

[MgCl₂] : Concentration en MgCl₂

Concentration en amorces de 0,4 μM

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-5\text{s}; 60^{\circ}\text{C}-10\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

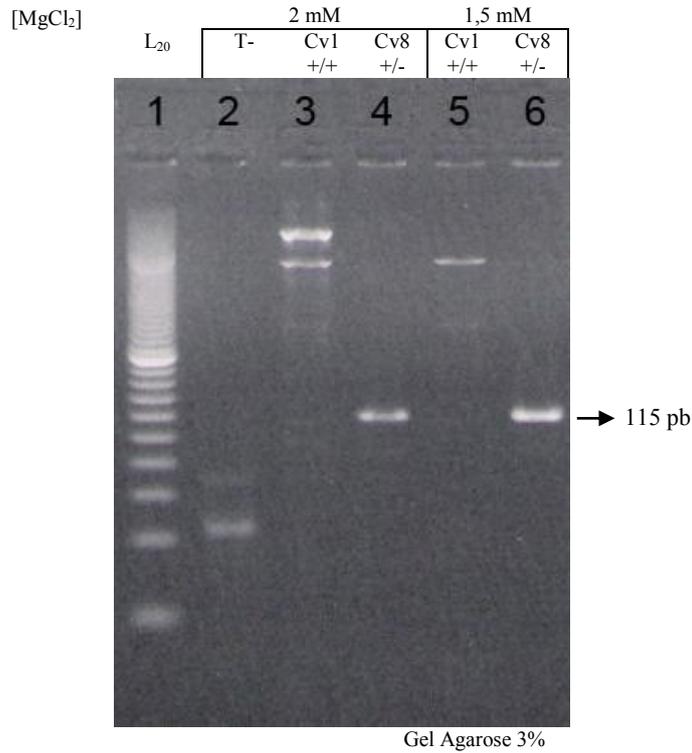
+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

Figure 43 : Résultat de la PCR avec les amorces LWFm-s7/LWF-as2

Le fragment à 103 pb est présent chez les deux chevaux.

b. Avec les amorces LWFm-s9/LWF-as2

Le fragment attendu est un fragment à 115 pb chez l'hétérozygote uniquement.



Conditions expérimentales : Température d'hybridation de 60°C.

[MgCl₂] : Concentration en MgCl₂

Concentration en amorces de 0,4 μM

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-5\text{s}; 60^{\circ}\text{C}-10\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

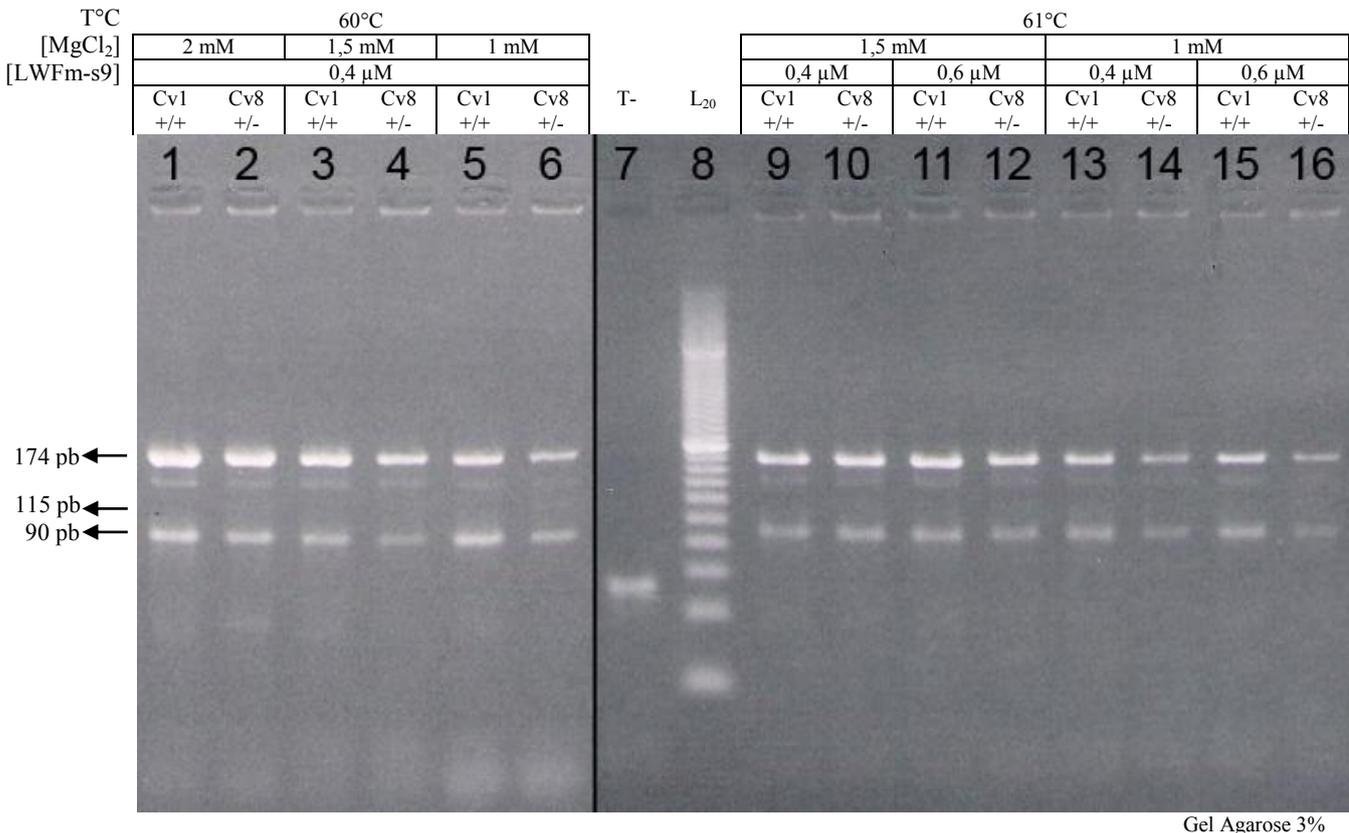
Figure 44 : Résultat de la PCR avec les amorces LWFm-s9/LWF-as2

Le signal à 115 pb est présent chez l'hétérozygote et absent chez l'homozygote sain.

c. Avec les amorces LWF-s3/LWFm-s9/LWF-as2/LWF-as6

Les fragments attendus sont un fragment à 174 pb et un à 90 pb chez les deux chevaux ainsi qu'un fragment à 115 pb chez l'hétérozygote uniquement.

- Avec le cycle $94^{\circ}\text{C} - 3\text{min}$; $\frac{94^{\circ}\text{C}-5\text{s}; T^{\circ}\text{C}-10\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; $72^{\circ}\text{C} - 10\text{min}$; $8^{\circ}\text{C} - \infty$



Conditions expérimentales : Concentration en amorces (autres que LWFm-s9) de 0,4 μM

Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

T°C : Température d'hybridation

[MgCl₂] : Concentration en MgCl₂

Figure 45 : Résultats des PCR avec les amorces LWF-s3/LWFm-s9/LWF-as2/LWF-as6

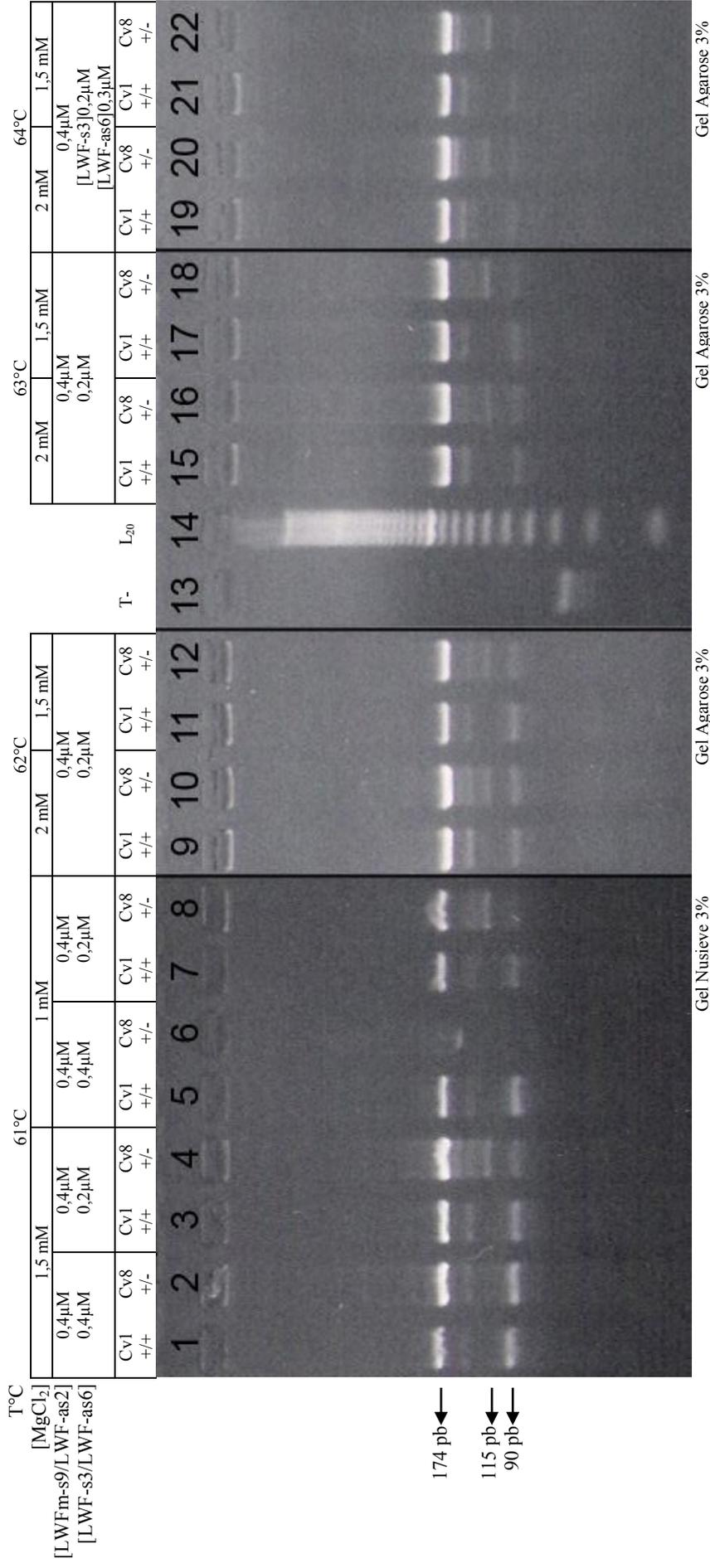
avec amplification : $94^{\circ}\text{C} - 3\text{min}$; $\frac{94^{\circ}\text{C}-5\text{s}; T^{\circ}\text{C}-10\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; $72^{\circ}\text{C} - 10\text{min}$; $8^{\circ}\text{C} - \infty$

A 60°C, pour les trois concentrations en MgCl₂, on a bien les deux fragments à 174 et 90 pb pour les deux chevaux. Le fragment à 115 pb est perceptible chez l'hétérozygote à

[MgCl₂]=1mM. Un fragment non spécifique vers 140 pb apparaît pour toutes les concentrations en MgCl₂ chez les deux chevaux.

A 61°C, pour les deux concentrations en MgCl₂ et pour [LWFm-s9]=0,4 ou 0,6µM, on obtient bien les fragments à 174 et 90 pb chez les deux chevaux. L'augmentation de température et de [LWFm-s9] ne favorise pas le fragment à 115 pb qui est toujours absent à 61°C. Le fragment non spécifique vers 140 pb est toujours présent dans toutes les conditions de [MgCl₂] et de [LWFm-s9] chez les deux chevaux.

- Avec le cycle 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-10\text{s}; T^{\circ}\text{C}-20\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-40\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞



Légende: T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

T°C : Température d'hybridation

[MgCl₂] : Concentration en MgCl₂

Figure 46 : Résultats des PCR avec les amorces LWFF-s3/LWFFm-s9/LWFF-as2/LWFF-as6 avec

amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^\circ\text{C}-10\text{s}}{45\text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

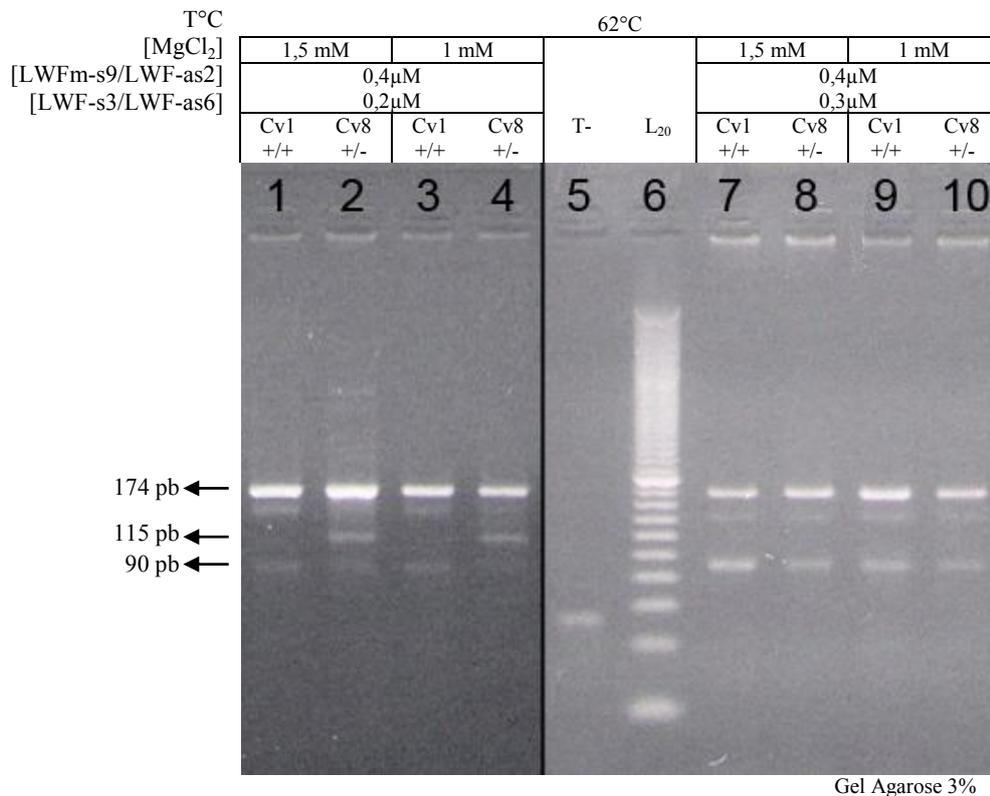
A 61°C et $[MgCl_2]=1,5mM$, les fragments à 174 et 90 pb sont présents chez les deux chevaux. Le fragment à 115 pb est absent, chez les deux chevaux, lorsque les amorces ont toutes une concentration identique ($0,4\mu M$) et apparaît, seulement chez l'hétérozygote, quand on double la concentration en amorces LWFm-s9/LWF-as2 ($0,4\mu M$) par rapport à la concentration en amorces LWF-s3/LWF-as6 ($0,2\mu M$) mais de nombreuses bandes non spécifiques apparaissent. Pour $[MgCl_2]=1mM$, on n'a pas eu d'amplification pour le cheval 8 lorsque les concentrations en amorces sont toutes identiques (colonne 6 du gel de la Figure 46). La bande à 174 pb est bien visible dans tous les autres cas. Par contre, la bande à 90 pb, elle, s'atténue lorsque la concentration en amorces LWFm-s9/LWF-as2 est doublée. Pour le fragment à 115 pb, il est visible lorsque la concentration en amorces LWFm-s9/LWF-as2 est le double de la concentration en LWF-s3/LWF-as6.

A 62°C, $[LWFm-s9/LWF-as2]=0,4\mu M$ et $[LWF-s3/LWF-as6]=0,2\mu M$, les fragments à 174 pb sont bien visibles. Ceux à 90 pb sont bien visibles pour $[MgCl_2]=2mM$ mais sont atténués pour $[MgCl_2]=1,5mM$. Le fragment à 115 pb est visible dans les deux cas chez l'hétérozygote et surtout à $[MgCl_2]=2mM$. Des bandes non spécifiques sont présentes chez les deux chevaux, principalement à $[MgCl_2]=2mM$.

A 63°C, $[LWFm-s9/LWF-as2]=0,4\mu M$ et $[LWF-s3/LWF-as6]=0,2\mu M$, le fragment à 174 pb est toujours bien visible dans tous les cas. Pour $[MgCl_2]=2mM$, le fragment à 90 pb est visible et celui à 115 pb est faiblement visible chez l'hétérozygote. Pour $[MgCl_2]=1,5mM$, le fragment à 115 pb est renforcé chez l'hétérozygote mais on perd en intensité pour le fragment à 90 pb. On a toujours apparition de bandes non spécifiques.

A 64°C, $[LWFm-s9/LWF-as2]=0,4\mu M$, $[LWF-s3]=0,2 \mu M$ et $[LWF-as6]=0,3\mu M$, la bande à 174 pb est toujours très visible et celle à 90 pb, par contre, est très faible. La bande à 115 pb est renforcée, surtout pour $[MgCl_2]=1,5mM$. D'autres bandes non spécifiques apparaissent en plus de celles visibles à 63°C.

- Avec le cycle $94^{\circ}\text{C} - 3\text{min}$; $\frac{94^{\circ}\text{C}-10\text{s}; T^{\circ}\text{C}-20\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; $72^{\circ}\text{C} - 10\text{min}$; $8^{\circ}\text{C} - \infty$



Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

T°C : Température d'hybridation

[MgCl₂] : Concentration en MgCl₂

Figure 47 : Résultats des PCR avec les amorces LWF-s3/LWFm-s9/LWF-as2/LWF-as6

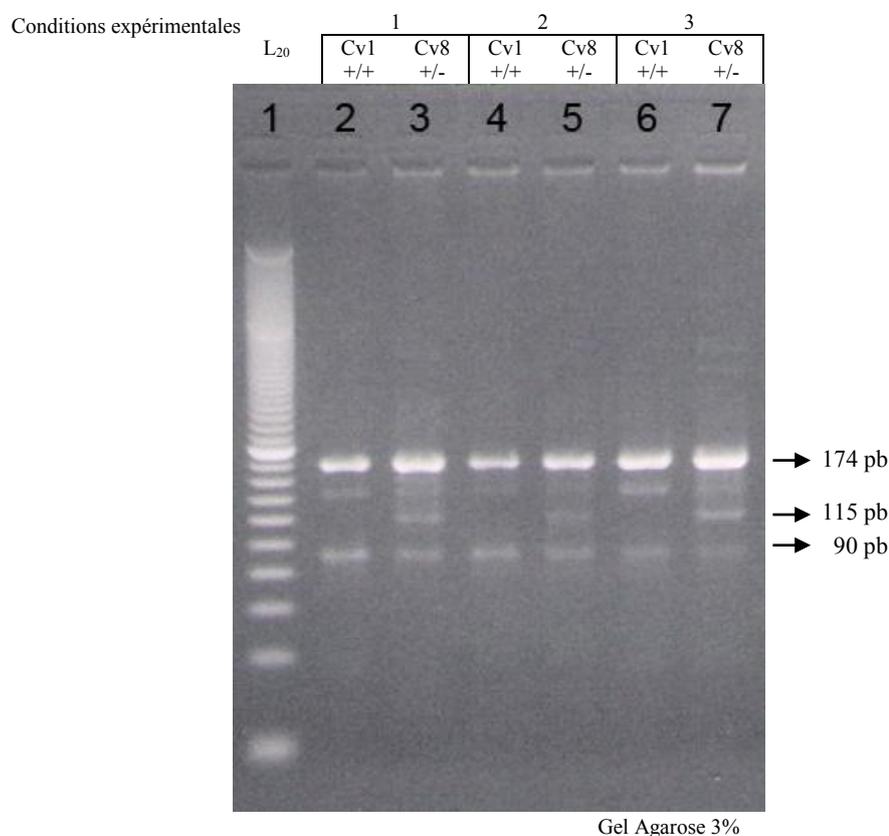
avec amplification : $94^{\circ}\text{C} - 3\text{min}$; $\frac{94^{\circ}\text{C}-10\text{s}; T^{\circ}\text{C}-20\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; $72^{\circ}\text{C} - 10\text{min}$; $8^{\circ}\text{C} - \infty$

A 62°C , [LWFm-s9/LWF-as2]= $0,4\mu\text{M}$ et [LWF-s3/LWF-as6]= $0,2\mu\text{M}$, on voit très bien le fragment à 174pb. Le fragment à 90 pb est visible pour [MgCl₂]= $1,5\text{mM}$ mais faible et on le perd chez l'hétérozygote pour [MgCl₂]= 1mM . Le fragment à 115 pb est bien visible pour les deux concentrations en MgCl₂. On a cependant plus de bandes non spécifiques pour [MgCl₂]= $1,5\text{mM}$.

A 62°C , [LWFm-s9/LWF-as2]= $0,4\mu\text{M}$ et [LWF-s3/LWF-as6]= $0,3\mu\text{M}$, la bande à 90 pb est bien visible dans tous les cas mais on perd complètement le signal à 115 pb chez l'hétérozygote.

3. Choix des conditions finales du test

Pour effectuer le choix des conditions finales du test, une PCR comparative des meilleurs résultats obtenus a été réalisée.



Conditions expérimentales :

Température d'hybridation (T°C)

Temps d'élongation (X)

[MgCl₂]

[LWFm-s9/LWF-as2]

[LWF-s3/LWF-as6]

1	2	3
61°C	62°C	62°C
30 s	40 s	30 s
1,5 mM		
0,4 μM		
0,2 μM		

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-10\text{s}; T^{\circ}\text{C}-20\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-X\text{s}}{45\text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : L₂₀ : ladder 20

Cv 1 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1 et 8

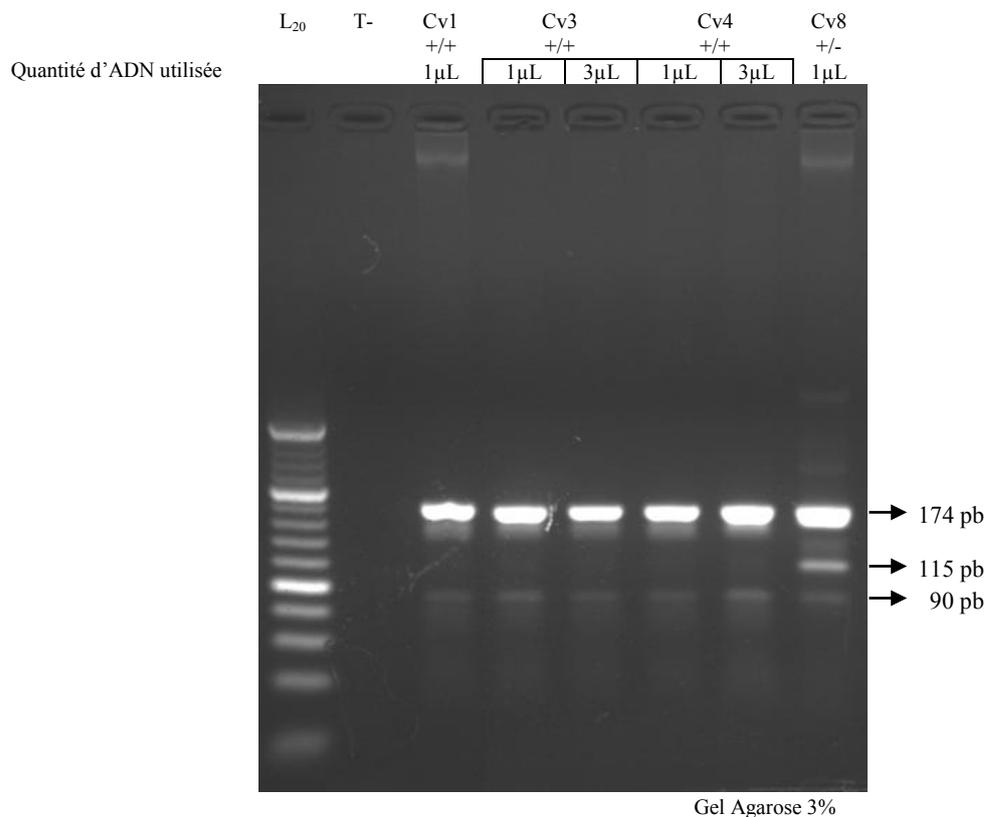
+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

Figure 48 : Résultat de la PCR de choix des conditions finales du test de diagnostic du syndrome léthal du poulain blanc

Les conditions retenues pour le test sont les conditions 1 (colonnes 2 et 3 de laFigure 48) : [LWFm-s9/LWF-as2]=0,4μM, [LWF-s3/LWF-as6]=0,2μM, [MgCl₂]=1,5mM, cycle d'amplification 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-10\text{s}; 60^{\circ}\text{C}-20\text{s}; 72^{\circ}\text{C}-30\text{s}}{45\text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞.

4. Application des conditions finales sur les extraits d'ADN issus des échantillons de crins

Les conditions finales du test sont appliquées aux extraits d'ADN issus des échantillons de crins des chevaux 3 et 4. L'extrait d'ADN du cheval 3 a été obtenu par extraction manuelle et celui du cheval 4 par extraction semi-automatisée. La quantité d'ADN incorporée dans le mélange réactionnel a été de 1µL et 3µL pour les deux chevaux. Ces chevaux sont supposés homozygotes sains donc les fragments attendus sont : un fragment à 174 pb et un fragment à 90 pb pour les deux chevaux.



Conditions expérimentales : température d'hybridation de 61°C

$[MgCl_2]=1,5mM$

$[LWFm-s9/LWF-as2]=0,4\mu M$

$[LWF-s3/LWF-as6]=0,2\mu M$

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^\circ C-10s ; 61^\circ C-20s ; 72^\circ C-30s}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1, 3, 4 et 8 : produits amplifiés des chevaux 1, 3, 4 et 8

+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

Figure 49 : Résultat de la PCR conditions finales appliquée aux extraits d'ADN issus des échantillons de crins

Chez les chevaux 1 et 8 (dont l'extrait d'ADN a été obtenu à partir du sang), le fragment à 174 pb est intense, le fragment à 115 pb est bien visible chez l'hétérozygote (Cv8) et le fragment à 90 pb est de faible intensité.

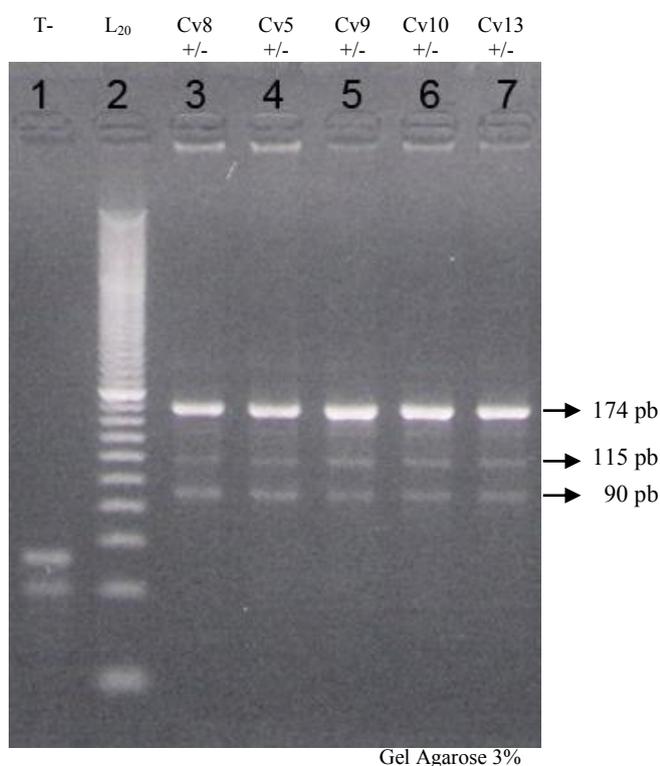
Chez les chevaux 3 et 4 (dont l'ADN a été extrait à partir de crins), le fragment à 174 pb est intense, le fragment à 90 pb est de même intensité que chez les chevaux 1 et 8.

B. Résultats du test sur les autres chevaux

La mise au point du test a été réalisée avec l'utilisation de deux chevaux principalement : le Cv 1, homozygote sain et le Cv 8, hétérozygote. Les conditions retenues ont été appliquées aux autres chevaux hétérozygotes (de statut connu), aux chevaux de statut inconnu, puis à un poulain blanc suspecté d'être atteint du syndrome léthal du poulain blanc et à sa mère.

1. Résultat du test sur les chevaux hétérozygotes

Le test a été réalisé sur tous les chevaux hétérozygotes (statut connu puisqu'ils avaient déjà produit des poulains blancs). Ce sont les chevaux 5, 9, 10 et 13 (voir Tableau XII).



Conditions expérimentales : température d'hybridation de 61°C

$[MgCl_2]=1,5mM$

$[LWFm-s9/LWF-as2]=0,4\mu M$

$[LWF-s3/LWF-as6]=0,2\mu M$

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^\circ C-10s ; 61^\circ C-20s ; 72^\circ C-30s}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 8, 5, 9, 10 et 13 : produits amplifiés des chevaux 8, 5, 9, 10 et 13

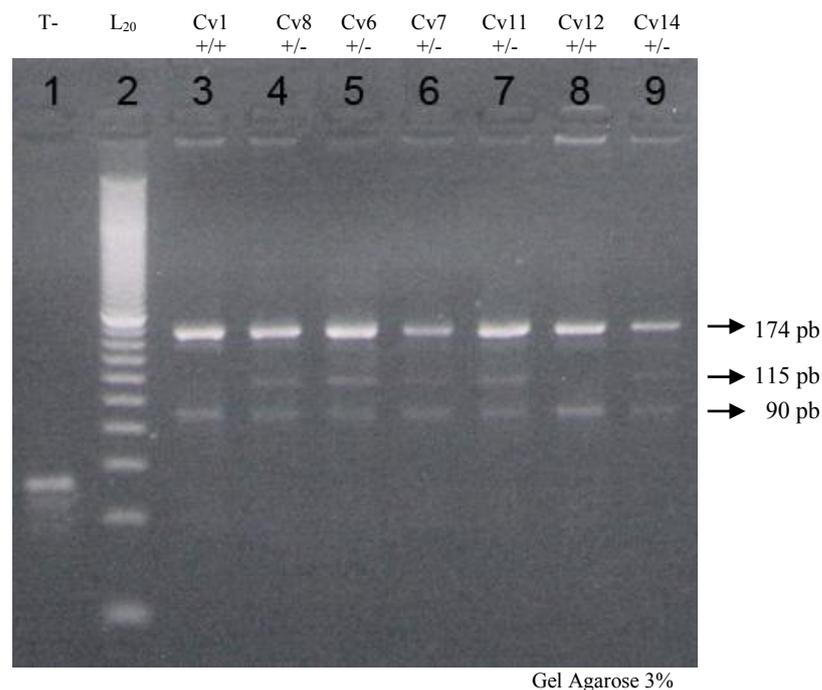
+/- : hétérozygote

Figure 50 : Résultat du test sur les chevaux hétérozygotes

Pour tous les chevaux, on a les fragments à 90, 115 et 174 pb. On a toujours quelques bandes non spécifiques aux alentours de 145 pb mais plus faibles que les signaux recherchés et qui ne gênent en rien la lecture du test.

2. *Résultat du test sur les chevaux de statut inconnu*

Le test a été réalisé sur les chevaux de statut inconnu vis-à-vis du syndrome létal du poulain blanc. Les chevaux utilisés sont les chevaux 6, 7, 11, 12, et 14. Les chevaux 1 et 8 ont été réutilisés pour servir de témoins (homozygote sain et hétérozygote).



Conditions expérimentales : température d'hybridation de 61°C

$[MgCl_2]=1,5mM$

$[LWFm-s9/LWF-as2]=0,4\mu M$

$[LWF-s3/LWF-as6]=0,2\mu M$

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^\circ C-10s ; 61^\circ C-20s ; 72^\circ C-30s}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1, 8, 6, 7, 11, 12 et 14 : produits amplifiés des chevaux 1, 8, 6, 7, 11, 12 et 14

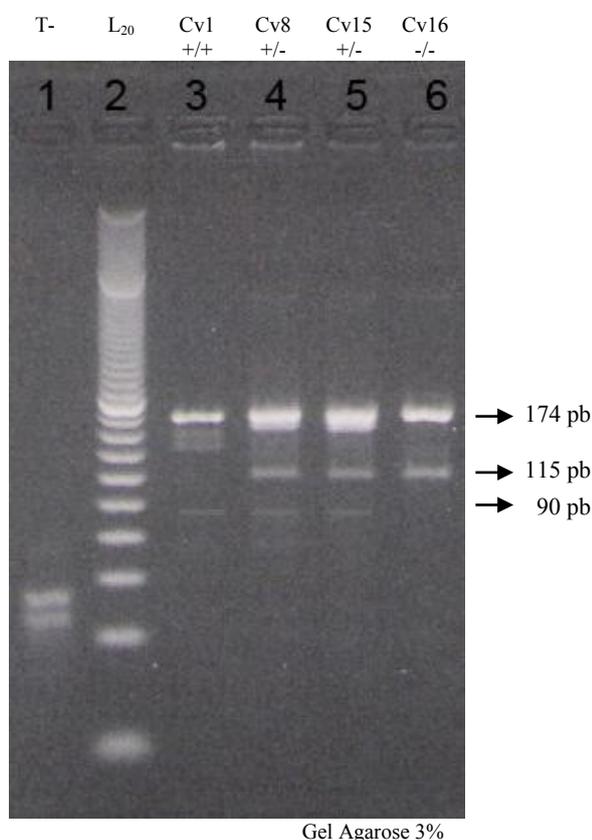
+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

Figure 51 : Résultat du test sur les chevaux de statut inconnu

Le fragment de 174 pb est présent et intense pour tous les échantillons. On voit le fragment à 115 pb chez les chevaux 6, 7, 11 et 14 : ils sont donc hétérozygotes. Pour le cheval 14, par contre, la bande à 115 pb est absente : il est donc homozygote sain.

3. Résultat du test sur le poulain blanc et sa mère

Le test a été réalisé sur un poulain blanc suspecté d'être atteint d'aganglionose du côlon (Cv16) et sur sa mère (Cv15). Les chevaux 1 et 8 ont été réutilisés pour servir de témoin.



Conditions expérimentales : température d'hybridation de 61°C

$[MgCl_2]=1,5mM$

$[LWFm-s9/LWF-as2]=0,4\mu M$

$[LWF-s3/LWF-as6]=0,2\mu M$

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^\circ C-10s ; 61^\circ C-20s ; 72^\circ C-30s}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₂₀ : ladder 20

Cv 1, 8, 6, 7, 11, 12 et 14 : produits amplifiés des chevaux 1, 8, 6, 7, 11, 12 et 14

+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote ; -/- : homozygote malade

Figure 52 : Résultat du test sur le poulain blanc et sa mère

Le fragment à 174 pb est présent chez tous les chevaux. Le fragment à 90 pb est présent chez les chevaux 1, 8 et 15 mais faiblement. Le fragment à 115 pb est présent chez les chevaux 8, 15 et 16 et est plus intense chez le cheval 16 (poulain blanc). Le poulain blanc est

donc bien atteint du syndrome létal du poulain blanc puisqu'il est homozygote muté. La mère du poulain est hétérozygote.

4. Résultats du test après sa commercialisation sur des chevaux de statut inconnu

Les chevaux 17, 18, 19, 20 et 21 ont été testés suite à une demande de leurs propriétaires respectifs. Le volume d'ADN utilisé a été de 1µL dans tous les cas. Le Tableau XIX donne les commémoratifs de chaque cheval ainsi que le résultat du test (photographies des gels non montrées).

Numéro	Sexe	Age	Robe	Résultat du test
Cv17	jument	2 ans	Black overo	Hétérozygote
Cv18	étalon	1 an	Sorrel tovero	Hétérozygote
Cv19	jument	16 ans	Sorrel overo	Hétérozygote
Cv20	étalon	5 ans	Sorrel overo	Hétérozygote
Cv21	étalon	4 ans	Bay tobiano	Homozygote sain

Tableau XIX : Résultats du test après sa commercialisation

CHAPITRE IV : DISCUSSION

A. Le gène ciblé

Le test moléculaire développé dans ce travail a pour but de mettre en évidence une substitution de deux paires de base (353 et 354^{ème} paires de bases) situées dans l'exon I du gène du récepteur aux endothélines de type B. Des études réalisées par plusieurs équipes (METALLINOS, et al., 1998; SANTSCHI, et al., 1998; YANG, et al., 1998) ont montré que cette mutation était à l'origine du syndrome léthal du poulain blanc. Cette mutation, à l'état homozygote, est responsable de la maladie et de la mort du poulain. A l'état hétérozygote, la mutation n'entraîne pas de signes cliniques mais les chevaux sont porteurs. Ce test permet donc à la fois de confirmer un diagnostic de syndrome léthal du poulain blanc et de détecter les animaux porteurs.

B. Matériel

1. *Les animaux*

Pour la mise au point de ce test, 16 chevaux ont été utilisés. Tout d'abord, des chevaux de robe unie et de races où aucun cas de syndrome léthal du poulain blanc n'a été décrit : ils ont servi de témoin homozygote sain pour la mise au point du test. Ensuite, des chevaux hétérozygotes, de statut génétique connu, car ils avaient déjà produit un ou plusieurs poulains blancs. Puis des chevaux « à tester », de race Paint Horse, tous overo et donc susceptibles d'être porteurs de l'allèle muté. Ils ont servi à réaliser le test comme dans des conditions de demande de diagnostic. Enfin, le sang d'un poulain blanc suspect d'être atteint de la maladie ainsi que le sang de sa mère ont été utilisés dans le but de vérifier le bon fonctionnement du test.

Les trois statuts génétiques (homozygote sain, hétérozygote et homozygote malade) ont donc été utilisés, à la fois pour mettre au point le test et vérifier son bon fonctionnement.

Suite à la commercialisation du test, cinq chevaux de statut inconnu ont été testés à la demande de leurs propriétaires.

2. *Les prélèvements*

La majorité des prélèvements étaient du sang car la technique d'extraction d'ADN à partir du sang est une technique bien maîtrisée qui permet d'obtenir une grande quantité d'ADN. De plus, le sang peut être conservé plusieurs mois et être extrait de nouveau en cas de besoin ce qui est nécessaire dans le cadre de la mise au point d'un test diagnostique où l'on utilise de nombreuses fois le même prélèvement.

La réalisation d'un test de dépistage ne nécessite, par contre, qu'une seule (ou deux en cas de problème survenu lors de la manipulation) utilisation du prélèvement. La prise de sang étant un geste invasif, pour l'utilisation du test de diagnostic, il sera possible d'utiliser un autre prélèvement que sont les crins. Cependant, il est utile de rappeler que le prélèvement doit être réalisé en prenant les précautions suivantes : arracher au minimum une cinquantaine de crins, les crins doivent être arrachés avec leur bulbe et il ne doit surtout pas y avoir de mélange de crins de plusieurs chevaux (un prélèvement doit contenir les crins d'un seul cheval). En cas de demande de diagnostic sur plusieurs chevaux, il faut donc faire attention de ne pas mélanger les prélèvements, de les réaliser l'un après l'autre, de veiller à ce que l'opérateur n'ait pas de crins du cheval précédent sur lui qui pourraient contaminer le prélèvement suivant. Les crins sont glissés dans des enveloppes séparées et bien identifiées.

Le test aurait pu être mis au point sur d'autres cellules comme des cellules buccales prélevées à l'aide de cytobrosses. Ce prélèvement ne serait pas plus invasif que l'arrachage de crins et permettrait l'extraction d'une grande quantité d'ADN sans avoir les inconvénients de l'extraction à partir de crins. L'extraction à partir de cellules buccales est bien maîtrisée dans le laboratoire car elle est utilisée en routine pour des tests de diagnostic en espèce canine et féline.

Les crins sont donc faciles à obtenir et permettent de réaliser le dépistage pour un éleveur ou un propriétaire qui voudrait connaître le statut génétique de ses chevaux. Par contre, le test sur sang ou sur cellules buccales est incontournable lorsque l'on veut pouvoir établir une attestation officielle (lors de la vente d'un cheval par exemple) : le vétérinaire doit réaliser le prélèvement lui-même et doit fournir un certificat de prélèvement mentionnant l'identification du cheval prélevé.

On voit que les 2 types de prélèvements (sang et crins) sont envoyés lors des demandes de test par les propriétaires.

C. Méthode

1. *L'extraction d'ADN génomique*

Pour l'extraction d'ADN, trois kits différents ont été utilisés, suivant les prélèvements (sang ou crins) et suivant la méthode d'extraction (manuelle ou semi automatisée).

L'extraction à partir du sang a été réalisée avec une méthode manuelle à l'aide du kit NucleoSpin® Blood Quickpure qui fonctionne très bien et qui est largement utilisée au laboratoire.

L'extraction à partir des crins a, elle, été réalisée grâce à deux méthodes : une manuelle à l'aide du kit Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue et une méthode semi automatisée à l'aide du kit Magnesil Kingfisher genomic system. Les résultats du test PCR sur les ADN issus des deux méthodes d'extraction sur crins (Figure 49) donnent des résultats similaires.

Les deux méthodes nécessitent une pré-lyse d'au moins 12 heures et ont à peu près des durées identiques. En conséquence, la méthode semi-automatisée a été retenue pour l'extraction d'ADN à partir des crins car elle permet l'extraction de plusieurs échantillons à la fois et un moindre temps de présence du manipulateur.

La quantité d'ADN extrait d'un échantillon de sang est supérieure à celle d'un échantillon de crins. La méthode d'extraction à partir du sang ne nécessite que 30 minutes alors que celle sur crins nécessite plus de 12 heures à cause de la pré-lyse. Malgré cela, la méthode sur crins est avantageuse dans le cadre d'un test de dépistage car elle permet une extraction simultanée de plusieurs échantillons et requiert un temps de présence du manipulateur réduit.

2. *L'amplification de l'ADN par PCR*

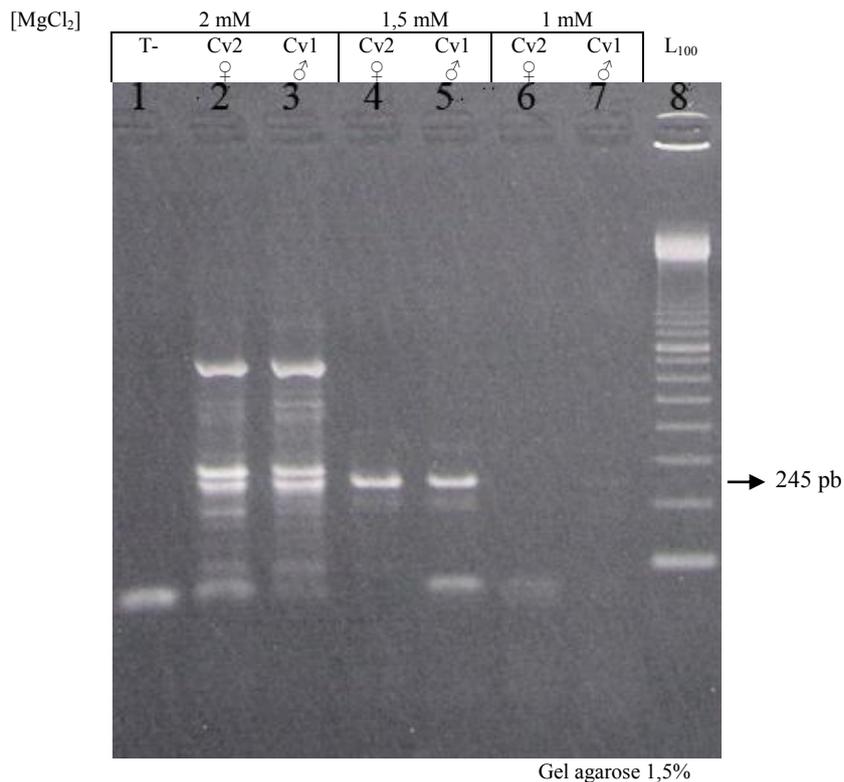
a. Variation de stringence du milieu réactionnel

La stringence est la capacité qu'a un ensemble de conditions d'une réaction à agir sur le processus d'appariement de l'ADN. Si la stringence est élevée, l'appariement de l'ADN est plus difficile. Pour faire varier la stringence, on peut jouer sur deux paramètres : la concentration en $MgCl_2$ et la température d'hybridation.

La concentration en $MgCl_2$ varie lors de la mise au point du test car l'ion Mg^{2+} est nécessaire au bon fonctionnement de la Taq polymérase et à la stabilisation des dNTP. Des gammes de $MgCl_2$ ont donc été réalisées pour pouvoir optimiser les conditions

expérimentales. Les concentrations en $MgCl_2$ utilisées sont de 1 ; 1,5 et 2 mM. Lorsqu'on diminue la concentration en $MgCl_2$, on diminue aussi les possibilités d'appariement non spécifiques donc plus la concentration en $MgCl_2$ est faible et plus la stringence est élevée. En diminuant la concentration en $MgCl_2$, on limite le nombre d'appariements non spécifiques et donc de fragments non spécifiques et on augmente parallèlement les chances de fixation de l'amorce à la séquence ciblée donc on augmente aussi l'intensité du signal voulu. Il est important de noter que l'on ne peut cependant pas travailler à des concentrations en $MgCl_2$ inférieures à 1 mM car à des concentrations aussi basses, l'hybridation spécifique des amorces n'est plus possible : il n'y a donc pas d'amplification et pas de signal.

Sur la Figure 53, sont montrés les effets de la diminution de la concentration en $MgCl_2$: les nombreuses bandes non spécifiques présentes à 2 mM (colonnes 2 et 3) sont éliminées à 1,5 mM et permet de renforcer le signal spécifique. Par contre, à 1 mM, on note une perte totale du signal ce qui signifie que l'hybridation des amorces sur l'ADN n'a pas eu lieu.



Conditions expérimentales : Amorces LWF-s1/LWF-as2

Température d'hybridation de 60°C.

Concentration en amorces de 0,2 µM

Amplification : 94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C}-1\text{min} ; 60^{\circ}\text{C}-1\text{min} ; 72^{\circ}\text{C}-1\text{min}}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞

Légende : T- : témoin négatif

L₁₀₀ : ladder 100

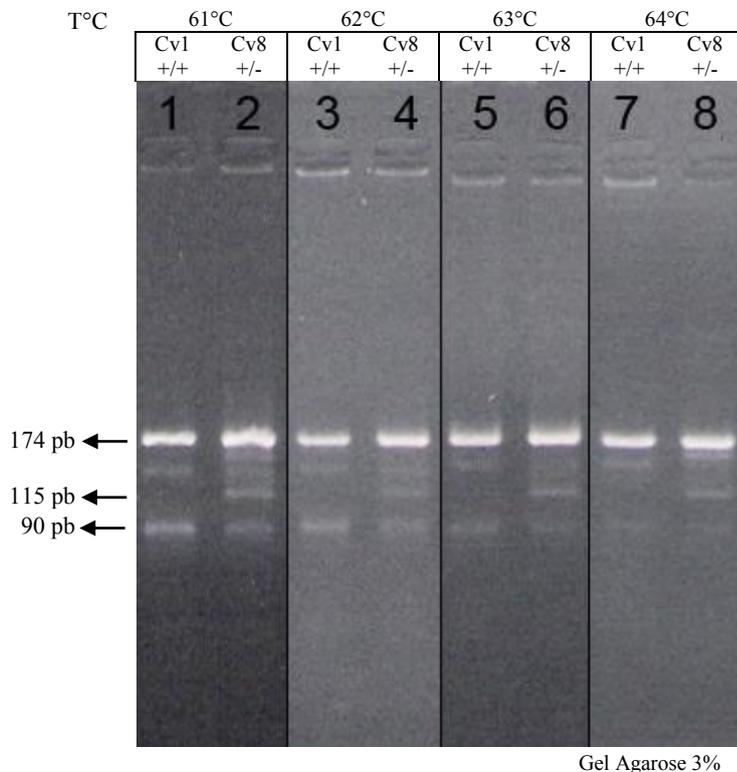
Cv 1 et 2 : ADN des chevaux 1 et 2

♂ : mâle ; ♀ : femelle

Figure 53 : Exemple de l'effet de la diminution de concentration en MgCl₂

L'élévation de température permet aussi d'augmenter la stringence : lorsqu'on augmente la température d'hybridation lors du cycle de PCR, on limite la fixation des amorces sur des fragments qui ne seraient pas complémentaires. La diminution de température permet, à l'inverse, de diminuer la stringence du milieu et donc d'autoriser des fixations sur des segments moins complémentaires de l'ADN. L'augmentation de température permet de renforcer le signal spécifique tout en limitant l'apparition de bandes non spécifiques qui gênent la lecture des gels. Au-delà d'une certaine température, la bande spécifique va diminuer en intensité car le milieu sera devenu trop stringent pour permettre une hybridation même spécifique.

Par exemple, sur la Figure 54, le passage de 61°C à 62°C a pour effet de diminuer la quantité de fragments non spécifiques. Les passages à 63°C puis 64°C ont pour effet de diminuer l'intensité du fragment spécifique à 90 pb.



Conditions expérimentales : $[MgCl_2] = 1,5 \text{ mM}$

$[LWFm-s9/LWF-as2] = 0,4 \mu\text{M}$

$[LWF-s3/LWF-as6] = 0,2 \mu\text{M}$

Cycle d'amplification : $94^\circ\text{C} - 3\text{min}$; $\frac{94^\circ\text{C}-10\text{s} ; T^\circ\text{C}-20\text{s} ; 72^\circ\text{C}-40\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; $72^\circ\text{C} - 10\text{min}$; $8^\circ\text{C} - \infty$

Légende : T°C : Température d'hybridation

Cv 1 et 8 : ADN des chevaux 1 et 8

+/+ : homozygote sain ; +/- : hétérozygote

Figure 54 : Exemple de l'effet de l'augmentation de température

b. Choix des amorces et variation de leurs concentrations

Plusieurs combinaisons d'amorces ont été testées afin d'optimiser les signaux, le plus important étant de favoriser le couple d'amorces mettant en évidence l'allèle muté. Pour cela, le couple LWFm-s5/LWF-as2 a été utilisé mais en vain car on n'a pas réussi, en faisant varier la concentration en $MgCl_2$ et la température, à obtenir un résultat correct permettant de différencier l'homozygote sain de l'hétérozygote. De nouvelles amorces ont donc été créées (LWFm-s7 et LWFm-s9) et ont été testées dans des PCR duplex avec l'amorce LWF-as2. L'amorce LWFm-s9 fonctionne parfaitement alors que l'amorce LWFm-s7 ne permet pas de

différencier l'homozygote sain de l'hétérozygote. En utilisant LWFm-s9/LWF-as2 seuls, le résultat est excellent mais en ajoutant les amorces LWF-s3 et LWF-as6, le signal à 115 pb disparaît. Il fallait alors favoriser le couple LWFm-s9/LWF-as2 car c'est le couple d'amorce qui permet de mettre en évidence l'allèle muté.

Afin de favoriser ce couple, les concentrations en amorces ont varié et ont pris les valeurs de 0,2 μM ; 0,3 μM ; 0,4 μM et 0,6 μM . En augmentant la concentration en LWFm-s9 à 0,6 μM et en laissant celles de LWF-s3, LWF-as2 et LWF-as6 à 0,4 μM , le fragment à 115 pb n'est toujours pas favorisé. Par contre, en diminuant la concentration en LWF-s3 et LWF-as6 à 0,2 μM et en laissant celles de LWFm-s9 et LWF-as2 à 0,4 μM , le signal à 115 pb est visible mais celui à 90 pb est moins marqué. Un essai avec [LWFm-s9/LWF-as2]=0,4 μM , [LWF-as6]=0,3 μM et [LWF-s3]=0,2 μM a été testé mais n'a pas eu d'effet sur l'intensité de la bande à 90 pb et a par contre fait apparaître des bandes non spécifiques.

Les concentrations en amorces ont donc été changées pour favoriser le couple LWFm-s9/LWF-as2 et pour limiter l'apparition de bandes non spécifiques.

Les conditions retenues sont : [LWFm-s9/LWF-as2]=0,4 μM et [LWF-s3/LWF-as6]=0,2 μM .

c. Variation de sensibilité et de spécificité

La sensibilité et la spécificité du test sont à prendre en compte lors de sa mise au point. Une diminution de la sensibilité correspond à une diminution d'intensité du signal attendu alors qu'une diminution de spécificité correspond à l'apparition de fragments non attendus appelés fragments non spécifiques.

La sensibilité d'un test PCR est en théorie excellente puisque l'amplification du fragment cible n'est pas linéaire mais exponentielle. Par exemple, si on a 10 molécules d'ADN dans le mélange réactionnel et que l'on applique 45 cycles d'amplification, on obtient, en théorie, 10^{45} fragments, ce qui est largement suffisant pour le mettre en évidence lors de la révélation. La sensibilité du test est donc liée à la concentration en ADN dans le MIX de PCR. Plus il y a d'ADN au départ et plus le nombre de fragments amplifiés est important. Avec les extraits d'ADN provenant d'échantillons de sang, il n'y a pas de problèmes car la quantité d'ADN extrait est importante. Par contre, avec les crins, la quantité d'ADN extraite est moins importante : il faut donc prendre un nombre de crins suffisant (au moins 50) et, au besoin, augmenter la quantité d'ADN dans le mélange réactionnel (1 à 3 μL).

Ceci n'a pas été nécessaire dans notre test, puisque les signaux étaient aussi marqués en utilisant 1 μ L que 3 μ L (Figure 49).

Un manque de spécificité du test (apparition de fragments non spécifiques) peut avoir plusieurs origines telles que l'hybridation non spécifique des amorces sur une partie du génome non ciblée, l'hybridation des amorces entre elles (dimérisation) ou encore la formation « d'épingles à cheveux » avec un repli de l'amorce sur elle-même. L'utilisation des amorces LWF-s3/LWFm-s9/LWF-as2/LWF-as6 ensemble a fait apparaître un fragment non spécifique vers 140 pb : en faisant varier les conditions expérimentales, l'intensité du signal a été diminuée mais il est toujours légèrement présent dans le test final. Cependant, il ne gêne en aucun cas la lecture du test.

d. Variation des cycles d'amplification

La programmation des cycles a largement varié au cours de la mise au point du test. Les durées des étapes de dénaturation initiale et d'élongation finale sont toujours restées identiques à savoir 3 minutes et 10 minutes. Les durées de dénaturation, hybridation et élongation au cours des cycles ont par contre été modifiées ainsi que le nombre de cycles.

L'augmentation de la durée de dénaturation de 5 à 10 secondes ainsi que de la phase d'hybridation de 10 à 20 secondes a permis une meilleure fixation des amorces sur l'ADN et donc une meilleure amplification des fragments attendus. La durée d'élongation a été fixée à 30 secondes pour le test final ce qui a permis de diminuer l'intensité des bandes non spécifiques qui étaient présentes pour une durée d'élongation de 40 secondes. Le nombre de cycles a aussi été modifié et est passé de 35 à 45 cycles pour favoriser les signaux les plus faibles.

3. La migration et la révélation des produits amplifiés

Trois gels de migration différents ont été testés : Agarose 3%, Agarose HD 3% et Nusieve 3%. Le gel de Nusieve est recommandé pour la migration de petits fragments mais dans notre cas, il n'y avait pas de différence majeure entre les différents gels. Par soucis d'économie, les gels à base d'Agarose ont donc été privilégiés.

D. Résultats

1. *Répétabilité et reproductibilité*

a. Répétabilité

La répétabilité est le paramètre qui permet de retrouver des résultats identiques à ceux obtenus lors de la mise au point en utilisant des extraits d'ADN différents. Dans notre étude, le test a été mis au point à l'aide de l'ADN d'un cheval sain homozygote et d'un cheval hétérozygote. La répétabilité a été évaluée lors du test des autres chevaux hétérozygotes, puis des chevaux de statut inconnu et enfin du poulain blanc et de sa mère. Lors de cette évaluation, nous n'avons pas remarqué de différence importante avec les échantillons ayant servis à la mise au point du test. Seules les intensités des bandes varient légèrement mais les mêmes bandes sont toujours présentes.

b. Reproductibilité

La reproductibilité correspond au fait d'obtenir plusieurs fois les mêmes résultats en utilisant les mêmes conditions expérimentales. Nous avons pu vérifier cette reproductibilité au cours des nombreuses manipulations réalisées au cours de la mise au point du test mais aussi lors de la réalisation du test suite à sa commercialisation.

2. *Sensibilité et spécificité*

La sensibilité correspond à l'intensité des différentes bandes. Pendant la mise au point de notre test, la sensibilité a été variable en fonction des conditions de PCR utilisées (concentration en amorces, température d'hybridation concentration en MgCl₂, type de cycle d'amplification). Le fragment à 174 pb a toujours été bien visible. Par contre, l'obtention du signal à 115 pb qui permet de différencier l'homozygote sain de l'hétérozygote a été plus difficile. Le signal à 90 pb a toujours été bien visible chez les homozygotes sains mais un peu moins chez les hétérozygotes lorsque le fragment à 115 pb était visible. Il a donc fallu faire un compromis entre l'intensité de ces deux fragments, en privilégiant bien sûr le fragment à 115 pb qui nous permet de détecter les hétérozygotes. Dans le test final, le fragment à 90 pb est tout de même visible mais moins que dans certaines autres conditions de PCR.

La spécificité correspond à la fixation correcte des amorces aux endroits attendus. Parfois, les amorces (qui ne sont pas parfaitement complémentaires à la séquence à amplifier) ne se fixent pas aux endroits voulus et il y a alors apparition de fragments « non spécifiques ». Les fragments non spécifiques peuvent aussi être dus à la dimérisation des amorces entre elles

ou à un repli sur elles-mêmes. Lors de la mise au point du test, des bandes non-spécifiques sont apparues. Avec la modification des conditions expérimentales, elles ont presque été toutes effacées sauf une bande vers 140 pb qui persiste mais dont le signal est faible et qui ne gêne en aucun cas la lecture du gel.

E. Proposition d'un test de diagnostic et de dépistage

Afin d'uniformiser les résultats obtenus avec différents chevaux, les conditions du test final sont fixées. Ce test permettra de dépister les porteurs de l'allèle muté responsable du syndrome léthal du poulain blanc et permettra également de confirmer une suspicion clinique de syndrome léthal du poulain blanc.

1. *Détermination des conditions finales du test*

Les conditions finales du test ont été choisies parmi celles qui donnaient les meilleurs résultats. Le test repose sur trois grandes étapes : l'extraction, l'amplification et la révélation des fragments amplifiés. Pour chaque test, on introduit un témoin négatif (qui permet de vérifier qu'il n'y a pas eu de contamination) et des témoins positifs (un cheval sain et un cheval hétérozygote pour contrôler l'amplification). Les conditions du test sont détaillées dans le Tableau XX.

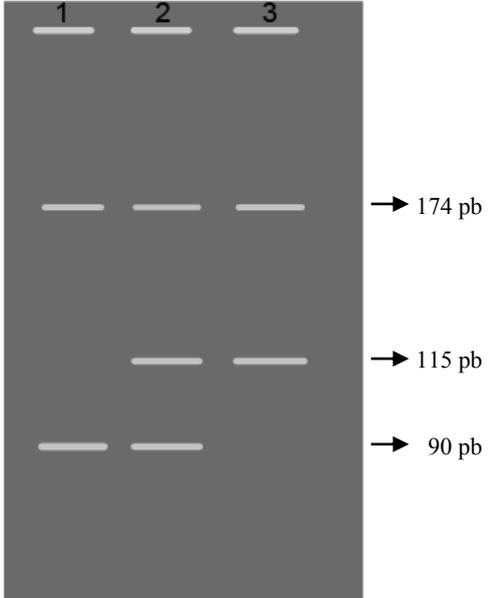
Nature du prélèvement	Sang	Crins
<u>Extraction</u>	Manuelle à l'aide du kit NucleoSpin® Blood Quickpure	Semi-automatisée à l'aide du kit MagneSil® KingFisher, genomic system
<u>Amplification</u>		
Prise d'essai	1 µL	
Tampon 10X	1X	
dNTP 10 mM	200 µM	
[MgCl ₂]	1,5mM	
[LWFm-s9/LWF-as2]	0,4µM	
[LWF-s3/LWF-as6]	0,2µM	
Taq 1U/µL	0,5U/20µL	
Température d'hybridation	61°C	
Cycle thermocycleur	94°C – 3min ; $\frac{94^{\circ}\text{C} - 10\text{s} ; 61^{\circ}\text{C} - 20\text{s} ; 72^{\circ}\text{C} - 30\text{s}}{45 \text{ cycles}}$; 72°C – 10min ; 8°C – ∞	
<u>Migration</u>		
Gel utilisé	Agarose 3% ; TBE (0,5X) ; BET (0,5 µg/mL)	
Tampon de migration	TBE (0,5X) ; BET (0,5 µg/mL)	
Ladder 20 pb	10 µL	
Migration	100 volts, 40 min	
<u>Résultats et interprétation</u>		<p>1 : cheval homozygote sain avec un fragment à 174 pb et un à 90 pb</p> <p>2 : cheval hétérozygote avec un fragment à 174 pb, un à 115 pb et un à 90 pb</p> <p>3 : cheval homozygote muté avec un fragment à 174 pb et un à 115 pb</p>

Tableau XX : Conditions expérimentales du test

2. Commercialisation du test

a. Annonce du lancement du test en France

La commercialisation du test a été décidée après la finalisation de sa mise au point, lorsque le poulain blanc et sa mère ont été testés. Afin d'informer les propriétaires et éleveurs de chevaux susceptibles d'être porteurs de la disponibilité du test en France, les Haras Nationaux ont été contactés dans le but de diffuser l'information auprès des responsables des races Paint Horse, Quarter Horse, Chevaux Crème et Appaloosa. Des éleveurs ont aussi été contactés pour permettre une diffusion plus rapide de l'information. Un court article explicatif leur a été communiqué (Figure 55).

Le syndrome léthal du poulain blanc est une maladie génétique grave présente dans les races Paint Horse et, dans une moindre mesure, Quarter Horse. Elle provoque une aganglionose du côlon qui entraîne des coliques par rétention du méconium et par suite, la mort. Les poulains atteints naissent totalement blancs ou quasiment et présentent des signes de coliques dans les premières heures de leur vie.

Les poulains atteints possèdent le gène muté en double exemplaire et les chevaux porteurs d'un seul exemplaire du gène sont susceptibles de donner naissance à un poulain atteint. Ces chevaux porteurs du gène muté n'ont aucun problème digestif. Ils sont le plus souvent de robe Overo mais on retrouve aussi des chevaux Tovero, Tobiano, et même Solid qui sont porteurs du gène muté.

Compte tenu des conséquences graves, autant économiques que morales, entraînées par cette maladie, il est important de dépister les chevaux de race Paint Horse et Quarter Horse avant de les faire reproduire. Il est aussi indiqué de tester les chevaux Apaloosa et Crème car leur Stud Book est ouvert aux Quarter Horses et donc la transmission du gène peut se faire par ce biais. L'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, en association avec le Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône, a mis au point un test génétique de dépistage de cette maladie.

Grâce à de nouvelles techniques, le test peut être réalisé à partir de crins (bulbes pileux) ou de sang ce qui permet aux éleveurs de réaliser eux-mêmes leurs prélèvements. A partir d'une cinquantaine de crins ou d'un tube de sang, il est possible de connaître le statut génétique de l'animal vis-à-vis de cette maladie et de décider ou non de le faire reproduire.

Si le test vous intéresse, vous pouvez contacter le LVD 69 au (33)/(0)4.78.87.82.04 ou sur son site Internet www.vet-lyon.fr pour connaître les conditions du test, les tarifs et obtenir la fiche de demande de prélèvements.

Figure 55 : Texte d'information sur la disponibilité d'un test « syndrome léthal du poulain blanc » en France

Cette communication a eu l'effet escompté puisque les demandes de test sont arrivées suite à la diffusion de l'information.

b. Document technique de demande d'analyse

Dans le but de développer le test pour le dépistage des animaux porteurs, un document explicatif a été rédigé pour permettre aux vétérinaires, éleveurs mais aussi propriétaires d'envoyer les prélèvements facilement. Ce document est composé de deux pages (Annexe 8 et Annexe 9) : une page nécessaire à la réalisation de l'analyse qui reprend les coordonnées du propriétaire et/ou du vétérinaire, les commémoratifs du cheval à tester ainsi qu'une zone pour la fixation des crins et une deuxième page expliquant la procédure à suivre pour réaliser les prélèvements et leur envoi dans de bonnes conditions.

La réalisation du test sur crins est pratique pour les éleveurs qui souhaitent connaître le statut génétique de leurs reproducteurs afin d'éviter la naissance d'un poulain blanc atteint. Mais ce test sur crins ne peut cependant pas aboutir à l'obtention d'un certificat pour la vente ou la reproduction des chevaux (car les risques de contamination ou d'échanges de crins sont importants). Pour obtenir un tel certificat, il faut que le vétérinaire réalise une prise de sang sur tube EDTA, identifie le tube et remplisse le document d'accompagnement, tout ceci dans le but d'attester de la provenance du prélèvement.

La deuxième page du document donne les explications nécessaires au bon déroulement du prélèvement et de l'envoi.

F. Intérêt du test PCR dans le cadre du syndrome léthal du poulain blanc

L'intérêt de ce test est double : il permet de dépister les chevaux porteurs de l'allèle muté mais aussi de confirmer ou d'infirmer une suspicion de syndrome léthal du poulain blanc.

1. Intérêt en élevage

En élevage, le test peut être utilisé de deux manières. Chez les chevaux Paint Horses overo, où la prévalence de l'allèle muté est importante (95% des chevaux porteurs chez les Frame overo), on réalise le test pour connaître le statut génétique des reproducteurs avant de réaliser la saillie ce qui permet de savoir si un risque est pris ou non. On ne peut malheureusement pas écarter tous les reproducteurs overo porteurs dans cette race là car il ne resterait que trop peu de chevaux à faire reproduire. Cependant, en systématisant le test, on

peut détecter les chevaux overo non porteurs qui seraient donc à privilégier pour la reproduction.

Chez les chevaux Paint Horse d'une autre robe, le test est aussi important à réaliser car il permet de mettre en évidence les chevaux porteurs ce qui permet dans ce cas de l'écarter de la reproduction car la prévalence de l'allèle muté est moins élevée dans ce cas (10% chez les tobiano, 58% chez les tovero et 18% chez les chevaux solid) et on peut ainsi ne faire reproduire que les chevaux non porteurs de l'allèle muté (VROSTOS, et al., 2001).

Chez les Quarter Horses et les chevaux d'origine inconnus ayant des ancêtres Quarter Horse ou Paint Horse, il est aussi très important de réaliser le test au risque de voir naître un poulain blanc atteint. Certes la prévalence de l'allèle muté est dans ce cas très faible mais certains chevaux non Paint Horse avec une robe unie sont porteurs de l'allèle muté. Dans ce cas, il est très facile de retirer ces chevaux de la reproduction puisqu'ils sont peu nombreux. Avant toute saillie, il est donc conseillé de faire le test sur la jument et l'étalon car le poulain blanc prélevé pour la mise au point de notre test était issu d'une mère de robe palomino unie avec des papiers « origine inconnue » qui était porteuse de l'allèle muté.

2. Intérêt en médecine vétérinaire

Le test a aussi son utilité dans le cadre de la médecine vétérinaire, quand un vétérinaire est appelé pour réaliser l'euthanasie d'un poulain blanc nouveau-né. En effet, il ne faut pas réaliser d'emblée l'euthanasie lorsqu'un poulain blanc naît car certains ne sont pas homozygotes pour l'allèle muté. Il faut donc faire la prise de sang pour le diagnostic et attendre les éventuels signes de colique avant de procéder à l'euthanasie.

3. Perspectives

Le test de dépistage du syndrome léthal du poulain blanc est très demandé par les propriétaires et éleveurs de Paint Horses. D'autres tests génétiques sont aussi demandés concomitamment aux Etats Unis : il s'agit du test HYPP (test de la paralysie périodique hyperkaliémique du Quarter Horse), du test Tobiano et du test des gènes responsables des couleurs (gène noir et rouge). Le test HYPP est déjà disponible au LVD 69. Il resterait à développer les deux autres tests basés sur la robe (Tobiano et couleurs) pour pouvoir proposer le même panel de tests qu'aux Etats-Unis, tests réalisables sur les Paint Horses et Quarter Horses.

CONCLUSION

La motricité intestinale est assurée par les cellules nerveuses des plexus de Meisner et d'Auerbach, lesquelles sont issues de la crête neurale embryonnaire. La crête neurale est aussi à l'origine d'autres cellules comme les cellules pigmentaires de la peau. De nombreuses molécules sont mises en jeu pour assurer le développement normal de la crête neurale dont le récepteur aux endothélines de type B. Une mutation sur le gène codant pour ce récepteur entraîne donc une modification de sa conformation ce qui le rend non fonctionnel. C'est ce qui se passe chez les poulains atteints du syndrome létal du poulain blanc et chez certains humains atteints de syndrome de Shah-Waardenburg : ces maladies associent une aganglionose du côlon, des défauts de pigmentation de la peau et une surdité partielle ou totale.

Le syndrome létal du poulain blanc est donc une maladie génétique grave, décrite pour la première fois en 1977 par Trommershausen-Smith, qui, par l'absence de motricité du côlon, entraîne des coliques puis la mort du poulain dans les 48h suivant sa naissance. Le gène mis en cause dans ce syndrome est celui du récepteur aux endothélines de type B sur lequel on retrouve une transversion TC→AG en position 353 et 354. Le changement d'un acide aminé dans la séquence de ce récepteur entraîne une perte de sa fonction. Il faut donc éviter à tout prix la naissance de ces poulains blancs en testant les reproducteurs. L'idée importante à retenir de cette étude est que le phénotype et le génotype ne sont pas parfaitement reliés. Il faut donc tester à la fois les Paint Horses overo mais aussi les Paint Horses ayant une autre robe ainsi que les Quarter Horses qui peuvent aussi être porteurs de l'allèle muté. Des individus d'autres races peuvent aussi être porteurs comme les Chevaux Crème ou les Appaloosa dont les livres sont ouverts aux Quarter Horses mais aussi des animaux n'appartenant pas à une race en particulier dits « origine inconnue » qui peuvent avoir des représentants des races Paint Horse ou Quarter Horse dans leur généalogie.

La disponibilité du test génétique en France répond à une demande accrue des propriétaires de chevaux susceptibles d'être porteurs. Le nombre de ces chevaux a énormément augmenté ces dernières années en France et va encore augmenter dans les années à venir si l'on se réfère à la tendance actuelle. Le test PCR mis au point au Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône est un test fiable qui permet de connaître le statut génétique des chevaux vis-à-vis de l'allèle muté en vue de reproduction ou pour la réalisation de certificats lors de vente de chevaux.

Le Professeur responsable de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Lyon

Pr F. GRAIN

Vu :

Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Lyon

Docteur S. Martinot

Le Président de la thèse

Pr F. Grain CALENDRI
Unité de Génétique
Fav. - Hôpital Ed. Herriot
69437 LYON Cedex 03

Vu et permis d'imprimer

Par délégation
Pr F. Grain - DEVE

VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

Lyon, le 30 MARS 2010

Pour le président de l'Université

Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales
Professeur F.N. GILLY



BIBLIOGRAPHIE

AMIEL, J, et al. 2008. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics : a review. *J Med Genet.* 2008, Vol. 45, 1, pp. 1-14.

ANON. 2002. All-white overo cheats death. *J. equine vet. Sci.* 2002, Vol. 22, 10, pp. 447-448.

ARAI, H, et al. 1993. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem.* 1993, Vol. 268, 5, pp. 3463-3470.

ATTIE, T, et al. 1995. Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet.* 1995, Vol. 4, 8, pp. 1381-1386.

AURICCHIO, A, et al. 1996. Endothelin-B receptor mutations in patients with isolated Hirschsprung disease from a non-inbred population. *Hum Mol Genet.* 1996, Vol. 5, 3, pp. 351-354.

AURICCHIO, A, et al. 1999. Double heterozygosity for a RET substitution interfering with splicing and an EDNRB missense mutation in Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet.* 1999, Vol. 64, pp. 1216-1221.

BARLOW, A, DE GRAAF, E et PACHNIS, V. 2003. Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron.* 2003, Vol. 40, 5, pp. 905-916.

BAYNASH, AG, et al. 1994. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell.* 1994, Vol. 79, pp. 1277-1285.

BIDAUD, C, et al. 1997. Mutations du gène de l'endothéline 3 dans des formes isolées et syndromiques de la maladie de Hirschsprung. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.* 1997, Vol. 21, 8-9, pp. 548-554.

BIELSCHOWSKY, M et SCHOFIELD, GC. 1962. Studies on megacolon in piebald mice. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1962, Vol. 62, pp. 395-404.

BOLK, S, et al. 2000. A human model for multigenic inheritance: phenotypic expression in Hirschsprung disease requires both the RET gene and a new 9q31 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, Vol. 97, 1, pp. 268-273.

BONDURAND, N, et al. 1999. A molecular analysis of the yemenite deaf-blind hypopigmentation syndrome: SOX10 dysfunction causes different neurocristopathies. *Hum Mol Genet.* 1999, Vol. 8, 9, pp. 1785-1789.

BONDURAND, N, et al. 2007. Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. *Am J Hum Genet.* 2007, Vol. 81, 6, pp. 1169-1185.

BORGHINI, S, et al. 2002. Hirschsprung associated GDNF mutations do not prevent RET activation. *Eur J Hum Genet.* 2002, Vol. 10, 3, pp. 183-187.

BORREGO, S, et al. 1999. Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet.* 1999, Vol. 36, 10, pp. 771-774.

BRIZZOLARA, A, et al. 2004. Histochemical study of Dom mouse: A model for Waardenburg-Hirschsprung's phenotype. *J Pediatr Surg.* 2004, Vol. 39, 7, pp. 1098-1103.

BURZYNSKI, GM, et al. 2004. Localizing a putative mutation as the major contributor to the development of sporadic Hirschsprung disease to the RET genomic sequence between the promoter region and exon 2. *Eur J Hum Genet.* 2004, Vol. 12, 8, pp. 602-612.

CECCHERINI, I, et al. 1993. Exon structure and flanking intronic sequences of the human RET proto-oncogene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993, Vol. 193, 3, pp. 1288-1295.

CECCHERINI, I, et al. 1995. Interstitial deletion of the endothelin-B receptor gene in the spotting lethal (sl) rat. *Hum Mol Genet.* 1995, Vol. 4, 11, pp. 2089-2096.

DE GRAAFF, E, et al. 2001. Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes dev.* 15 Sept 2001, Vol. 15, 18, pp. 2433-2444.

DEMBOWSKI, C, et al. 2000. Phenotype, intestinal morphology, and survival of homozygous and heterozygous endothelin B receptor--deficient (spotting lethal) rats. *J Pediatr Surg.* 2000, Vol. 35, 3, pp. 480-488.

DEOL, MS. 1967. The neural crest and the acoustic ganglion. *J Embryol Exp Morphol.* 1967, Vol. 17, 3, pp. 533-541.

DEOL, MS. 1971. Spotting genes and internal pigmentation patterns in the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 1971, Vol. 26, 1, pp. 123-133.

DURBEC, P, et al. 1996. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature.* 1996, Vol. 381, 6585, pp. 789-793.

EDERY, P, et al. 1996. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet.* 1996, Vol. 12, pp. 442-444.

EHRENREICH, H, et al. 1999. Endothelin B receptor-deficient rats as a subtraction model to study the cerebral endothelin system. *Neuroscience.* 1999, Vol. 91, 3, pp. 1067-1075.

EKETJALL, S et IBANEZ, CF. 2002. Functional characterization of mutations in the GDNF gene of patients with Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet.* 2002, Vol. 11, 3, pp. 325-329.

ENOMOTO, H. 2005. Regulation of neural development by glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands. *Anatomical Science International.* 2005, 80, pp. 42-52.

ETCHEVERS, HC, AMIEL, J et LYONNET, S. 2007. Bases génétiques et moléculaires des neurocristopathies. *Archives de pédiatrie.* 2007, Vol. 14, 6, pp. 668-672.

GABRIEL, SB, et al. 2002. Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat Genet.* 2002, Vol. 31, 1, pp. 89-93.

GARIEPY, CE, CASS, DT et YANAGISAWA, M. 1996. Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, Vol. 93, 2, pp. 867-872.

HARLAND, MM, et al. 2006. Diagnosis of deafness in a horse by brainstem auditory evoked potential. *Can Vet J.* 2006, Vol. 47, 2, pp. 151-154.

HEANUE, TA et PACHNIS, V. 2007. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci.* 2007, Vol. 8, 6, pp. 466-479.

HERBARTH, B, et al. 1998. Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, Vol. 95, 9, pp. 5161-5165.

HOFSTRA, RM, et al. 1996. A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet.* 1996, Vol. 12, 4, pp. 445-447.

HOFSTRA, RM, et al. 1999. A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet.* 1999, Vol. 64, pp. 304-308.

HOSODA, K, et al. 1994. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell.* 1994, Vol. 79, 7, pp. 1267-1276.

HOTTA, R, et al. 2009. Effects of tissue age, presence of neurones and endothelin-3 on the ability of enteric neurone precursors to colonize recipient gut: implications for cell-based therapies. *Neurogastroenterol Motil.* Epub ahead of print, 2009.

HULTGREN, BD. 1982. Ileocolonic aganglionosis in white progeny of overo spotted horses. *J Am Vet Med Assoc.* 1982, Vol. 180, 3, pp. 289-292.

IKADAI, H, et al. 1979. Observation of congenital aganglionosis rat (Hirschsprung's disease rat) and its genetical analysis. *Cong Anom.* 1979, Vol. 19, pp. 31-36.

INOUE, K, et al. 2002. Congenital hypomyelinating neuropathy, central dysmyelination, and Waardenburg-Hirschsprung disease: phenotypes linked by SOX10 mutation. *Ann Neurol.* 2002, Vol. 52, 6, pp. 836-842.

JAIN, S, et al. 2004. Mice expressing a dominant-negative Ret mutation phenocopy human Hirschsprung disease and delineate a direct role of Ret in spermatogenesis. *Development.* Nov 2004, Vol. 131, 21, pp. 5503-5513.

JONES, WE. 1979. The overo white foal syndrome. *J. Equine Med. Surg.* 1979, Vol. 3, pp. 54-56.

KAPUR, RP. 1999. Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos. *Pediatr Dev Pathol.* 1999, Vol. 2, 6, pp. 559-569.

KAPUR, RP, YOST, C et PALMITER, RD. 1992. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development*. 1992, Vol. 116, 1, pp. 167-175.

KAPUR, RP, et al. 1996. Abnormal microenvironmental signals underlie intestinal aganglionosis in Dominant megacolon mutant mice. *Dev Biol*. 1996, Vol. 174, 2, pp. 360-369.

KARACA, I, et al. 2009. Waardenburg syndrome with extended aganglionosis: report of 3 new cases. *J Pediatr Surg*. 2009, Vol. 44, 6, pp. E9-13.

KUHLBRODT, K, et al. 1998. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci*. 1998, Vol. 18, 1, pp. 237-250.

LANE, PW. 1966. Association of megacolon with two recessive spotting genes in the mouse. *J Hered*. 1966, Vol. 57, 1, pp. 29-31.

LANE, PW et LIU, HM. 1984. Association of megacolon with a new dominant spotting gene (Dom) in the mouse. *J Hered*. 1984, Vol. 75, 6, pp. 435-439.

LEE, HO, LEVORSE, JM et SHIN, MK. 2003. The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. *Dev Biol*. 2003, Vol. 259, 1, pp. 162-175.

LIGHTBODY, T. 2002. Foal with Overo lethal white syndrome born to a registered quarter horse mare. *Can Vet J*. 2002, Vol. 43, 9, pp. 715-717.

LOEVEN, K. 1987. Overo crosses and Aganglionosis. *J. Equine Vet. Sci*. 1987, Vol. 7, pp. 249-250.

LYONNET, S, et al. 1993. A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet*. 1993, Vol. 4, 4, pp. 346-350.

MAGDESIAN, KG, et al. 2009. Evaluation of deafness in American Paint Horses by phenotype, brainstem auditory-evoked responses, and endothelin receptor B genotype. *J Am Vet Med Assoc*. 2009, Vol. 235, 10, pp. 1204-1211.

MATERA, I, et al. 2007. A mouse model of Waardenburg syndrome type IV resulting from an ENU-induced mutation in endothelin 3. *Pigment Cell Res*. 2007, Vol. 20, 3, pp. 210-215.

MATSUSHIMA, Y, et al. 2002. A mouse model of Waardenburg syndrome type 4 with a new spontaneous mutation of the endothelin-B receptor gene. *Mamm genome*. 2002, Vol. 13, 1, pp. 30-35.

MC CABE, L, et al. 1990. Overo lethal white foal syndrome: equine model of aganglionic megacolon (Hirschsprung disease). *Am J Med Genet*. 1990, Vol. 36, 3, pp. 336-340.

MCCALLION, AS et CHAKRAVARTI, A. 2001. EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease type II. *Pigment Cell Res*. 2001, Vol. 14, pp. 161-169.

METALLINOS, DL, et al. 1994. Fine structure mapping and deletion analysis of the murine piebald locus. *Genetics*. 1994, Vol. 136, 1, pp. 217-223.

METALLINOS, DL, BOWLING, AT et RINE, J. 1998. A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome : an equine version of Hirschsprung disease. *Mamm. Genome*. 1998, Vol. 9, 6, pp. 426-431.

OKAMOTO, E et UEDA, T. 1967. Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 1967, Vol. 2, pp. 437-443.

PARATORE, C, et al. 2002. Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*. 2002, Vol. 11, 24, pp. 3075-3085.

PAVAN, WJ, et al. 1995. Quantitative trait loci that modify the severity of spotting in piebald mice. *Genome Res*. 1995, Vol. 5, 1, pp. 29-41.

PAYNE, AM, et al. 2001. Clustering and frequency of mutations in the retinal guanylate cyclase (GUCY2D) gene in patients with dominant cone-rod dystrophies. *J Med Genet*. 2001, Vol. 38, 9, pp. 611-614.

PELET, A, et al. 2005. Homozygosity for a frequent and weakly penetrant predisposing allele at the RET locus in sporadic Hirschsprung disease. *J Med Genet*. 2005, Vol. 42, 3. (<http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/42/3/e18>).

PERRI, P, et al. 2005. PHOX2B mutations and genetic predisposition to neuroblastoma. *Oncogene*. 2005, Vol. 24, 18, pp. 3050-3053.

PHILIPPE-CHOMETTE, P, PEUCHMAUR, M et AIGRAIN, Y. 2008. Maladie de Hirschsprung chez l'enfant : diagnostic et prise en charge. *Journal de pédiatrie et de puériculture*. 2008, Vol. 21, pp. 1-12.

PINGAULT, V, et al. 1998. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet*. 1998, Vol. 18, 2, pp. 171-173.

PINGAULT, V, et al. 2001. A heterozygous endothelin 3 mutation in Waardenburg-Hirschsprung disease: is there a dosage effect of EDN3/EDNRB gene mutations on neurocristopathy phenotypes? *J Med Genet*. 2001, Vol. 38, 3, pp. 205-209.

PINGAULT, V, et al. 2002. SOX10 mutations in chronic intestinal pseudo-obstruction suggest a complex physiopathological mechanism. *Hum Genet*. 2002, Vol. 111, 2, pp. 198-206.

PUFFENBERGER, EG, et al. 1994 a. Identity-by-descent and association mapping of a recessive gene for Hirschsprung disease on human chromosome 13q22. *Hum Mol Genet*. 1994 a, Vol. 3, 8, pp. 1217-1225.

PUFFENBERGER, EG, et al. 1994 b. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell*. 30 Déc 1994 b, Vol. 79, 7, pp. 1257-1266.

PULITI, A, et al. 1995. A high-resolution genetic map of mouse chromosome 15 encompassing the Dominant megacolon (Dom) locus. *Mamm Genome*. 1995, Vol. 6, 11, pp. 763-768.

PUSCH, C, et al. 1998. The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet*. 1998, Vol. 103, 2, pp. 115-123.

ROBERTSON, K, MASON, I et HALL, S. 1997. Hirschsprung's disease: genetic mutations in mice and men. *Gut*. 1997, Vol. 41, 4, pp. 436-441.

ROHRER, T, et al. 2002. Congenital central hypoventilation syndrome associated with Hirschsprung's disease and neuroblastoma: case of multiple neurocristopathies. *Pediatr Pulmonol*. 2002, Vol. 33, 1, pp. 71-76.

ROMEO, G, et al. 1998. Association of multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung disease. *J Intern Med.* 1998, Vol. 243, 6, pp. 515-520.

SAKURAI, T, YANAGISAWA, M et MASAKI, T. 1992. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1992, Vol. 13, 3, pp. 103-108.

SANDERSEN, C, et al. 2003. Le syndrome létal du poulain ovéro blanc : revue de littérature à partir de deux cas cliniques. *Ann. Méd. Vét.* 2003, Vol. 147, pp. 359-364.

SANGKHATHAT, S, et al. 2005. Novel mutation of Endothelin-B receptor gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Pediatr Surg Int.* 2005, Vol. 21, 12, pp. 960-963.

SANTSCHI, EM, et al. 1998. Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mamm Genome.* 1998, Vol. 9, 4, pp. 306-309.

SANTSCHI, EM, et al. 2001. Incidence of the endothelin receptor B mutation that causes lethal white foal syndrome in white-patterned horses. *Am J Vet Res.* 2001, Vol. 61, 1, pp. 97-103.

SCHNEIDER, JE et LEIPOLD, HW. 1978. Recessive lethal white in two foals. *J. Eq. Med. Surg.* 1978, Vol. 2, pp. 479-482.

SCHUCHARDT, A, et al. 1994. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature.* 1994, Vol. 367, pp. 319-320.

SCUCHARDT, A, et al. 1995. RET-deficient mice: an animal model for Hirschsprung's disease and renal agenesis. *J Intern Med.* 1995, Vol. 238, 4, pp. 327-332.

SHAM, MH, et al. 2001. Novel mutations of SOX10 suggest a dominant negative role in Waardenburg-Shah syndrome. *J Med Genet.* 2001, Vol. 38, 9.

SHANSKE, A, et al. 2001. Hirschsprung disease in an infant with a contiguous gene syndrome of chromosome 13. *Am J Med Genet.* 2001, Vol. 102, 3, pp. 231-236.

SILVERS, WK. 1979. *The Coat Colors of Mice : A model for mammalian gene action and interaction.* New York Heidelberg Berlin : Springer Verlag, 1979. p. 379. 0387903674.

SMIGIEL, R, et al. 2006. Single nucleotide polymorphisms in the RET gene and their correlations with Hirschsprung disease phenotype. *J Appl Genet.* 2006, Vol. 47, 3, pp. 261-267.

SOUTHARD-SMITH, EM, KOS, L et PAVAN, WJ. 1998. Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet.* 1998, Vol. 18, 1, pp. 60-64.

SOUTHARD-SMITH, EM, et al. 1999. The Sox10(Dom) mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res.* 1999, Vol. 9, 3, pp. 215-225.

STANCHINA, L, et al. 2006. Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev Biol.* 2006, Vol. 295, 1, pp. 232-249.

SYRRIS, P, CARTER, ND et PATTON, MA. 1999. Novel nonsense mutation of the endothelin-B receptor gene in a family with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Am J Med Genet.* 1999, Vol. 87, 1, pp. 69-71.

TAO, YX. 2006. Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: structure-function insights and therapeutic implications. *Pharmacol Ther.* 2006, Vol. 111, 3, pp. 949-973.

TOURAINÉ, R. 2000. Le syndrome de Shah-Waardenburg. *orphanet.* [En ligne] février 2000. [Citation : 8 octobre 2009.] <http://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-SW4.html>.

TOURAINÉ, RL, et al. 2000. Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain. *Am J Hum Genet.* 2000, Vol. 66, 5, pp. 1496-1503.

TRANG, H, et al. 2005. The French Congenital Central Hypoventilation Syndrome Registry: general data, phenotype, and genotype. *Chest.* 2005, Vol. 127, 1, pp. 72-79.

TREANOR, JJ, et al. 1996. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature.* 1996, Vol. 382, 6586, pp. 73-76.

TROMMERSHAUSEN-SMITH, A. 1977. Lethal white foals in matings of overo spotted horses. *Theriogenology.* 1977, Vol. 8, 5, pp. 303-311.

TRYON, RC, et al. 2009. Evaluation of allele frequencies of inherited disease genes in subgroups of American Quarter Horses. *J Am Vet Med Assoc.* 2009, Vol. 234, 1, pp. 120-125.

TUYSUZ, B, et al. 2009. Clinical variability of Waardenburg-Shah syndrome in patients with proximal 13q deletion syndrome including the endothelin-B receptor locus. *Am J Med Genet A.* 2009, Vol. 149A, 10, pp. 2290-2295.

VEIGA-FERNANDES, H, et al. 2007. Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's patch organogenesis. *Immunity.* Avr 2007, Vol. 26, 4, pp. 393-395.

VERHEIJ, JBG, et al. 2006. Shah-Waardenburg syndrome and PCWH associated with SOX10 mutations: A case report and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol.* 2006, Vol. 10, 1, pp. 11-17.

VON BOYEN, GBT, et al. 2002. Abnormalities of the enteric nervous system in heterozygous endothelin B receptor deficient (spotting lethal) rats resembling intestinal neuronal dysplasia. *Gut.* 2002, Vol. 51, 3, pp. 414-419.

VONDERFECHT, SL, BOWLING, AT et COHEN, M. 1983. Congenital intestinal aganglionosis in white foals. *Vet Pathol.* 1983, Vol. 20, 1, pp. 65-70.

VROSTOS, PD, SANTOSCHI, EM et MICKELSON, JR. 2001. The impact of the mutation causing overo lethal white syndrome on white patterning in horses. *AAEP Proceedings.* 2001, Vol. 47, pp. 385-391.

WU, JJ, et al. 1999. Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development.* 1999, Vol. 126, 6, pp. 1161-1173.

YAMADA, T, et al. 2006. Reduced expression of the endothelin receptor type B gene in piebald mice caused by insertion of a retroposon-like element in intron 1. *J Biol Chem.* 2006, Vol. 281, 16, pp. 10799-10807.

YANG, GC, et al. 1998. A dinucleotide mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome (LWFS) ; a horse variant of Hirschsprung disease (HSCR). *Hum Mol Genet.* 1998, Vol. 7, 6, pp. 1047-1052.

En ligne :

American Paint Horse Association. *APHA*. [En ligne] [Citation : 9 12 2009.] <http://www.apha.com/>.

Mouse Genome Database. 2006. *Mouse Genome Informatics*. [En ligne] 2006. [Citation : 18 Nov 2009.] <http://www.informatics.jax.org>.

NCBI. 1998. Entrez protein. *National Center for Biotechnology Information*. [En ligne] 10 Juillet 1998. [Citation : 7 12 2009.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/3299894>.

UniProt. 2009. UniProtKB. *UniProt*. [En ligne] 15 Déc 2009. [Citation : 12 Jan 2010.] <http://www.uniprot.org/uniprot/O62709>.

ANNEXES

Annexe 1 : Les réactifs

- **Réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN**

- *Kit NucleoSpin® Blood Quick Pure*, MACHEREY NAGEL, réf. 740569.50

permettant de réaliser 50 extractions qui comprend :

- 12,5 mL de tampon BQ1
- 7 mL de tampon BQ2
- 13 mL de tampon BE
- 30 mg de Protéinase K présentée sous forme lyophilisée

- *Kit NucleoSpin® Tissue*, MACHEREY NAGEL, réf 740952.50 permettant de réaliser

50 extractions qui comprend :

- 20 mL de Buffer T1
- 12 mL de Buffer B1
- 3 mL de Reagent B2
- 2x7 mL de Buffer B5
- 30 mL de Buffer BW
- 15 mL de Buffer BE
- 30 mg de Protéinase K
- 1,8 mL de Protéinase Buffer

- *Kit NucleoMag 96 blood*, MACHEREY NAGEL, réf.744500.1 permettant de réaliser

96 extractions qui comprend :

- 1.68 mL de billes magnétiques
- 15 mL de tampon de lyse cellulaire
- 40 mL de tampon de fixation MB2
- 66 mL de tampon de lavage MB3
- 66 mL de tampon de lavage MB4
- 102 mL de tampon de lavage MB5
- 12 mL de tampon d'élution MB6

- *Kit magneSil® KF, Genomic system*, PROMEGA, réf. MD1460 permettant de réaliser

200 extractions qui comprend :

- 40 mL de billes magnétiques
- 160 mL de tampon de lyse cellulaire
- 200 mL de solution de lavage saline
- 220 mL de solution de lavage à l'alcool
- 2 fois 25 mL d'une solution de « nuclease free »

- **Réactifs utilisés pour la préparation du mélange réactionnel (MIX de PCR)**

- *RED Taq DNA polymerase without MgCl₂*, SIGMA®, réf. D2812 contenant :

- RED Taq DNA Polymerase 1U/μL : il s'agit d'un mélange de Taq polymérase et d'un colorant rouge inerte. Ce colorant a un double intérêt : d'une part, il permet de vérifier que la Taq a bien été ajoutée dans le mélange réactionnel et qu'il est bien homogène et d'autre part, il constitue un marqueur du front de migration.

- Tampon PCR 10x

- MgCl₂ 25 mM

- *dNTP Set*, 100 mM Solutions, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®, réf. 27-2035-01 contenant :

- 100 mM de dATP

- 100 mM de dCTP

- 100 mM de dGTP

- 100 mM de dTTP

- *Eau ultra-pure et stérile*, AGUETTANT®

- **Réactifs utilisés pour l'électrophorèse**

- *100 Base-Pair Ladder*, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®, réf. 27-4007-01, tube de 100 μL

- *20 Base-Pair Ladder*, SIGMA®, réf. P1598

- *Agar*, SIGMA®, réf. A7002 présenté sous forme de poudre

- *Nusieve®*, FMC, réf. 50082 présenté sous forme de poudre

- *Agar HD*, SIGMA®, présenté sous forme de poudre

- *TBE 10x* (Tris Borate EDTA), SIGMA®, réf. 4415

- « Lester » : glycérol, SIGMA®

- Marqueurs de front de migration :

- *Bleu de bromophénol*, SIGMA®, réf B5525, pot de 5g de poudre

- *Xylène cyanol FF*, SIGMA®, réf.X4126, pot de 10g de poudre

- *Orange G*, SIGMA®, réf. O3756

- *Bromure d'éthidium*, SIGMA®, solution à 10 mg/mL

Annexe 2 : Le matériel

- *Équipement nécessaire pour l'extraction de l'ADN*
 - *KingFisher*® ml, THERMO LABSYSTEMS®
- *Équipement nécessaire pour la préparation du mélange réactionnel*
 - Hotte à flux laminaire *VERTICAL FASTER*, ELVETEC®
- *Équipement nécessaire pour l'amplification*
 - Thermocycleur *Gene Amp 9700*, APPLIED BIOSYSTEMS®
- *Équipement nécessaire pour l'électrophorèse*
 - Cuve d'électrophorèse *MUPID-2*, EUROGENTEC®
- *Équipement nécessaire à la révélation des fragments amplifiés*
 - Transilluminateur *Table UV*, AMILABO®
 - Appareil photo Polaroid

Annexe 3 : exemple de fiche technique d'une amorce déjà publiée

Eurogentec S.A. Liège science park Rue Bois Saint-Jean 5 4102 SERAING BELGIUM
 Tel : +32(0)4 372 74 00 Fax : +32(0)4 264 07 88 E-mail : info@eurogentec.com
 RPM Liège T.V.A.-(BE)-0427.348.346
 IBAN : BE02 2400 7776 8540 BIC : GEBABEBB Fortis Bank 240-0777685-40

EUROGENTEC SA													
Fiche Technique													
Prepaidfr.rtf										NRU:1000168028			
Client		LAMBERT DR.											
Localisation		F-69280 MARCY L'ETOILE											
Votre référence		H40603											
Référence client				Numéro d'oligo		Echelle de synthèse		Chimie		Bases			
LWFms5				907147		40 nmol		DNA		20			
Séquence écrite 5' à 3'		CAT-CAA-GGG-AAA-CTC-CAC-AC											
Composition		A	8	C	7	G	3	T	2	Autres	0	Mixte	0
Modifications													
Mod 3'													
Mod 5'													
Mod 5													
Mod 6													
Mod 7													
Mod 8													
Mod 9													
QC													
Purification		RP-Cart											
%GC		50,00											
MW (g/mol)		6064,05											
Tm1(2AT+4GC) (°C)		60											
Tm2 (%GC) (°C)		49,7											
Date d'emballage		29/09/2005											
Mise en solution		de 12 10.05 dans 125 µl d'H ₂ O mp Pour obtenir une concentration de 100 µM ajouter 623,8 µl Pour obtenir une concentration de 20 µM ajouter 3119 µl Pour obtenir une concentration de 5 µM ajouter 12476 µl											
Condition de livraison													
Condition de stockage		4°C lyophilisé -20° C dans un tampon TE, PH = 8											
Commentaire général		Tm % GC Calculé avec 50 mM NaCl et 0% formamide (condtions PCR)											
Commentaire spécifique													

Si vous avez des questions contactez notre service client correspondant à votre pays
 +32 (0) 4 372 76 65, +44 (0) 1794 511 411, +33 (0) 2 41 73 33 73, +49 (0) 221 258 94 55, +31 (0) 43 352 06 98
 ou par email info@eurogentec.com

Annexe 4 : Méthode d'extraction d'ADN manuelle avec le kit NucleoSpin® Blood

Quickpure

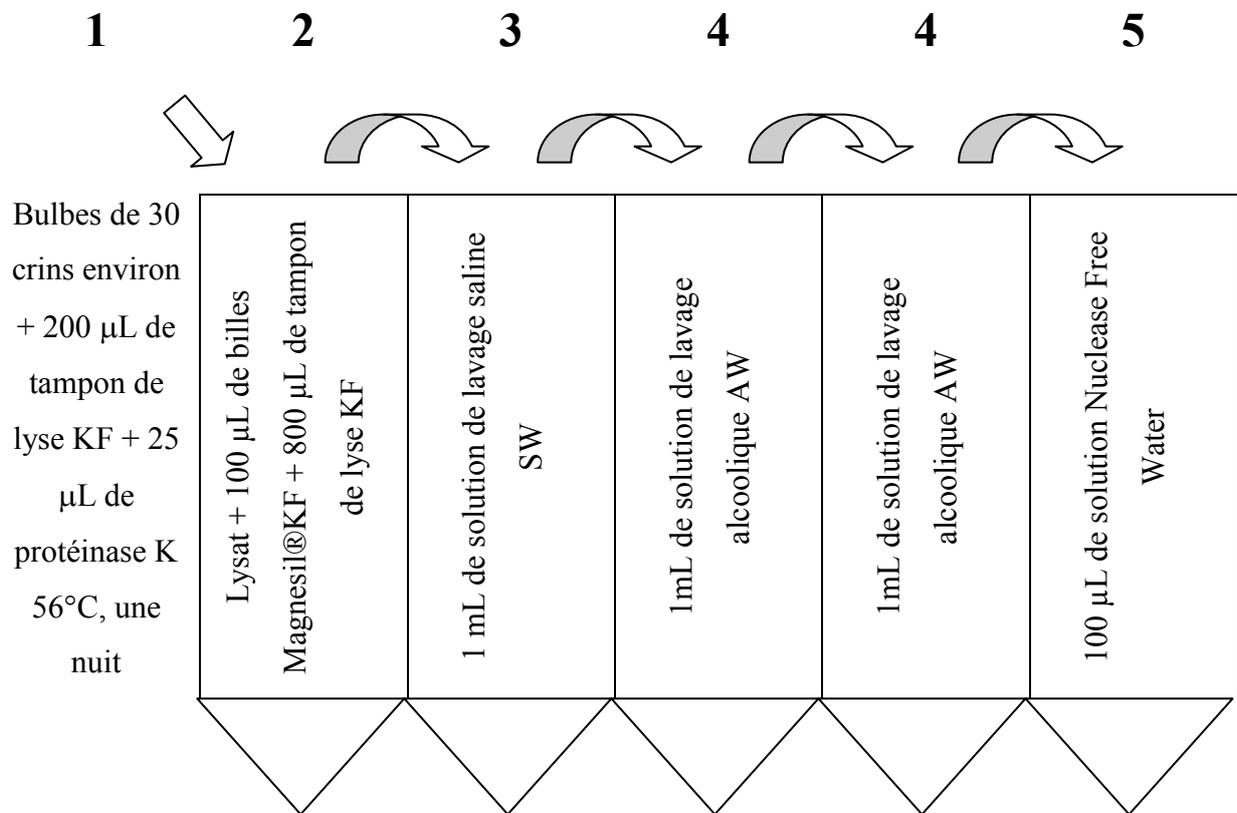
Etape	Réactifs	Description
Lyse cellulaire	 200 µL de sang 25 µL de protéinase K 200 µL de tampon BQ	<ul style="list-style-type: none">• Mélange des réactifs• Vortex• Incubation à 70°C, 10 à 15 min
Ajustement des conditions d'adsorption de l'ADN	 200 µL d'éthanol	<ul style="list-style-type: none">• Ajout du réactif• Vortex
Adsorption de l'ADN	 Centrifugation à 11000 g, 1 min	<ul style="list-style-type: none">• Disposition sur une colonne avec membrane de silice avec un tube collecteur• Centrifugation à 11000 g, 1 min• Elimination du tube
Lavage de la membrane de silice	 350 µL de tampon BQ2	<ul style="list-style-type: none">• Ajout d'un nouveau tube collecteur de 2 mL• Ajout du réactif• Centrifugation à 11000 g, 3 min
Séchage de la membrane de silice		<ul style="list-style-type: none">• Etape incluse dans celle de lavage
Elution de l'ADN	 50 µL de tampon BE (70°C)	<ul style="list-style-type: none">• Ajout d'un nouveau tube de 1,5 mL• Ajout du réactif• 1 min à T°C ambiante• Centrifugation à 11000 g, 1 min

Annexe 5 : Méthode d'extraction d'ADN manuelle avec le kit NucleoSpin® Tissue

Etape	Réactifs	Description
Préparation des bulbes		<ul style="list-style-type: none"> Coupe des crins au ras des bulbes de 20 à 30 crins
Pré-lyse	180 µL de tampon T1 25 µL de protéinase K	<ul style="list-style-type: none"> Incubation à 56°C toute une nuit
Lyse cellulaire	Mélange précédent 200 µL de tampon B3	<ul style="list-style-type: none"> Mélange des réactifs Vortex Incubation à 70°C, 10 à 15 min
Ajustement des conditions d'adsorption de l'ADN	200 µL d'éthanol	<ul style="list-style-type: none"> Ajout du réactif Vortex
Adsorption de l'ADN		<ul style="list-style-type: none"> Disposition sur une colonne avec membrane de silice avec un tube collecteur Centrifugation à 11000 g, 1 min Elimination du tube
Premier lavage de la membrane de silice	500 µL de tampon BW	<ul style="list-style-type: none"> Ajout d'un nouveau tube collecteur de 2 mL Ajout du réactif Centrifugation à 11000 g, 1 min
Second lavage de la membrane de silice	600 µL de tampon B5	<ul style="list-style-type: none"> Ajout d'un nouveau tube collecteur de 2 mL Ajout du réactif Centrifugation à 11000 g, 1 min
Séchage de la membrane de silice		<ul style="list-style-type: none"> Etape incluse dans celle de lavage
Elution de l'ADN	100 µL de tampon BE (70°C)	<ul style="list-style-type: none"> Ajout d'un nouveau tube de 1,5 mL Ajout du réactif 1 min à T°C ambiante Centrifugation à 11000 g, 1 min

Annexe 6 : Méthode d'extraction d'ADN semi automatisée avec le kit MagneSil®

KingFisher, genomic system et le KingFisher™



1 Etape de lyse cellulaire

2 Captation de l'ADN par des billes magnétiques

3 Lavage des billes dans une solution salée

4 Doubles lavages des billes dans une solution alcoolique

5 Elution de l'ADN et retour des billes dans le tube précédent



Versement du lysat dans le premier tube



Passage des microbilles d'un tube à l'autre

Annexe 7 : Les différentes conditions de PCR réalisées

Nom de la PCR	Amorces utilisées (concentration en μM)	MgCl_2			Température	Nombre de cycles
		1 mM	1,5 mM	2 mM		
LWF-1	LWF-s1 (0,4) LWF-as2 (0,4)	X	X	X	60°C	45 (a)
	LWF-s1 (0,4) LWF-as4 (0,4)	X	X	X		
LWF-2 (conditions article)	LWF-s3 (1) LWFm-s5 (1) LWF-as2 (1) LWFwt-as6 (1)		X		58°C	35 (b)
LWF-3	LWF-s3 (0,4) LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,4)		X		58°C	35 (b)
	LWF-s3 (0,4) LWFwt-as6 (0,4)		X			
	LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4)		X			
	LWF-s3 (0,4) LWF-as2 (0,4)		X			
LWF-4	LWF-s3 (0,4) LWFwt-as6 (0,4) LWF-as2 (0,4)		X		58°C	35 (b)
	LWF-s3 (0,4) LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4)		X			
	LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4)		X			
LWF-6	LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4)	X	X		58°C	45 (b)
LWF-7	LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4)	X	X	X	59°C	45 (b)
LWF-8	LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4)		X	X	60°C	45 (b)
LWF-9	LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4)	X	X	X	61°C	45 (b)
LWF-10	LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4)			X	62°C	45 (b)
LWF-12	LWF-s3 (0,4) LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,4)		X	X	59°C	45 (b)
LWF-13	LWF-s3 (0,4) LWFm-s5 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,4)	X	X	X	57°C	45 (b)

Echec des manipulations avec les amorces déjà publiées.
Création de nouvelles amorces et commande de celles-ci.

Nom de la PCR	Amorces utilisées	MgCl ₂			Température	Nombre de cycles
		1 mM	1,5 mM	2 mM		
LWF-14	LWFm-s7 (0,4) LWF-as2 (0,4)		X	X	60°C	45 (b)
	LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4)		X	X		
LWF-15	LWF-s3 (0,4) LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,4)	X	X	X	60°C	45 (b)
LWF-16	LWF-s3 (0,4) LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,4)	X	X		61°C	45 (b)
	LWF-s3 (0,4) LWFm-s9 (0,6) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,4)	X	X			
LWF-17	LWF-s3 (0,4) LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,4)	X	X		61°C	45 (c)
	LWF-s3 (0,2) LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,2)	X	X			
LWF-18	LWF-s3 (0,2) LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,2)		X	X	62°C	45 (c)
LWF-19	LWF-s3 (0,2) LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,2)		X	X	63°C	45 (c)
LWF-20	LWF-s3 (0,2) LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,3)		X	X	64°C	45 (c)
LWF-21	LWF-s3 (0,2) LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,2)	X	X		62°C	45 (d)
LWF-22	LWF-s3 (0,3) LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,3)	X	X		62°C	45 (d)

LWF-23	LWF-s3 (0,2) LWFm-s9 (0,4) LWF-as2 (0,4) LWFwt-as6 (0,2)		X		61°C	45 (d)
--------	---	--	---	--	------	--------

Types de cycles :

$$(a) 94^{\circ}\text{C} - 3\text{min}; \frac{94^{\circ}\text{C}-1\text{min}; X^{\circ}\text{C}-1\text{min}; 72^{\circ}\text{C}-1\text{min}}{Y \text{ cycles}}; 72^{\circ}\text{C} - 10\text{min}; 8^{\circ}\text{C} - \infty$$

$$(b) 94^{\circ}\text{C} - 3\text{min}; \frac{94^{\circ}\text{C}-5 \text{ s}; X^{\circ}\text{C}-10 \text{ s}; 72^{\circ}\text{C}-30 \text{ s}}{Y \text{ cycles}}; 72^{\circ}\text{C} - 10\text{min}; 8^{\circ}\text{C} - \infty$$

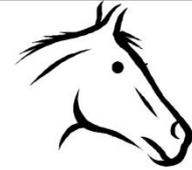
$$(c) 94^{\circ}\text{C} - 3\text{min}; \frac{94^{\circ}\text{C}-10 \text{ s}; X^{\circ}\text{C}-20 \text{ s}; 72^{\circ}\text{C}-40 \text{ s}}{Y \text{ cycles}}; 72^{\circ}\text{C} - 10\text{min}; 8^{\circ}\text{C} - \infty$$

$$(d) 94^{\circ}\text{C} - 3\text{min}; \frac{94^{\circ}\text{C}-10 \text{ s}; X^{\circ}\text{C}-20 \text{ s}; 72^{\circ}\text{C}-30 \text{ s}}{Y \text{ cycles}}; 72^{\circ}\text{C} - 10\text{min}; 8^{\circ}\text{C} - \infty$$

Annexe 8 : Document d'accompagnement des prélèvements (page 1)



LABORATOIRE VETERINAIRE DEPARTEMENTAL
 BP 35 – 69280 MARCY L'ETOILE
 Tél : 04-78-87-82-04 Fax : 04-78-87-82-08
 www.vet-lyon.fr/lvd



DEMANDE D'ANALYSE POUR LE LWFS

Coordonnées du propriétaire	Coordonnées du vétérinaire	Dossier LVD n°:
		Date de réception :

Voulez-vous recevoir le résultat par fax ? OUI NON Numéro de fax :

Voulez-vous recevoir le résultat par mail ? OUI NON Adresse mail :

<p><u>Identification du cheval prélevé :</u> Nom : Sexe : Age : Numéro d'identification :</p>	<p><u>Facturation à :</u> <input type="checkbox"/> Propriétaire <input type="checkbox"/> Vétérinaire <input type="checkbox"/> Autre (précisez) :</p>
--	--

Nature du prélèvement et commémoratifs	
<input type="checkbox"/> Sang total (sur EDTA) ou <input type="checkbox"/> Crins	
<ul style="list-style-type: none"> • Quelle est la robe du cheval à tester ? • Le cheval a-t-il déjà été testé pour cette maladie ? • Certains de ses ascendants ou descendants ont-ils déjà été testés pour cette maladie et si oui y'en a-t-il des positifs ? • Le cheval a-t-il des origines ou des ancêtres de race Paint Horse ? • Le cheval a-t-il déjà donné naissance à un poulain blanc mort dans les 48h suivant sa naissance ? • Un cheval possédant un lien familial avec le cheval à tester a-t-il déjà donné naissance à un poulain blanc mort dans les 48h suivant sa naissance ? • Commentaires : 	<div style="border: 1px solid black; height: 40px; width: 100%; background-color: #cccccc;"></div> <div style="font-size: 48px; font-weight: bold; text-align: center; margin-top: 20px;"> CRINS </div> <div style="border: 1px solid black; height: 250px; width: 80px; margin-left: auto; background-color: #cccccc;"></div>

Annexe 9 : Document d'accompagnement des prélèvements (page 2)

NOTICE EXPLICATIVE

Il est conseillé de lire toute la notice avant d'effectuer le prélèvement

PRELEVEMENTS

- SANG

Demander à votre vétérinaire de réaliser le prélèvement sur tube **EDTA**. Il est impératif que chaque tube de sang soit identifié avec le **nom du cheval, le sexe et le numéro d'identification**.

- CRINS

Vous pouvez réaliser vous-même ce prélèvement. Il faut arracher une **cinquantaine** de crins **avec leurs bulbes pileux** car ce sont eux qui contiennent l'ADN et qui permettent l'analyse.

Si vous réalisez plusieurs prélèvements sur plusieurs chevaux, il faut faire très attention de ne pas contaminer les prélèvements avec les crins d'un autre cheval. Il est donc conseillé de réaliser les prélèvements jusqu'au conditionnement l'un après l'autre, avec du matériel propre ou, encore mieux, d'affecter une personne par animal et donc par prélèvement (afin de ne pas contaminer ceux-ci par une éventuelle présence de crins sur le manipulateur).

CONDITIONNEMENT

- SANG

Placer le tube au réfrigérateur avant son envoi afin de prolonger sa conservation et d'optimiser le test. Remplir le document d'accompagnement sans tenir compte du cadre en bas à droite du document.

- CRINS

Après avoir arraché les crins, les coller sur un morceau de ruban adhésif à environ 2 cm en dessous du bulbe et coller cet adhésif sur l'une des zones hachurées du document d'accompagnement. Remplir le reste du document d'accompagnement et placer chaque document dans des enveloppes **séparées** (toujours dans le but d'éviter les contaminations entre échantillons). Mettre le tout au réfrigérateur afin de garantir la conservation des crins.

ENVOI

- SANG

Placer l'ensemble des tubes identifiés ainsi que les documents d'accompagnements dans une enveloppe rigide (type lettre Max) dûment affranchie adressée au LVD 69 (adresse sur le document d'accompagnement). Envoyer le tout en essayant d'éviter les envois le vendredi (risque de détérioration des prélèvements durant le week-end).

- CRINS

Placer l'ensemble des enveloppes dans une grande enveloppe dûment affranchie et adressée au LVD 69 et envoyer le tout.

SEIGNOBOS Fanny

**LE SYNDROME LETAL DU POULAIN BLANC : MISE AU POINT
D'UN TEST DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE**

Thèse Vétérinaire : Lyon , 2010

RESUME :

Le syndrome létal du poulain blanc est une maladie génétique grave, décrite pour la première fois en 1977 par Trommershausen-Smith, qui, par l'absence de motricité du côlon, entraîne des coliques puis la mort du poulain dans les 48h suivant sa naissance. Le gène mis en cause dans ce syndrome est celui du récepteur aux endothélines de type B sur lequel on retrouve une transversion TC→AG en position 353 et 354. Le changement d'un acide aminé dans la séquence de ce récepteur entraîne une perte de sa fonction. Il faut donc éviter à tout prix la naissance de ces poulains blancs en testant les reproducteurs. L'idée importante à retenir de cette étude est que le phénotype et le génotype ne sont pas parfaitement reliés. Il faut donc tester les Paint Horses overo mais aussi les Paint Horses ayant une autre robe ainsi que tous les chevaux ayant des ancêtres Paint Horses ou Quarter Horses.

La disponibilité du test génétique en France répond à une demande accrue des propriétaires de chevaux susceptibles d'être porteurs. Le nombre de ces chevaux a énormément augmenté ces dernières années en France et va encore augmenter dans les années à venir si l'on se réfère à la tendance actuelle. Le test PCR mis au point au Laboratoire Vétérinaire Départemental du Rhône est un test fiable qui permet de connaître le statut génétique des chevaux vis-à-vis de l'allèle muté en vue de reproduction ou pour la réalisation de certificats lors de vente de chevaux.

MOTS CLES :

- Syndrome létal du poulain blanc
- LWFS
- Cheval
- Paint Horse
- PCR
- Récepteur aux endothélines de type B
- EDNRB

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Alain CALENDER
1er Assesseur : Madame le Professeur Françoise GRAIN
2ème Assesseur : Madame le Professeur Jacquemine VIALARD

DATE DE SOUTENANCE :

7 Mai 2010

ADRESSE DE L'AUTEUR :

Quartier MARNAS
26270 LORIOLE SUR DROME