

Identification de régions chromosomiques associées à la neuropathie laryngée récurrente chez le cheval de sport

Par :

- MC Dupuis¹⁻², T Druet², JM Denoix¹, P Lekeux², M Georges²
- ¹ CIRALE RD675 14430 Goustranville France
- ² ULg GIGA 1 avenue de l'hôpital 4000 Liège Belgique

Résumé

La neuropathie laryngée récurrente est une des principales affections des voies respiratoires supérieures du cheval. Elle se manifeste habituellement par un bruit anormal à l'exercice, communément dénommé « cornage ». Cette maladie, causée par une dégénérescence idiopathique des nerfs laryngés récurrents, peut perturber les performances sportives. Une composante génétique est suspectée depuis plusieurs décennies mais n'a jamais été élucidée. L'objectif de cette étude a été d'identifier des marqueurs génétiques associés à l'affection. Deux cohortes de 144 chevaux de sport atteints et 133 sains ont été constituées. Le phénotypage a consisté en un examen endoscopique des voies respiratoires supérieures au repos permettant d'attribuer un grade de dysfonctionnement laryngé. Les chevaux ont été génotypés sur 54 602 marqueurs SNP grâce à une puce à ADN. Des analyses statistiques combinant études d'association et études de liaison ont permis d'identifier plusieurs régions chromosomiques associées à la maladie. Le déterminisme génétique de la neuropathie laryngée récurrente chez les chevaux de sport semble donc complexe, plusieurs gènes ayant des effets modérés étant probablement impliqués.

Mots clés : Génétique, larynx, neuropathie, puce à ADN, cheval

Summary

Recurrent laryngeal neuropathy is a major upper airway disease of horses. Abnormal respiratory noise during exercise, commonly referred to as "roaring", is the main clinical sign. This disease, caused by an idiopathic degeneration of the recurrent laryngeal nerves, can impair athletic performance. A genetic background has been suspected for several decades but the mode of inheritance has remained unclear. The objective of the study was to identify genetic markers associated with the disease. Two groups of Sport-horses were evaluated: 144 RLN-affected horses and 133 control horses. An upper respiratory tract endoscopy was performed at rest to establish a gradation of the laryngeal dysfunction. The 277 horses (RNA affected and controls) and 33 parents were genotyped for 54602 SNP markers by using a DNA chip. Several chromosomal regions associated with the disease were identified using statistical analysis combining association and linkage studies. The genetic determinism of recurrent laryngeal neuropathy seems complex, several genes with moderate effect might be implicated.

Key-words: Genetics, larynx, neuropathy, DNA chip, horse

Introduction

La neuropathie laryngée récurrente (NLR), plus communément appelée « cornage », est une affection des voies respiratoires supérieures qui se traduit par un bruit respiratoire à l'effort, conséquence d'une obstruction dynamique laryngée qui peut limiter les performances du cheval en compétition. Le diagnostic est posé grâce à un examen endoscopique qui permet de constater un défaut d'abduction du cartilage aryténoïde gauche. L'ouverture complète du larynx ne peut plus être obtenue du fait d'une faiblesse musculaire secondaire à une atteinte nerveuse (dégénérescence des nerfs laryngés récurrents). Une origine génétique est suspectée depuis de nombreuses décennies mais n'a jamais été élucidée. L'héritabilité de l'affection a été estimée entre 0,2 et 0,61.

L'objectif de cette étude a été d'identifier des marqueurs génétiques associés à la neuropathie laryngée récurrente chez le cheval de sport.

1. Matériel et méthodes

Des cohortes de chevaux ont été constituées au CIRALE et grâce à la collaboration de cliniques vétérinaires partenaires en France, Belgique, Allemagne et Suisse. L'historique du cheval et un examen clinique complet ont été renseignés afin d'exclure les hémiplegies laryngées acquises. Une endoscopie des voies respiratoires supérieures au repos était ensuite réalisée et enregistrée afin d'être notée par le même clinicien. Une prise de sang était enfin effectuée puis congelée, sur le cheval et sur ses parents quand il a été possible de les retrouver.

1.1. Phénotypage

Les chevaux ont été phénotypés grâce à l'examen endoscopique, en utilisant le système de grade consensuel établi lors du Workshop Havemeyer en 2003 (Robinson, 2004). Ils ont été considérés :

- Sains si le score laryngé est de I/IV (fonctionnement symétrique et synchrone, abduction complète). Seuls les chevaux sains de plus de 3 ans ont été inclus.
- Atteints à partir du grade III.2 (abduction complète du cartilage aryténoïde gauche non obtenue même après déglutition ou hyperventilation).
- Intermédiaires pour les autres grades. Ces cas intermédiaires n'ont finalement pas été exploités afin de conserver des cohortes les plus pures possibles (problème d'évolution du grade avec le temps à court et long terme, variabilité intra et inter observateur, faible corrélation avec l'histologie...).

1.2. Génotypage

L'ADN (acide désoxyribonucléique) a été extrait à partir du sang puis dosé et dilué afin de que tous les échantillons soient à la même concentration. Les génotypes ont été obtenus grâce à la puce équine ILLUMINA® Equine SNP50 contenant 54602 marqueurs SNP.

1.3. Analyses statistiques

Des analyses d'association ont tout d'abord été réalisées sur les chevaux non apparentés. Les fréquences alléliques ont été comparées entre les cas et les contrôles pour chaque marqueur (analyse simple point). Un logiciel d'analyse d'association multipoint a également été utilisé (Druet et Georges, 2010). Celui-ci réalise d'abord le phasage des génotypes SNP en recourant à un modèle markovien caché, c'est-à-dire qu'il détermine l'ordre de succession des marqueurs sur chaque chromosome. Les fréquences des états cachés (« haplotypes ancestraux ») sont en suite comparées entre cas et contrôles à l'aide d'un modèle mixte incluant un effet polygénique aléatoire pour lequel la matrice de variance-covariance est calculée à partir des états cachés du génome entier (logiciel PHASEBOOK).

Enfin, au sein des familles présentant un nombre d'individus suffisants, des analyses de liaison ont été conduites (simple point et multipoint) à la recherche d'un déséquilibre dans la transmission des marqueurs entre les descendants sains et atteints.

Les valeurs p obtenues suite aux analyses réalisées sur plusieurs milliers de marqueurs doivent être corrigées pour test multiple. La correction de Bonferroni consiste à diviser la valeur p par le nombre de tests indépendants réalisés. Les marqueurs proches étant liés, nous avons choisi une correction de 20 000. On considère que le seuil de significativité est dépassé si $p < 2,25 \times 10^{-6}$ ($-\log_{10}(p) > 5,65$).

2. Résultats

2.1. Bilan des cohortes

Tableau 1 : Nombre de chevaux génotypés en juin 2010 dans le cadre de l'étude sur la génétique de la NLR

	Chevaux de sport	Trotteurs	Pur Sang	Chevaux de trait	TOTAL
Cas	144	20	15	5	184
Contrôles	133	18	16	6	173

Le bilan des cas génotypés en juin 2010 est présenté dans le tableau 1. Chaque cas atteint a été associé à un cas sain de même race, et si possible de même sexe et avec des origines semblables. Du sang a également été prélevé sur le maximum de parents disponibles (57 au total). Parmi les chevaux atteints, les races représentées sont essentiellement des chevaux de sport (78 %) puis les trotteurs (12%), les purs-sangs (8%) et les chevaux de trait (2%). On remarque une majorité de mâles : 71% contre 29% de femelles. Il a été possible d'identifier 4 familles de chevaux de sport avec des individus issus d'un même père ayant 4 à 10 descendants atteints.

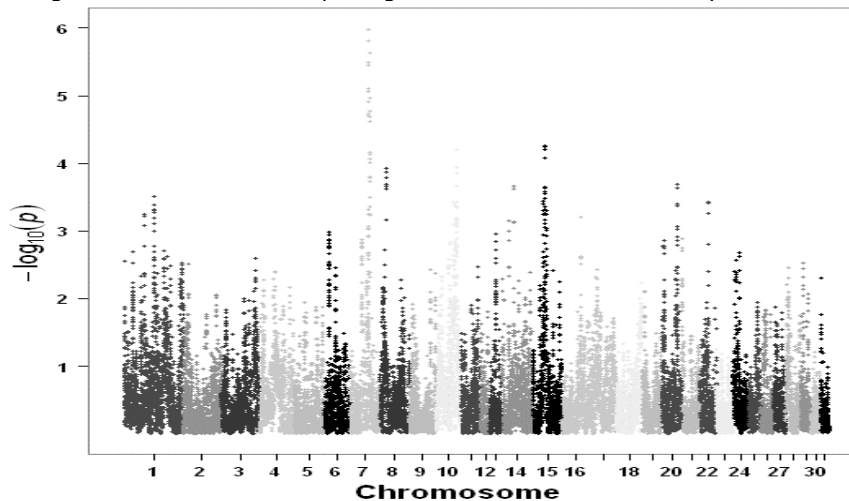
2.2. Résultats des génotypages

Le taux de génotypage par individu a été supérieur à 95% pour tous les chevaux, ce qui a permis de conserver tous les cas. Plusieurs éléments ont été contrôlés avant de réaliser les analyses statistiques : concordance des liens de parenté et du sexe, exclusion des marqueurs peu fiables (taux de génotypage inférieur à 95%, non respect de l'équilibre de Hardy Weinberg), structure de la population...

2.3. Résultats des analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur la population de chevaux de sport (144 cas, 133 contrôles et 33 parents).

Figure I : Résultats d'une étude d'association multipoint sur la NLR
Figure I: Results of a multipoint genome wide association study on RLN



Résultats de l'analyse d'association après phasage des données (Logiciel PHASEBOOK) sur les chevaux de sport mâles (108 cas et 87 contrôles) avec 20 états cachés. Noter le pic sur le chromosome 7 ($-\log_{10}(p) = 5,97$).

L'étude d'association simple point n'a pas donné de résultat statistiquement significatif. Les études d'association multipoint ont été menées en testant différents états cachés ($k=10, 15$ et 20). Il en ressort plusieurs régions chromosomiques potentiellement associées à la maladie, dont certaines sont différentes en fonction du modèle utilisé. La figure I montre la seule analyse pour laquelle une région dépasse le seuil de significativité fixé (analyse uniquement sur les mâles). Des études de liaison ont été également réalisées sur les chevaux de sport issus d'un même père (famille 1 : 9 atteints et 6 sains ; famille 2 : 7 atteints et 6 sains). Certaines régions potentiellement intéressantes d'après les études d'association se retrouvent dans les études de liaison (en particulier celle sur le chromosome 7 dans la famille 2), sans que le seuil de significativité ne soit dépassé.

3. Discussion

De nombreuses collaborations ont du être mises en place pour atteindre les objectifs en termes d'effectifs (200 chevaux atteints) mais la qualité du phénotypage n'est pas toujours optimale (anamnèse incomplète, absence de vidéo...). Les cas incertains sont alors éliminés afin d'obtenir des cohortes les plus pures possibles. Néanmoins, un faible risque d'erreur persiste : paralysie laryngée acquise et non idiopathique (cheval sain classé en atteint), ou au contraire cheval qui semble sain mais souffrira d'une forme de NLR tardive (cheval atteint classé en sain)...

D'autre part, la cohorte des chevaux contrôles est également plus délicate à constituer qu'il n'y paraît. En effet, il peut être difficile de trouver un cheval parfaitement sain, à associer à un cheval atteint sur des critères d'origines (notamment pour les races étrangères), d'âge (plus de 3 ans) et de sexe.

Une autre difficulté a été de disposer de l'ADN des deux parents. Les propriétaires des étalons et des juments sont alors recherchés, puis contactés afin de pouvoir si possible prélever du sang sur leurs chevaux. Cette recherche est fastidieuse, et malheureusement souvent infructueuse. Ainsi, sur 184 individus atteints, seulement 28 pères et 29 mères ont pu être génotypés.

Les analyses statistiques ont dans un premier temps été réalisées sur la population des chevaux de sport afin de pouvoir travailler sur un effectif suffisamment élevé et relativement homogène. Elles ont nécessité d'utiliser des modèles complexes, élaborés spécifiquement pour ce type de données. Les signaux obtenus semblent montrer que plusieurs régions chromosomiques sont impliquées dans le déterminisme génétique de la NLR. Ils devront être confirmés grâce à l'ajout de cas supplémentaires.

Conclusion

Outre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de l'affection, cette étude pourrait permettre d'identifier des marqueurs génétiques associés à la maladie utilisables ensuite pour déceler des individus porteurs. Dans le futur, la mise au point de tests génétiques présenterait un intérêt indéniable en pratique dans le cadre d'une visite d'achat ou pour la sélection des reproducteurs (Charlier *et al.*, 2008).

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les financeurs du projet GENEQUIN : l'ANR (Agence Nationale de la Recherche), le Fond Eperon, l'IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation) et le CRBN (Conseil Régional de Basse-Normandie) ; ainsi que les vétérinaires partenaires (Dr Aebisher, Dr Antys, Dr Bayssat, Dr Berthelot, Dr Betsch, Dr Boening, Dr Boulin, Dr Bussy, Dr Ciantar, Dr Colin, Dr Corde, Dr Delarue, Dr Foursin, Dr Geoffroy, Dr Goupil, Dr Lefere, Dr Palmers, Dr Pechayre, Dr Picandet, Dr Plainfossé, Dr Scicluna, Dr Simon, Dr Stockwell, Dr Van Erck...).

Références

Charlier, C., Coppieters, W., Rollin, F., Desmecht, D., Agerholm, J.S., Cambisano, N., Carta, E., Dardano, S., Dive, M., Fasquelle, C., Frennet, J.C., Hanset, R., Hubin, X., Jorgensen, C., Karim, L., Kent, M., Harvey, K., Pearce, B.R., Simon, P., Tama, N., Nie, H., Vandeputte, S., Lien, S., Longeri, M., Fredholm, M., Harvey, R.J., Georges, M., 2008. Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nature Genetics* 40, 429-454.

Druet, T., Georges, M., 2010. A hidden markov model combining linkage and linkage disequilibrium information for haplotype reconstruction and quantitative trait locus fine mapping. *Genetics* 184, 789-798.

Dupuis, M.C., 2010. Le cornage : une maladie génétique ? *Equ'idée*, revue des Haras Nationaux, n°70, p70.

Marti, E., Ohnesorge, B., 2002. Genetic basis of respiratory disorders. In : *Equine Respiratory Diseases*. Editor: Lekeux, P., Ithaca, www.ivis.org.

Robinson, N.E., 2004. Consensus statements on equine recurrent laryngeal neuropathy: conclusions of the Havemeyer Workshop. *Equine Veterinary Education* 16, 333-336.