

Université de Montréal

**Malformation Chiari-Like : L'investigation d'une  
maladie complexe par l'utilisation d'un modèle canin**

par

Philippe Lemay

Biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en science  
en Biochimie  
option Génomique humaine

Août 2012

© Philippe Lemay, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Malformation Chiari-Like : L'investigation d'une maladie complexe par l'utilisation d'un  
modèle canin

Présenté par :  
Philippe Lemay

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Martine Raymond, président-rapporteur  
Zoha Kibar, directeur de recherche  
Guillaume Lettre, membre du jury

## Résumé

La malformation de Chiari type 1 (MCI) est une anomalie congénitale de la jonction craniale-cérébrale fréquente avec une incidence de 1:1280. MCI est caractérisée par la descente des amygdales cérébelleuses à travers le foramen magnum et est souvent associée à la syringomyélie. Les causes de cette maladie semblent être multifactorielles incluant des facteurs génétiques. La MCI est similaire à une malformation fréquente chez la race des Griffon Bruxellois (GB) connue sous le nom de Malformation Chiari-like (MCL). Le modèle canin offre l'avantage d'une forte homogénéité génétique réduisant ainsi la complexité de la maladie et facilitant l'identification d'un locus causatif. Une étude d'association du génome entier sur une cohorte de 56 GB suivie d'une cartographie fine sur une cohorte de 217 GB a identifié un locus fortement associé à la MCL sur le chromosome 2 (22 SNPs, valeur  $P= 7 \times 10^{-8}$ ) avec un haplotype de 1.9 Mb plus fréquent chez les non affectés. Une seconde étude d'association du génome entier sur une cohorte de 113 GB a permis d'identifier un 2<sup>ème</sup> locus fortement associé à la MCL sur le chromosome 13 (25 SNPs, valeur  $P= 3 \times 10^{-7}$ ) avec un haplotype de 4 Mb surreprésenté chez les non affectés. Ces régions candidates constituent la première étape vers l'identification de gènes causatifs pour la MCL. Notre étude offre un point d'entrée vers une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant la pathogénèse de la MCI humaine.

**Mots-clés :** Malformation de Chiari type 1, malformation Chiari-Like, modèle canin, étude d'association du génome entier, génétique humaine, épidémiologie génétique

## **Abstract**

Chiari I malformation (CMI) represents a common congenital abnormality of the craniocerebral junction with an estimated incidence of 1 in 1280. CMI is characterized by a descent of the cerebellar tonsils into the foramen magnum, often in association with syringomyelia. The developmental defect in CMI is thought to be the result of an underdeveloped occipital bone and small posterior fossa. The etiology of CMI is thought to be multifactorial involving genetic factors. CMI in humans is similar to a condition in the dog called Chiari-like malformation (CM) that is particularly common in the Griffon Bruxellois (GB) breeds. A genome wide association study on a 56 GB cohort followed by a fine mapping in a 217 GB cohort have identified a locus on chromosome 2 that was strongly associated with CM (22 SNPs, P value=  $7 \times 10^{-8}$ ). Haploview analysis of this locus identified a haplotype of 1.9 Mb that was more frequent in non-affected dogs. A second genome wide association study in a 113 GB cohort lead to the identification of another locus on chromosome 13 that was strongly associated with CM (25 SNPs , P value=  $3 \times 10^{-7}$ ). Analysis of this region identified a 4Mb haplotype that was more frequent in non-affected dogs. Our study constitutes the first essential step towards identification of the causative genes in CM. Our study provides an entry point for better understanding of the molecular genetic mechanisms underlying the pathogenesis of human CMI.

**Keywords** : Type 1 Chiari Malformation, Chiari-Like Malformation, canine model, genome wide association study, human genetic, genetic epidemiology

## Table des matières

Contenu	
Résumé .....	i
Abstract .....	ii
Table des matières .....	iii
Liste des tableaux .....	vi
Liste des figures .....	vii
Remerciements .....	ix
Liste des sigles et abréviations .....	10
1. INTRODUCTION .....	11
1.1 MALFORMATION CHIARI I (MCI) CHEZ L’HUMAIN .....	11
1.1.1. Les malformations Chiari .....	11
1.1.1.1 Historique .....	11
1.1.1.2 Présentation physiologique et symptômes de la MCI .....	12
1.1.1.3 Théories étiologiques .....	16
1.1.1.4 Traitements .....	18
1.1.2. Hérité et bases génétiques .....	20
1.1.3. Études de liaison génétique et gènes candidats .....	22
1.2 MALFORMATION CHIARI-LIKE CHEZ LE CHIEN .....	25
1.2.1. Aspects cliniques de MCL .....	25
1.2.1.1 Présentation physiologique et symptômes .....	25
1.2.1.2 Théories étiologiques .....	30
1.2.1.3 Traitements .....	31
1.2.2. Hérité et bases génétiques .....	32
1.3 MODÈLE DU CHIEN DOMESTIQUE .....	33
1.4 APPROCHES DE CARTOGRAPHIE GÉNÉTIQUE .....	37
1.5 ÉTUDES PRÉLIMINAIRES .....	40
2. BUTS ET HYPOTHÈSES .....	43

2.1 Problématique .....	43
2.2 But et hypothèse.....	44
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	45
3.1 Cohorte et extraction d'ADN.....	45
3.2 Génotypage .....	47
3.3 Analyse des données .....	48
3.3.1. Études d'association et de cartographie fine.....	48
3.3.2 Corrections pour l'inflation de l'erreur alpha et pour le biais d'admixture.....	49
3.3.3 Étude d'homozygocité .....	50
4. RÉSULTATS.....	52
4.1 Étude d'association du génome entier et cartographie fine.....	52
4.1.1 Étude d'association du génome entier et corrections .....	52
4.1.2 Région candidate locus 1 .....	56
4.1.2.1 Locus 1 sur le chromosome 2.....	56
4.1.2.2 Cartographie fine du Locus 1 .....	56
4.1.2.3 Étude d'haplotype du locus 1 .....	60
4.1.2.4 Gènes candidats du locus 1 .....	63
4.1.3 Régions candidates locus 2 à 6 .....	64
4.1.3.1 Étude d'association du génome entier locus 2 à 6.....	64
4.1.3.2 Génotypages supplémentaires des locus 2 à 6 .....	65
4.2 Étude d'association du génome entier : Cohorte 2 .....	67
4.2.1 Étude d'association.....	67
4.2.2 Étude d'haplotypes .....	68
4.2.3 Gènes candidats de la région sur chromosome 13 .....	69
4.3 Étude d'homozygocité.....	70
5. Discussion.....	73
5.1 Régions associées à la MCL .....	73
5.2 Haplotypes protecteurs .....	75
5.3 Modèle du chien.....	76

5.4 Études futures.....	77
6. Conclusion.....	79
Bibliographie .....	85

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison du chien et de la souris.....	35
Tableau 2 : Cohorte de chiens d'autres races avec de l'ADN.....	41
Tableau 3 : Description de la banque de tissus en fonction des chiens recrutés et des tissus récoltés.....	42
Tableau 4 : Description des cohortes utilisées.....	46
Tableau 5 : Comparaison des scores des 6 régions identifiées au-dessus Bonferroni après chacune des corrections appliquées .....	53
Tableau 6: Cartographie fine de la région de 2,9 Mb sur le chromosome 2 canin. Seulement les SNPs informatifs sont présentés dans ce tableau .....	58
Tableau 7 : Comparaison entre les valeurs P de la cohorte 1 et celle de la cohorte 2.....	59
Tableau 8 : Fréquence et valeur P des haplotypes reconstruits avec PHASE.....	61
Tableau 9 : Liste des gènes dans la région associée du locus 1 (85204236 bp à 87170677 bp).....	63
Tableau 10 : Valeur P des SNPs provenant du génotypage supplémentaire des locus 2 à 6.....	66
Tableau 11 : Valeur P des SNPs les plus fortement associées à la MCL dans la cohorte combinée comparativement à la cohorte 1 et à la cohorte 2.....	68
Tableau 12 : Fréquence et distribution des haplotypes à travers la cohorte totale, la cohorte sans la famille et la cohorte familiale pour la région candidate sur le chromosome 13.....	69
Tableau 13 : Gènes de la région associée sur le chromosome 13.....	70
Tableau 14 : Régions d'homozygocité dans les GB avec la plus grande divergence entre les cas et les contrôles.....	71
Tableau 15 : Régions d'homozygocité partagées par 4 races génétiquement proches.....	72



## Liste des figures

Figure 1 : Définition de la MCI.....	13
Figure 2 : Diagnostic de la MCI.....	15
Figure 3 : Définition de la MCL.....	25
Figure 4 : Définition des os du crâne chez le chien.....	26
Figure 5 : Crâne brachycéphalique contre crâne mésatycéphalique.....	28
Figure 6 : Diagnostic de la MCL.....	30
Figure 7 : Pedigree de la grande famille.....	45
Figure 8 : Graphique de type Manhattan pour l'association du génome entier.....	52
Figure 9 : Séparation des chiens selon les composantes principales avec Eigenstrat v3.0.....	55
Figure 10 : Haplotype du locus 1 selon l'étude d'association du génome entier.....	57
Figure 11 : Définition de l'haplotype du locus 1 avec les données de la cartographie fine.....	60
Figure 12 : Haplotype familiale protecteur du locus 1.....	62
Figure 13 : Définition des haplotype des locus 2 à 6.....	65

À tous les patients souffrant de la malformation de Chiari de type 1 et pour tous les chiens atteints de la malformation  
Chiari-Like

## **Remerciements**

Je tiens à remercier ma superviseuse Zoha Kibar pour tous les conseils et l'aide prodigués au cours de ma maîtrise.

Je remercie Vincent Quoc-Huy Trinh pour avoir débuté le projet et m'avoir montré les bases de l'épidémiologie génétique.

Je remercie les membres du laboratoire Kibar pour le support et les conseils prodigués.

Je remercie nos collaboratrices Clare Rusbridge et Penny Knowler pour le support offert dans le recrutement de la cohorte.

Je remercie les éleveurs et les propriétaires de chiens qui ont accepté de participer à cette étude.

Je remercie la Fondation de l'Hôpital Ste-Justine et la Fondation des Étoiles pour l'aide financière apportée à mon projet.

Je remercie les membres de ma famille qui m'ont été d'un grand support ainsi que Priti Gros qui m'a toujours amenée à me surpasser.

**Liste des sigles et abréviations**

ADCY9= Adenylate Cyclase 9  
ADN= Acide désoxyribonucléique  
AKC= American Kennel Club  
AMPc = Adénosine monophosphate cyclique  
ARN= Acide ribonucléique  
BMP= Bone Morphogenic Protein  
CKCS= Cavalier King Charles spaniel  
CR= Fréquence d'appel (call rate)  
DZ= Dizygotique  
FBN1= Fibrillin 1  
FCP= Fosse caudale postérieure  
FGFR2= Fibroblast Growth Factor Receptor 2  
FM= Foramen Magnum  
FOXP1= Forkhead Box 1  
GB= Griffon bruxellois  
GHRHR= Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor  
GWAS= Étude d'association du genome entier  
HOX= Homeobox  
Kb= 1000 paires de bases  
LCR= Liquide céphalo-rachidien  
LD= déséquilibre de liaison  
LOD= Logarithme des probabilités  
IRM= Imagerie par résonance magnétique  
MAF= Fréquence d'allèle mineure  
Mb= 1 000 000 paires de bases  
MCI= Malformation de Chiari de Type 1  
MCII= Malformation Chiari de Type 2  
MCL= Malformation Chiari-Like  
MZ= Monozygotique  
PAX= Paired box gene  
Pb= Pair de bases  
Suz12= Suppressor of Zeste 12  
SM= Syringomyélie  
SNP= Polymorphisme d'un seul nucléotide  
WTCCC= Wellcome Trust Case Control Consortium

## 1. INTRODUCTION

### 1.1 MALFORMATION CHIARI I (MCI) CHEZ L'HUMAIN

#### 1.1.1. Les malformations Chiari

Les malformations de Hans-Chiari sont un regroupement de maladies multifactorielles ayant une étiologie, une physiopathologie et une présentation clinique variées. Il en existe quatre formes, dont la seule caractéristique commune est une déformation du tronc cérébral et du cervelet<sup>1</sup>. La Malformation de Chiari de type I est causée par une herniation des amygdales cérébelleuses à travers le foramen magnum et dans le canal spinal. Elle est fortement associée à l'hydrocéphalie et la syringomyélie (SM). De plus, une origine mésodermique est soupçonnée dans cette maladie. La malformation de Chiari de type II consiste en une herniation plus prononcée entraînant des structures telles que la médulla et le quatrième ventricule. De plus, elle est associée au spina bifida et à l'hydrocéphalie. Contrairement à la MCI, les hypothèses semblent pointer vers une origine neuroectodermique. La malformation de Chiari de type III est représentée par un déplacement de la médulla et du cervelet dans un ménincoèle. Parfois, cette description est étendue de manière à incorporer les défauts osseux de la suture sagittale. Cette maladie est aussi en forte association avec l'hydrocéphalie et la malformation de Dandy-Walker. Tout comme la MCII, l'origine de la maladie semble neuroectodermique. Finalement, la malformation de Chiari de type IV est caractérisée par une hypoplasie des hémisphères du cervelet et une déformation du tronc cérébral. Ces changements entraînent une dilatation du 4<sup>ème</sup> ventricule, de la cisterna magna et des citernes basales. Cette maladie semble aussi être d'origine neuroectodermique<sup>1</sup>. Ce mémoire portera majoritairement sur la MCI qui est la forme la plus fréquente et la moins sévère.

##### *1.1.1.1 Historique*

La MCI a été identifiée la première fois par le Dr. Hans Chiari dans les années 1890. Dans cette première publication, Chiari décrit le cas d'une femme de 17 ans avec un

allongement des amygdales cérébelleuses de forme conique qui accompagne le *Medulla oblongata* dans le canal spinal<sup>2</sup>. En 1896, il a fait l'analyse de 14 cas montrant des altérations de la fosse caudale postérieure (FCP), une descente du cervelet et une élongation du 4<sup>ème</sup> ventricule dans le canal spinal. Dans cet article, il a suggéré que la MCI n'est pas seulement secondaire à l'hydrocéphalie, mais semblerait aussi causée par d'autres facteurs dont un sous-développement du crâne entraînant une augmentation de la pression intracrânienne. Par la suite, il a fait référence à un autre article paru en 1883 et écrit par Cleland<sup>3</sup>. Cet article décrivait le cas d'un enfant avec un spina bifida, une hydrocéphalie et des altérations du cervelet et du tronc cérébral. Chiari a noté une forte similarité avec le phénotype de la MCI. Il croyait à l'époque qu'il s'agissait simplement de symptômes plus prononcés de la MCI, mais on sait maintenant qu'il était question d'une maladie indépendante connue sous le nom de malformation de Chiari de type II<sup>4</sup>. Chiari remarqua aussi que l'âge d'apparition des symptômes et la sévérité de l'hydrocéphalie corrélait avec le degré d'herniation des amygdales cérébelleuses. Les symptômes neurologiques ont ensuite été reportés par Homén en 1901. C'est en 1907 que l'appellation malformation Arnold-Chiari apparaît en l'honneur de Julius Arnold qui, en 1894, avait reporté le cas d'un enfant atteint de spina bifida et ayant une descente du cervelet dans le canal spinal. Le premier traitement de la MCI a été reporté en 1932 dans une thèse écrite par Van Houweninge Graftdijk. Elle consistait à une incision de la dure-mère (couche recouvrant le cerveau et la moelle épinière) dans le but de réduire l'obstruction du flot du liquide céphalo-rachidien (LCR). Malheureusement, tous ses patients moururent à la suite de complications post-opératives.

#### *1.1.1.2 Présentation physiologique et symptômes de la MCI*

La MCI est définie par une descente des amygdales cérébelleuses de 3-5 mm à travers le foramen magnum<sup>5</sup> avec une prévalence de 1 :1280 et une pénétrance de 86% calculée à partir d'une cohorte de 175 individus affectés<sup>6</sup>. L'âge moyen de détection est de  $24.9 \pm 15.8$  ans et le diagnostic peut seulement être fait par imagerie par résonance magnétique (IRM) (Figure 1).

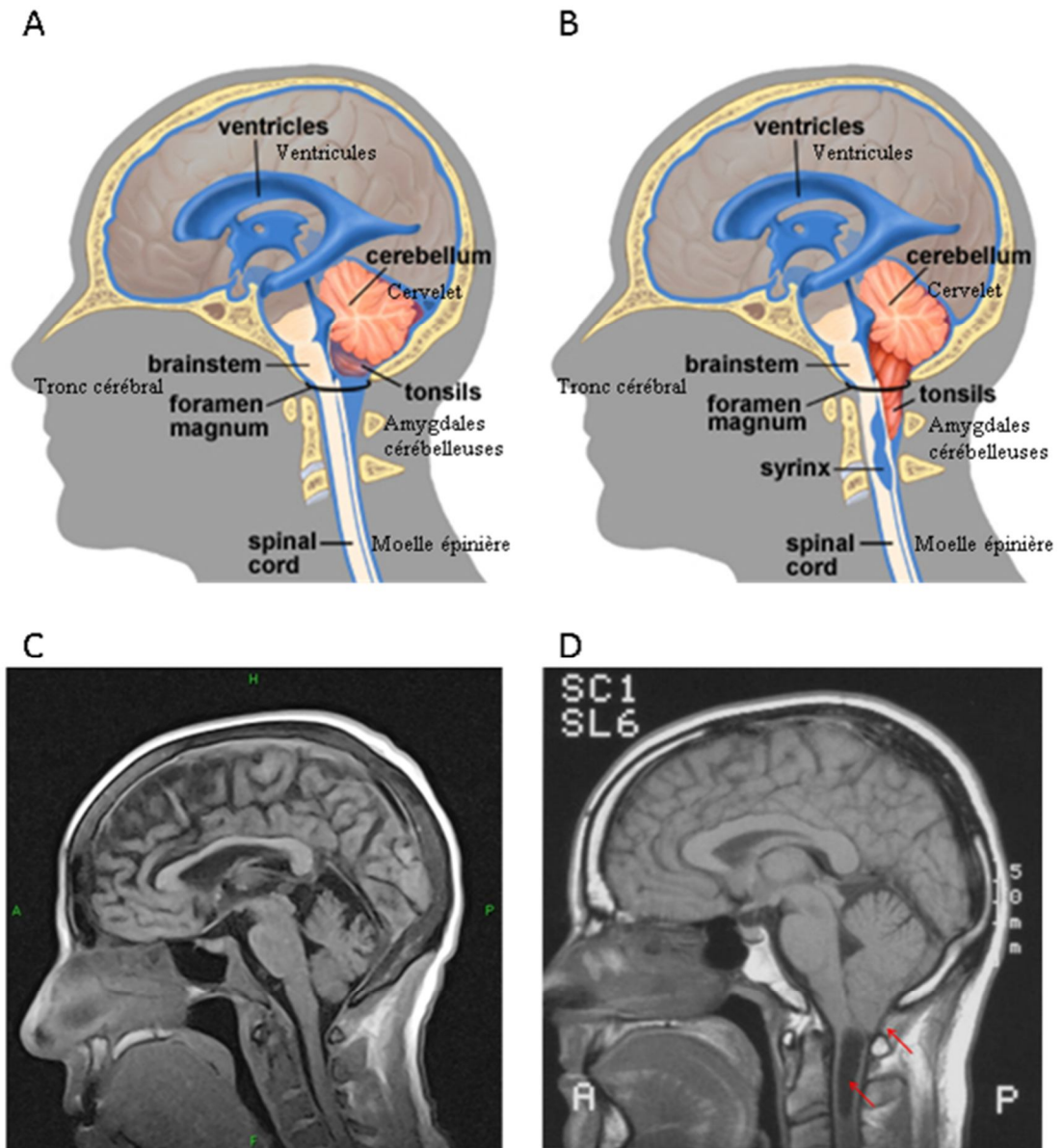


Figure 1 : Représentation graphique de (A) un patient normal (B) un patient affecté par MCI/SM..Vu sagittale du crâne (C) d'un patient normal (D) d'un patient affecté par MCI/SM. Les flèches rouges désignent l'herniation des amygdales cérébelleuses et le syrinx. (adapté de <http://www.mayfieldclinic.com/PE-Chiari.htm>, de Speer et al. 2003 et de <http://temp.wideopenminet.officelive.com/quality.aspx>)

Les symptômes les plus fréquemment associés à la MCI sont des maux de têtes (81%), des troubles oculaires (78%), des troubles otoneurologiques (74%) et des troubles de la moelle épinière, tels que la scoliose et la SM<sup>3</sup>. La SM est la complication la plus incapacitante chez la MCI. Elle est causée par une accumulation de liquide à l'intérieur du

parenchyme de la moelle épinière (nommé syrinx) suite à une obstruction du flot du LCR<sup>7,8,9</sup>. La SM est souvent vue comme une simple complication de la MCI étant donné que cette dernière est présente dans 65-80% des cas<sup>7,8</sup>. Cependant, des cas idiopathiques de SM laissent croire qu'il s'agit d'une maladie indépendante<sup>10,11</sup>. Malgré tout, l'existence de ces cas est fortement contestée. Afin d'être considérée comme idiopathique, la SM doit être indépendante de la MCI, de tumeurs et de traumatismes<sup>10,11</sup>, mais cette prémisse a été contredite par une étude ayant démontré une association entre la SM idiopathique et une fosse caudale postérieure (FCP) diminuée<sup>12</sup>. Cette caractéristique propre à la MCI a mis en doute la réelle existence d'une version indépendante de la maladie<sup>13</sup>. De plus, une autre étude a montré que deux patients ont peut-être subi des micro-traumatismes suggérant que la SM est secondaire à d'autres problèmes. Malgré tout, la plupart des cas idiopathiques restent inexplicables et démontrent simplement une vélocité accrue du liquide céphalo-rachidien (LCR)<sup>10,11,14</sup>. Ces cas seraient très rares et expliqueraient probablement moins de 1% de tous les cas de SM<sup>10,11</sup>.

L'étiologie de la MCI semble être associée à un problème d'origine mésodermique expliquant la descente des amygdales cérébelleuses<sup>7,15</sup>. Ce défaut forcerait une diminution de la hauteur moyenne de l'os supra-occipital, de la longueur du Clivus et une augmentation de la pente du Tentorium, ce qui entraîne une réduction générale du volume de la FCP<sup>7,16,17,18,19</sup> (voir Figure 2). Malgré toutes ces différences, il a été impossible d'observer une variation significative du volume intracrânien, ce qui laisse supposer une compensation dans d'autres angles. Il a été aussi prouvé que la forme du Foramen Magnum (FM) ne différait pas de la norme dans les cas de la MCI<sup>20</sup>. Cependant, une augmentation du diamètre antéropostérieur du FM dans une seconde étude suggérait plutôt un manque de puissance de l'étude initiale<sup>21</sup>. De légères déviations et une élongation du tronc cérébral ont été notées chez plusieurs patients<sup>22,23</sup>. L'hydrocéphalie a aussi été reportée dans 3 à 10% des cas et s'accompagne d'une élongation du 4<sup>ème</sup> ventricule<sup>23</sup>.



Une autre preuve en faveur de l'origine mésodermique de la maladie provient des syndromes associés à la MCI, étant donné qu'ils sont majoritairement affiliés à des anomalies osseuses. Une liste complète des maladies co-ségrégant avec la MCI peut être retrouvée à l'Annexe 1. Il est tout de même important de noter que plusieurs anomalies ectodermiques sont aussi présentes dans la MCI, mais sont souvent peu marquées.

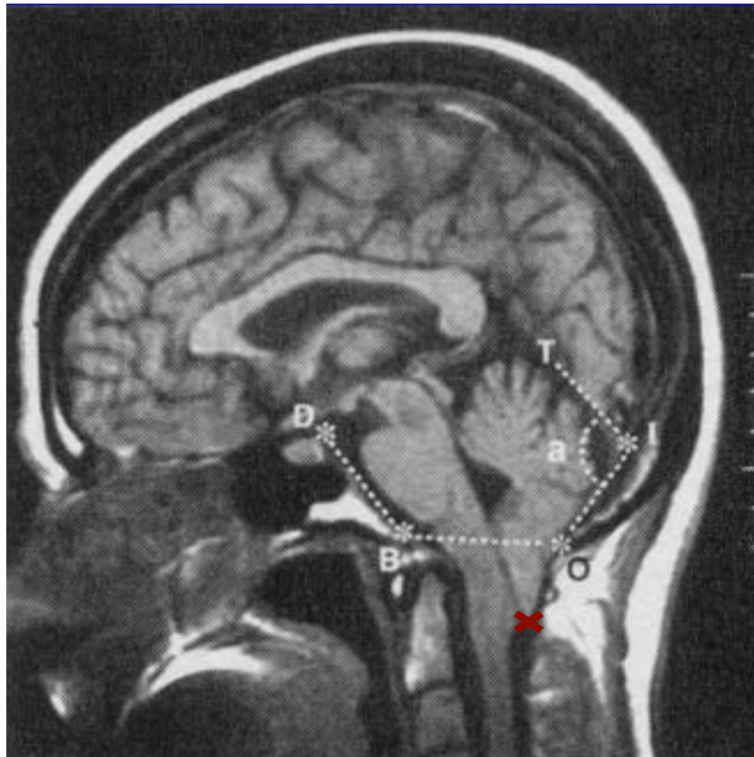


Figure 2: La longueur de l'os supra-occipital (IO) est mesurée à partir du centre de la protubérance interne occipital (I) jusqu'à l'Opisthion (O). La longueur du Clivus (DB) est mesurée du dorsum sella (D) au Basion (B). La pente du Tentorium (T) est calculée en mesurant l'angle (a) formé par le Tentorium et l'os supra-occipital. Le niveau d'herniation est mesuré à partir du bout des amygdales cérébelleuses (X) jusqu'à la ligne entre le Basion (B) et l'Opisthion (O). (Adapté de Milhorat et al. 1999).

### *1.1.1.3 Théories étiologiques*

La cause principale de la MCI reste à ce jour inconnue. Plusieurs théories visent à expliquer l'étiologie de cette pathologie, dont certaines sous-entendent une atteinte du mésoderme et d'autres, du neuro-ectoderme.

La première théorie mésodermique repose sur l'idée que la malformation est conditionnelle à une insuffisance du mésoderme para-axial après la fermeture du tube neural. Ceci entraîne un sous-développement des os basi-chondrocraniens, résultant en une FCP courte et peu profonde. Cette théorie a pris ses bases dans le seul modèle animal de la MCI, dont la création consiste à injecter une seule dose de vitamine A à des hamsters durant le 8ème jour de gestation. En revanche, le modèle ne reproduit pas l'herniation des amygdales cérébelleuses, ce qui met en doute sa validité<sup>16,24,25</sup>. La deuxième théorie d'origine mésodermique affirme qu'une réduction de la taille de la FCP et de la longueur du Clivus entraînent une diminution de l'espace réservé au rhombencéphale, causant la MCI<sup>7,18,19,26</sup>. Cette théorie est probablement la plus acceptée, étant donné la présence de ces réductions dans deux tiers des patients. Cependant, malgré le fait que la majorité des études concordent avec cette dernière, d'autres la contredisent en ne démontrant aucune anomalie de la FCP<sup>27</sup>.

La première théorie ectodermique a été initialement postulée par Hans Chiari et a été améliorée plus tard par Gardner, d'où le nom de « Théorie hydrodynamique de Gardner ». Elle propose que l'hydrocéphalie chronique supra-tentoriale soit la cause primaire de la descente des amygdales cérébelleuses. Selon Gardner, la pulsation excessive du LCR, provenant du plexus choroïde, est inégale entre le 4<sup>ème</sup> ventricule et les ventricules latéraux. Ce phénomène entraîne une pression forçant l'inclinaison exagérée du Tentorium et l'herniation du cervelet<sup>28</sup>. Cependant, Gardner fut incapable d'expliquer la réduction de la FCP et la déformation du 4<sup>ème</sup> ventricule. La seconde théorie ectodermique, nommée « surdéveloppement du rhombencéphale avec arrêt de croissance », suggère que la cause principale de la MCI est la croissance anormale des tissus neuronaux. Dans ce contexte, des anomalies du tronc cérébral et du cervelet pourraient être liées à une surcroissance de la

plaque neurale<sup>29</sup>. En revanche, cette hypothèse n'offre aucune explication pour les multiples atteintes mésodermiques reportées chez la MCI. Finalement, la théorie de la rétraction caudale supporte plutôt une traction mécanique sur le cervelet par la moelle épinière durant le développement. Cette traction pourrait être secondaire au syndrome de la moelle attachée où la moelle épinière est tendue par le filum terminal, empêchant sa croissance normale au cours du développement<sup>30,31,32</sup>. La lacune majeure de cette théorie est qu'une fois de plus, elle n'explique pas les atteintes mésodermiques associées à la MCI, mais ne justifie que l'herniation du cervelet. La rétraction caudale a initialement été critiquée avec le fait que la traction est habituellement dissipée sur trois ou quatre segments de la moelle épinière. Cependant, il est maintenant connu qu'une traction distale peut affecter la région proche du crâne<sup>31</sup>.

La dernière théorie est uniquement associée à la malformation de Chiari de type II, mais elle demeure très intéressante de par son hypothèse traitant d'une origine mésodermique et ectodermique. En effet, durant le développement, la moelle épinière passe à travers une phase d'occlusion où elle est écrasée pendant au moins 2 jours. Cette occlusion permet de maintenir le LCR dans les compartiments du crâne, créant une tension sur les ventricules en développement. Ces derniers entrent alors en croissance et envoient des stimuli important favorisant la croissance du mésenchyme. Une mauvaise fermeture du tube neural, tel qu'observée dans la MCII, peut entraîner un drainage prématuré du LCR. Ceci réduit la tension sur les ventricules, causant ainsi une malformation neurale associée à un problème mésodermique secondaire<sup>33,34</sup>. Quoiqu'intéressante, cette théorie n'est pas applicable dans le cas de la MCI dû à l'absence de défauts de fermeture du tube neural.

Malgré plusieurs théories intéressantes, l'étiologie de la MCI demeure nébuleuse. Aucune théorie n'est jusqu'à ce jour capable d'expliquer la totalité des problèmes morphologiques associés à cette maladie. La théorie unifiée présentée dans le cadre de la MCII ne semble pas être applicable chez la MCI. C'est pourquoi l'identification des gènes et des mécanismes moléculaires associés à la MCI est aussi cruciale. Ces derniers

pourraient donner une piste quant à la base développementale du problème et permettre par le fait-même une meilleure prise en charge des patients.

#### *1.1.1.4 Traitements*

La MCI est habituellement traitée par une décompression sub-occipitale. Cependant, dû au manque de connaissances sur l'étiologie de la maladie, plusieurs traitements expérimentaux ont été essayés avec plus ou moins de succès. Cette section traitera de tous ces traitements et fera le lien avec la théorie qui les sous-tend.

Gardner mis sa théorie en pratique par une opération effectuée sur 74 patients atteints de la MCI/SM. Sa théorie étant intimement liée à l'obstruction du LCR, il prônait une approche de libération de la tension causée par le LCR. Pour ce faire, il ouvrait le foramen de Magendie, afin de permettre la libération du LCR du 4<sup>ème</sup> ventricule et ainsi traiter le syrinx associé à la syringomyélie. Par la suite, il effectuait un élargissement du foramen magnum afin de réduire l'obstruction sub-arachnoïdienne du LCR. Après l'opération, 52 des patients avaient une réduction de leurs symptômes. Quoique la théorie de Gardner essayait d'expliquer l'herniation du cervelet, l'opération pratiquée n'a pas permis d'améliorer la présentation physiologique de la MCI<sup>28</sup>.

Un groupe prônant la théorie de l'insuffisance mésodermique a aussi essayé de traiter la MCI. La chirurgie pratiquée se nommait la nuchalectomie et avait pour but l'élargissement du FM libérant ainsi la pression dans cette zone. Cette dernière consiste à prélever une partie de l'arche occipitale postérieure. Ce type de chirurgie, bien qu'efficace dans la réduction des symptômes associés à la MCI, n'a pas réussi à régler de manière permanente le problème. Elle semblait cependant réduire l'apparition de l'hydrocéphalie et des complications associées à la MCI. La nuchalectomie est peu utilisée dans le cas de la MCI, mais continue tout de même à être performée chez des enfants atteints de chondrodysplasie avec une obstruction du FM<sup>24</sup>.

Basée sur la théorie de la rétraction caudale, l'opération du filum terminal est le troisième type de traitement pour la MCI. Cette chirurgie consiste à faire une incision au

niveau du filum terminal afin de rétablir l'élasticité de la moelle épinière. L'application de cette technique sur deux patients atteints de la MCI a donné d'excellents résultats. Un rétablissement de près de 100% des symptômes associés à la MCI et une augmentation de l'élasticité de la moelle épinière a été observé. Cette technique est toujours pratiquée dans quelques centres hospitaliers, malgré le fait qu'il ne s'agit pas de la procédure traditionnelle<sup>31</sup>.

La technique chirurgicale la plus approuvée à notre époque se nomme la décompression supra-occipitale. Cette dernière est basée majoritairement sur la théorie de la FCP réduite et a été adaptée de manière à traiter la plupart des symptômes associés. La première partie consiste à ouvrir le crâne et à enlever la partie postérieure de la première vertèbre cervicale de manière à augmenter l'espace de la FCP. Dépendant de la sévérité des symptômes, il est possible que le chirurgien ouvre la dure-mère de manière à en augmenter le volume à l'aide de dure-mère synthétique ou d'une partie du périoste. Cette technique se nomme la duraplastie. Finalement, dans le cas d'une herniation extrême des amygdales cérébelleuses, le chirurgien peut recourir à l'ablation de ces dernières<sup>35,36,37</sup>.

La chirurgie reste pour l'instant la seule technique capable de traiter la MCI. Des traitements médicamenteux des divers symptômes peuvent être proposés par le médecin. Cependant, aucun d'entre eux n'a la capacité de ralentir la progression de la maladie. Il est parfois même contre-indiqué de prendre des antidouleurs, étant donné qu'ils pourraient masquer une accentuation des symptômes qui nécessiteraient une intervention chirurgicale<sup>38</sup>.

Dans les cas asymptomatiques de la MCI, 84% des médecins préfèrent n'avoir recours à aucun traitement dû aux risques encourus par la procédure chirurgicale. Ce pourcentage s'inverse en présence d'un syrinx de 8mm, où 75% des médecins préfèrent opérer même en absence de symptômes. Dans le cas d'un patient atteint de la MCI avec des maux de tête supra-occipitaux, 46% des cliniciens décident d'intervenir<sup>39</sup>. Ces statistiques dressent un portrait de l'approche clinique face à MCI. Le fait qu'un suivi de l'évolution de la maladie est habituellement préféré à la chirurgie démontre qu'il reste beaucoup de

progrès à faire dans la recherche de traitements pour cette maladie. Une fois de plus, l'identification de la cause génétique de cette maladie permettrait de mieux en comprendre l'étiologie et d'offrir un meilleur traitement aux patients.

Le traitement des cas symptomatiques de MCI requiert une intervention chirurgicale permettant une amélioration des symptômes chez 50 à 70% des patients. Ce taux est inversement proportionnel à la période de temps séparant l'apparition des symptômes et leur traitement. Cela suggère qu'un diagnostic précoce permet une diminution plus marquée de l'intensité des symptômes après l'opération<sup>40</sup>. La découverte d'un gène prédisposant à la MCI ouvrirait la porte au développement de tests diagnostiques qui permettraient une meilleure prise en charge clinique des patients affectés et de leurs proches.

### **1.1.2. Hérité et bases génétiques**

Le premier rapport apportant l'idée de l'origine génétique de la MCI a été publié en 1983<sup>41</sup>. Aujourd'hui, il est bien accepté que l'une des causes importantes de la MCI est d'origine génétique. Les trois types d'études ayant permis d'arriver à cette conclusion sont celles de jumeaux, d'agrégation familiale ainsi que la co-ségrégation de la maladie avec d'autres maladies génétiques.

Les jumeaux monozygotiques (MZ) partagent 100% de leur génome, alors que les jumeaux dizygotiques (DZ) en partagent seulement 50%. Il est important de comprendre que les frères et sœurs sont équivalents aux jumeaux DZ et partagent eux aussi 50% de leur génome. Le but de l'étude est donc de prouver qu'il y a une concordance plus forte entre les symptômes des jumeaux MZ qu'entre ceux des jumeaux DZ, suggérant ainsi une composante génétique à la maladie. Étant donné que la MCI reste mal connue, ces études permettent de mieux définir les symptômes qui ségréguent génétiquement de ceux qui sont dus à une composante environnementale. En comparant la similarité des symptômes entre frères et sœurs atteints<sup>19,42,43,44,45,46,47</sup> à ceux des jumeaux MZ atteints<sup>48,49,50,51,52,53,54,55</sup>, il a été possible de confirmer l'importance de la composante génétique dans la MCI. En effet, la descente des amygdales cérébelleuses<sup>49,50</sup>, la dysplasie occipitale<sup>51</sup>, l'encombrement de la

FCP<sup>51</sup> et les anomalies osseuses de la FCP<sup>50</sup> sont tous des symptômes transmis génétiquement avec la MCI. Des discordances entre les jumeaux MZ ont aussi démontré que la syringomyélie et la niveau d'herniation des amygdales cérébelleuses sont fortement influencés par des facteurs environnementaux<sup>48</sup>.

Le deuxième type d'étude ayant prouvé l'origine génétique de la MCI sont les agrégations familiales. Ces études basées sur de plus grandes familles souhaitent nous informer sur la transmission de la maladie<sup>7,41,53,55,56,57,58,59</sup>. Le premier mode de transmission fut proposé en 1983, suite à l'identification d'une malformation cranio-cervicale dans trois générations d'une même famille. Cette dernière était atteinte de dysplasie occipitale et de la MCI qui semblaient être toutes deux transmises de manière autosomale dominante<sup>41</sup>. Par la suite, un mode de transmission dominant avec une faible pénétrance a été proposé<sup>7</sup> à l'aide d'une cohorte de 364 patients. L'importance de la composante génétique est devenue plus claire lorsque qu'il fut observé que 12% de ces patients connaissaient au moins un membre de leur famille avec des symptômes similaires ou avec un diagnostic de la MCI. Récemment, une nouvelle étude rétrospective sur 500 cas traités chirurgicalement pour la MCI a permis de réévaluer ce pourcentage à 3%. Cependant, les cas familiaux sont probablement sous-représentés, étant donné la faible pénétrance de la maladie. En effet, une étude familiale de 2003 rapportait que 21% des membres familiaux asymptomatiques du premier degré sont diagnostiqués avec MCI par IRM. Finalement un mode de transmission multigénique a été proposé en 2005 suite à une étude sur 3 familles affectées. La forte variabilité des modes de transmission proposés suggèrent qu'une génétique complexe est plus probable.

La dernière preuve de l'origine génétique de la MCI vient de la co-ségrégation de cette maladie avec d'autres pathologies génétiques (Annexe 1). La transmission en tandem de deux syndromes peut aussi être un signe de liaison génétique entre les deux mutations, mais la présence d'un si grand nombre de pathologies associées discrédite cette théorie. La raison est qu'il est improbable que tous les gènes associés à la MCI soient liés génétiquement aux mutations causatives d'autres pathologies. Cet aspect de la maladie

semble plutôt suggérer que le(s) gène(s) impliqué(s) dans la pathogénèse affectent plusieurs aspects du développement mésodermique et ne se limitent pas seulement à la présentation observée dans la MCI.

### 1.1.3. Études de liaison génétique et gènes candidats

À ce jour, une seule étude de liaison génétique a été effectuée sur des familles affectées par la MCI<sup>60</sup>. L'étude comportait une cohorte de 23 familles contenant 67 individus avec la MCI. Le diagnostic était basé sur des mesures de l'os occipital, l'os supra-occipital, la pente du Tentorium, le Clivus incluant l'os basi-occipital et l'os basi-sphénoïde et l'herniation du cervelet. Ceci permit d'observer que la taille de la FCP avait une forte héritabilité. Le but de l'étude de liaison est d'identifier une région qui ségrègue fortement avec les individus affectés. C'est ainsi que la région 9q21.33-33.1 a été identifiée par liaison multi points et que la région 15q21.1-22.3 a été identifiée par liaison deux points. Les auteurs ont aussi rejeté deux régions sur les chromosomes 1 et 2. L'investigation de ces régions a permis d'identifier le gène *Fibrillin 1 (FBNI)* sur le chromosome 15. *FBNI* est un constituant des microfibrilles et se distribue dans les tissus élastiques et non-élastiques à travers le corps. La protéine lie le calcium et se dimérise, ce qui lui permettrait de réguler la formation du réseau de microfibrilles<sup>61,62,63</sup>. Le gène est particulièrement intéressant, étant donné son association au syndrome Shprintzen-Goldberg qui co-ségrègue avec la MCI.

D'autres gènes ont aussi été proposés comme candidats pour la MCI à la suite de diverses études. Les gènes Homeobox (*Hox*) ont été postulés suite à une étude de surexpression chez les souris. Le modèle murin a développé des symptômes similaires à la MCI, tels que des défauts de formation de l'atlas, de l'os occipital et du basi-sphénoïde<sup>64</sup>. De plus, une étude plus récente sur *Hox 2-3* suggère que ces gènes pourraient être importants dans le développement de la MCI<sup>65</sup>. Les gènes *Hox* sont des morphogènes qui permettent la différenciation de cellules identiques en divers types cellulaires en fonction de sa concentration. Tous les gènes Homeobox ont leur propre région d'action. Par exemple, les gènes *Hox 2-3* sont importants dans la différenciation des cellules du cou et des épaules<sup>65</sup>.



Par ailleurs, l'importance des gènes *Paired Box Gene (Pax)* dans la différenciation du tube neural et des structures avoisinantes a été démontrée chez le poulet et la souris<sup>66,67,68</sup>. Ces gènes encodent des facteurs de transcription important durant l'embryogénèse<sup>69</sup>. L'identification d'une mutation de *Pax 1* dans le syndrome de Klippel-Feil<sup>70</sup> et son importance dans le développement vertébrale en a fait un candidat intéressant pour la MCI<sup>68</sup>. De plus, une mutation dans le gène *Pax2* chez un patient avec une MCI secondaire à une autre maladie a confirmé la candidature de ces gènes<sup>68</sup>. Finalement le gène *Noggin*, qui est un inhibiteur des *Bone Morphogenic Protein (BMP)*, a un patron d'expression qui se limite à la notochorde, aux somites dorsaux et aux chondrocytes immatures<sup>71</sup>. Cependant, une étude sur 33 patients atteints de la MCI n'a identifié aucune mutation dans le gène *Noggin*<sup>57</sup>.

En plus de ces gènes candidats pouvant être liés au phénotype de la MCI, d'autres gènes ont été identifiés dans différents patients arborant une panoplie de symptômes dont la MCI. Le gène *Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2)* a été associé à la maladie de Crouzon chez un patient avec la MCI/SM<sup>69</sup>. *FGFR2* est un récepteur des facteurs de croissance et est important dans le développement embryonnaire et dans la réparation de tissus<sup>66</sup>. Une délétion de la région 5p22.3 a été trouvée chez un enfant avec plusieurs anomalies congénitales dont la MCI<sup>72</sup>. Un article a relevé une mutation dans *Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor (GHRHR)* chez des patients atteints de déficience isolée en hormone de croissance en combinaison avec la MCI<sup>73</sup>. Ce gène a un rôle important dans la synthèse et la sécrétion d'hormone de croissance dans la glande pituitaire<sup>74</sup>. L'haploinsuffisance du gène *Suppressor of Zeste 12 (SUZ12)* de la famille des polycombs cause des malformations du cerveau et du tube neural similaires à la MCI<sup>75</sup>. Il s'agit d'une protéine de remodelage de la chromatine importante dans le développement embryonnaire<sup>76</sup>. L'haploinsuffisance des gènes *Adenylate Cyclase 9 (ADCY9)* et *Sarcalumenin (SRL)* a été postulée comme cause probable du syndrome Rubinstein-Taybi en association avec la MCI<sup>77</sup>. En effet, *ADCY9* catalyse la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). De plus, *SRL* avait à l'époque une fonction inconnue, mais est maintenant associé au développement cardiaque. Finalement, l'haploinsuffisance

du gène *Forkhead Box 1 (FOXP1)* a été associé à un patient avec un retard du développement moteur, un problème de langage sévère et la MCI<sup>78</sup>. *FOXP1* est un répresseur de transcription jouant un rôle important dans la différenciation des monocytes et des macrophages.

## 1.2 MALFORMATION CHIARI-LIKE CHEZ LE CHIEN

### 1.2.1. Aspects cliniques de MCL

#### 1.2.1.1 Présentation physiologique et symptômes

La malformation canine a été découverte beaucoup plus récemment que la MCI chez l'humain. Le premier cas de malformation Chiari-like (MCL) a été reporté en 1997 chez trois chiens brachycéphaliques atteints d'hydromyélie<sup>79</sup>. Par la suite, l'observation d'une herniation du cervelet, la présence d'hydrocéphalie et l'association à la SM chez le Cavalier King Charles Spaniels (CKCS) a permis de faire le parallèle entre cette malformation et la MCI humaine<sup>80</sup>.

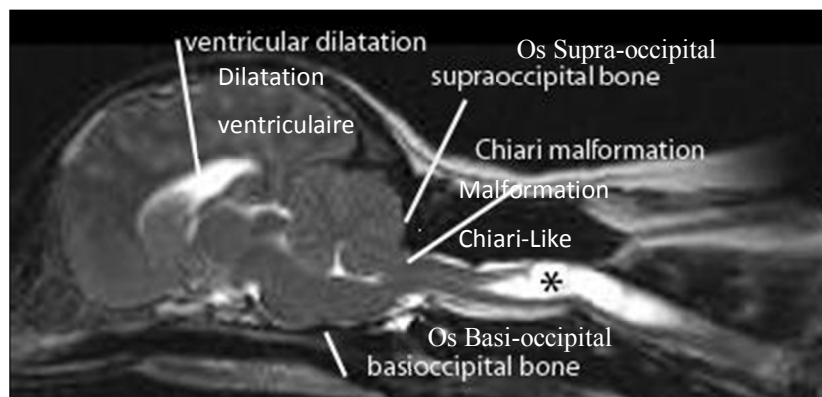


Figure 3 : IRM sagittal d'un CKCS atteint par MCL/SM (adapté à partir <http://sm.cavaliertalk.com/diagnosing/diagnosing/infosheet.html>)

La MCL représente une anomalie congénitale de la jonction crano-vertébrale chez plusieurs races de chiens. Elle semble être causée par un sous-développement de la FCP dû à une hypoplasie de l'os occipital. La pression causée par la disparité de taille cerveau/FCP résultante, entraînerait une herniation du cervelet (le chien ne possédant pas d'amygdales cérébelleuses) à travers le foramen magnum, créant simultanément une obstruction du flot du LCR. Il a été postulé que cette obstruction cause une infiltration de liquide dans la moelle épinière causant la SM. Tout comme pour l'humain, la diagnostique est seulement possible par IRM<sup>81</sup>(Figure 3).

Les symptômes associés à la MCL sont surtout dus à la présence d'un syrinx (cavité de liquide causé par la SM) au niveau de la moelle épinière. Chez les chiens affectés, la douleur est retrouvée au niveau du cou et est particulièrement intense lors des changements de posture. De plus, une hypersensibilité de la peau au niveau de l'épaule cause une sensation de picotement amenant l'animal à gratter cette région. Il arrive parfois que le mouvement associé au grattement soit fait sans faire de contact avec la peau causant un symptôme connu sous le nom de « grattement fantôme »<sup>80</sup>. Ce symptôme semble être un signe de douleur neuropathique. Il serait le résultat de l'endommagement des cellules de la corne postérieure qui est le centre de relais de l'information sensorielle<sup>82,83</sup>. Ces dommages pourraient aussi expliquer les cas de faiblesses musculaires et de parésie.

Un autre symptôme associé à la MCL est la scoliose<sup>80</sup>. Une théorie explique le lien entre la scoliose et la MCL. Les dommages à la matière grise de la moelle épinière causés par la SM pourraient entraîner un problème de transmission des signaux afférents résultant en un déséquilibre musculaire<sup>84,85</sup>. Ce déséquilibre musculaire lié à l'atrophie de certains muscles serait la cause de la scoliose. Ce phénomène a été observé chez le cheval et chez les singes, mais un tel mécanisme pathogénique pourrait aussi être à l'origine de l'association entre la MCL et la scoliose chez le chien. Par opposition, l'observation de patients atteints de la MCI et de scoliose en absence de SM chez l'humain met cette hypothèse en doute. Quoiqu'il s'agisse d'organismes différents, un second mécanisme

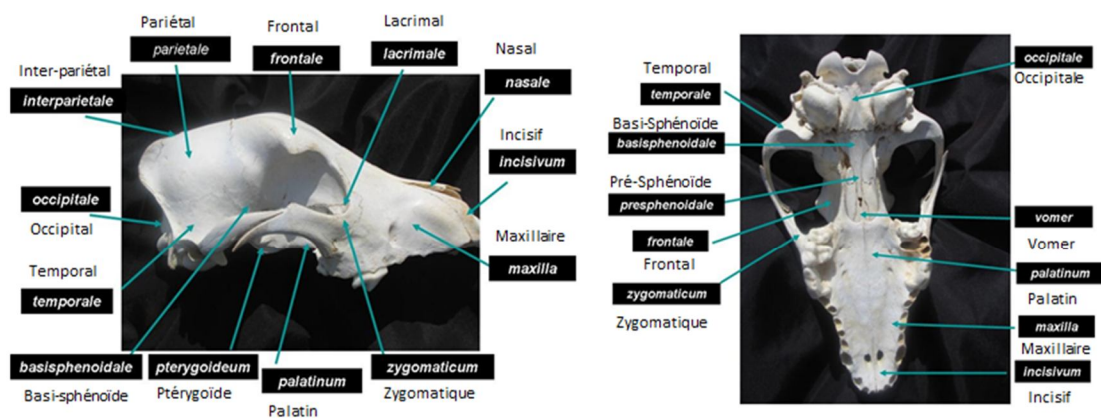


Figure 4: Définition des os du crâne chez un chien mésachyphalique. (Adapté de <http://itsicmzoology.wordpress.com/article/the-skull-of-the-dog-2lu56ivs d9r6u-6/>)

pathologique pourrait être à l'origine de la maladie chez les chiens<sup>86</sup>. Il est aussi possible d'observer d'autres symptômes plus rares tels que la paralysie faciale, la surdité et les crises d'épilepsie<sup>83,87</sup>.

La MCL est une maladie qui est retrouvée chez plusieurs races de chiens, mais la forte prévalence de la maladie chez les CKCS et les Griffon Bruxellois (GB) en ont fait des modèles d'étude très intéressants. Ces deux races partagent un ancêtre commun, une petite stature et une caractéristique physiologique connue sous le nom de brachycéphalie. Premièrement décrit par Stockard, le crâne brachycéphalique du GB est disproportionnellement large et sphérique avec une face aplatie et une mâchoire inférieure courte. Il remarqua par la suite que ces chiens souffraient d'un sous-développement des os basi-occipitaux et basi-sphénoïde (Figure 4) causant un rétrécissement de l'axe basi-cranien<sup>88</sup>. Ce phénotype qu'il nomma brachycéphalie semble être dû à la fusion prématurée des sutures du crâne<sup>89,90,91</sup>. En effet, ce phénomène forcerait une compensation au niveau de la largeur entraînant la formation d'un crâne plus large que long. Une étude comparant le CKCS (brachycéphalique) au labrador (non-brachycéphalique) a permis de conclure que la FCP était statistiquement plus petite chez les chiens brachycéphaliques<sup>92,93</sup> (Figure 5<sup>94</sup>).

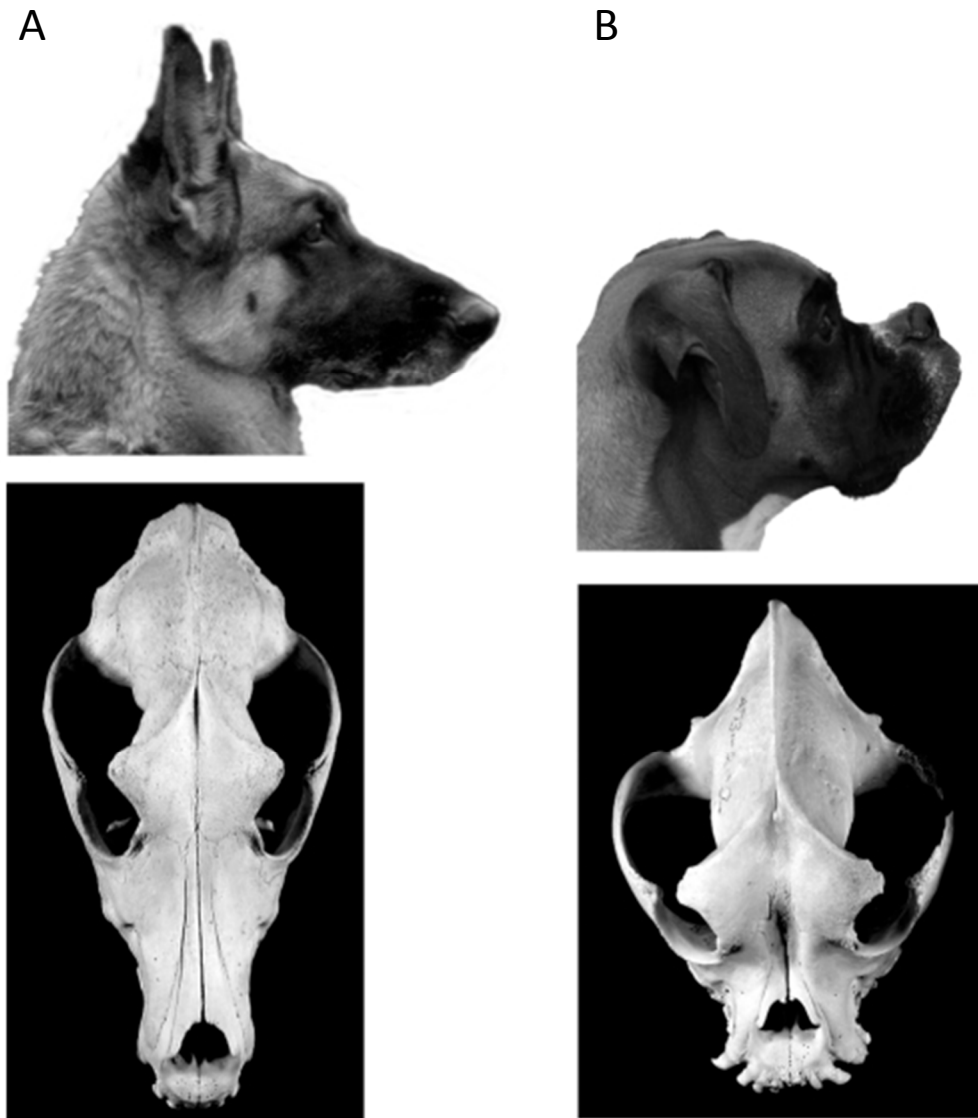


Figure 5 : Comparaison d'un chien brachycéphalique et d'un chien mésatycéphalique (A) Chien mésatycéphalique (B) Chien brachycéphalique (Adapté de Bannasch et al (2010))

L'examen des chiens CKCS et GB avec MCL a permis d'identifier plusieurs caractéristiques propres à la malformation. Premièrement, un allongement caudal du crâne est observé et s'accompagne d'un rétrécissement des os basi-crâniens et d'un allongement des os pariétaux en présence de la MCL (figure 4)<sup>95</sup>. En plus de ces malformations d'origine mésodermique, une FCP réduite et un cerveau proportionnellement plus gros que chez les races non affectées par la MCL sont observés<sup>93</sup>. Ceci semblerait amplifier le problème et induire une pression supplémentaire sur le cervelet. Une dilatation ventriculaire est aussi fréquente chez d'autres races brachycéphaliques avec MCL. Il est souvent postulé que cette dernière peut être due à une obstruction du LCR au niveau du FM<sup>96,97</sup>. Cependant, il a été considéré qu'une légère pression sur le cerveau due à une hydrocéphalie pouvait aussi causer une dilatation ventriculaire majoritairement associée au développement de la SM<sup>98,99</sup>. Un volume de parenchyme élevé au niveau de la fosse crânienne caudale (contenant le cervelet, le pont de varole et la medulla oblongata) a aussi été reporté<sup>95</sup>.

À ce jour, aucune corrélation directe n'a été établie entre la sévérité des symptômes de la MCL et les diverses mesures morphologiques<sup>100,101</sup>. L'herniation du cervelet est cependant très importante dans le diagnostic de la MCL<sup>100</sup>. C'est pourquoi plusieurs études se sont intéressées à la corrélation entre cette dernière et d'autres mesures du crâne afin d'identifier un meilleur prédicteur du développement de la MCL. Une corrélation positive a été identifiée entre l'herniation et la taille du FM<sup>101</sup> (voir figure 6), mais aucun lien n'a été identifiée avec la taille de la FCP<sup>93</sup>. En effet, malgré la présence d'une FCP réduite chez les chiens brachycéphaliques, aucune association n'a été faite avec le diagnostic de MCL<sup>102</sup>. Une autre mesure importante dans le diagnostic de MCL est la longueur caudale crânienne. Le ratio de cette dernière avec la hauteur du crâne s'est révélé un très bon prédicteur de la MCL<sup>95</sup>. Malgré ces études, le diagnostic de la MCL reste laborieux et l'évolution de la maladie est très difficile à prédire.

Comme chez l'humain, il est possible de voir que les symptômes associés à la MCL atteignent des tissus ectodermiques et mésodermiques. De plus, l'apparition des symptômes semble être un combiné de tous les problèmes morphologiques discutés plus haut. L'absence d'un test diagnostique efficace supporte une fois de plus l'importance d'identifier un/des gène(s) causatif(s) afin de mieux identifier les porteurs et réduire l'incidence de cette maladie.

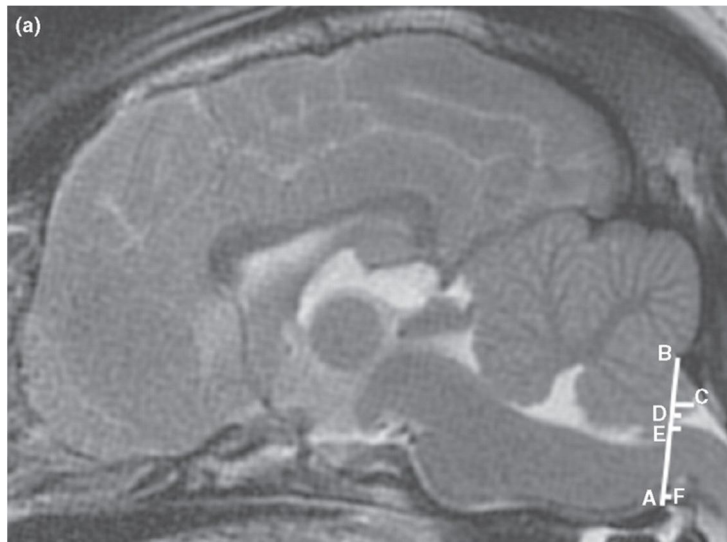


Figure 6 : Image sagittale d'un cerveau de CKCS avec une herniation du cervelet. Méthode pour mesurer le niveau d'herniation. La hauteur du foramen magnum (A,B) est mesurée à partir de l'os supra-occipital (B) jusqu'à l'os basi-sphénoïde caudale (A) et la longueur de l'herniation est mesurée du côté caudal (C). La largeur du tronc cérébral est mesurée en suivant la ligne du foramen magnum (E,F) et l'espace du LCR est mesuré entre le tronc cérébral et le cervelet (D,E) (adapté de Upchurch et al (2011))

### 1.2.1.2 Théories étiologiques

Tout comme chez l'humain, l'étiologie de la malformation canine reste inconnue. La plupart des théories humaines sont aussi applicables chez le chien, cependant certaines de ces théories ont été revues afin de mieux s'adapter à la MCL. La théorie la plus proche de la pathologie canine semble être celle de Marin-Padilla et al<sup>24</sup>. Cette dernière suggère un



sous-développement des os basi-chondrocraniens, ce qui ressemble fortement à la présentation canine. L'adaptation de cette théorie au modèle canin s'est faite en suggérant une fusion prématurée des sutures lambdoïdes et celles de la base crânienne<sup>90,91</sup>. La craniosténose (fusion prématurée des sutures crâniennes) entraînerait une réduction des os basi-occipital, supra-occipital, basi-sphénoïde et pré-sphénoïde résultant en une diminution de la base crânienne (voir figure 4). Cette réduction chez des chiens préalablement brachycéphaliques pourrait entraîner une réduction de la FCP compensée par un allongement des os pariétaux afin d'adapter l'encéphale<sup>89,90,91</sup>. Une telle compensation a aussi été observée chez l'humain<sup>103</sup>. En effet, une compensation similaire au niveau de l'os supra-occipital permettrait d'adapter le cervelet, mais son absence semble être causée par le fait que le développement osseux de la FCP se produit en même temps que la croissance de l'encéphale, mais serait indépendant de la croissance du cervelet. Donc, lors de la formation du cervelet, ce dernier se retrouverait dans une FCP déjà formée et devrait alors s'adapter à l'espace qui lui est alloué<sup>104</sup>. Quoiqu'intéressante, cette théorie ne permet pas d'expliquer le surdéveloppement du cerveau associé à la MCL<sup>93</sup>. En réponse à ce problème, il serait possible de promouvoir la théorie du surdéveloppement du rhombencéphale, mais cette dernière ne pourrait toujours pas expliquer les atteintes mésodermiques.

### *1.2.1.3 Traitements*

Malgré l'existence de plusieurs études affirmant que les symptômes associés à la MCL peuvent être réduits par l'administration de glucocorticoïdes<sup>80</sup>, le seul traitement efficace demeure la chirurgie. Contrairement à l'humain, il n'existe qu'une seule chirurgie approuvée comme traitement de la MCL. La décompression cervicale est majoritairement effectuée en présence de symptômes associés à la SM qui sont suffisamment prononcés pour justifier une procédure invasive<sup>105</sup>. Il a été observé que cette procédure chez le CKCS ne permettait que de réduire partiellement la douleur associée à la MCL<sup>105,106</sup>.

La procédure est très similaire à la décompression cervicale humaine. Le crâne est ouvert de manière à exposer l'os supra-occipital et l'atlas. Par la suite, le chirurgien procède à l'ablation d'une partie de l'os supra-occipital et de la partie caudale de la première

vertèbre. Ceci permet d'augmenter l'espace au niveau du foramen magnum limitant ainsi l'obstruction du LCR. Par la suite, la dure-mère est incisée permettant d'augmenter le volume de l'enveloppe cérébrale à l'aide d'une matrice de collagène biocompatible<sup>105,106</sup>.

La mortalité associée à cette opération est très basse et une amélioration notable des symptômes est observée. De plus, les chiens peuvent redevenir actifs seulement 4 semaines après la procédure. Cependant, les symptômes de douleurs neuropathiques ne disparaissent jamais complètement et près de la moitié des chiens voient une détérioration de leurs symptômes, moins de 3 ans après la chirurgie<sup>105</sup>.

### **1.2.2. Hérité et bases génétiques**

Les CKCS possèdent une prévalence de la MCL de près de 95%, alors que celle de SM varie selon l'âge : 25% à 12 mois et 70% à 36 mois<sup>107</sup>. La race des GB possède un ancêtre commun avec le CKCS. La prévalence de la MCL dans cette race est de 61%, alors que celle de SM est de 38%<sup>95</sup>. La pénétrance de CM/SM est évaluée à 15%. Il est intéressant de noter que malgré la preuve d'une implication importante de la MCL dans l'apparition de la SM, près de 22 % des chiens ont une SM idiopathique suggérant d'autres facteurs causatifs<sup>95</sup>.

L'héritabilité de la SM a été étudiée à l'aide des lignées de 30 cas MCL/SM confirmés par IRM chez les CKCS. La généalogie de ces 30 cas a permis d'identifier 4 chiens fondateurs unissant la majorité de ces CKCS. Il a aussi été conclu que la capacité de relier au moins 6 des 8 arrière-grands-parents des 30 cas à ces 4 chiens fondateurs augmentait énormément le risque de développer la SM<sup>81</sup>. Subséquemment, un cinquième fondateur a été identifié à l'aide d'une cohorte de 120 CKCS. Ceci a permis de relier la totalité des chiens affectés à ces 5 chiens fondateurs, alors que seulement 30% des non affectées provenaient de ces lignées. De plus, il a été observé que le phénotype semblait s'intensifier et les symptômes semblaient apparaître plus tôt avec chaque génération qui passe<sup>97</sup>. À la suite de ces études, les auteurs ont proposé que la présence d'un rejeton affecté provenant de deux parents non affectés favorise l'idée d'un mode de transmission

récessif. Cependant, la transmission irrégulière pointe plutôt en direction d'une maladie complexe<sup>81,97</sup>. Malgré le fait que ces études sont sur la SM, elles demeurent intéressantes et permettent de mieux comprendre la génétique de la MCL.

### **1.3 MODÈLE DU CHIEN DOMESTIQUE**

Durant le dernier siècle, la génétique a été un outil puissant permettant de mieux comprendre l'étiologie de diverses maladies favorisant ainsi le développement d'un traitement approprié. Les grands succès de la génétique sont presque exclusivement reliés à des maladies à transmission mendélienne. Cependant, nous entrons aujourd'hui dans l'ère des maladies complexes. L'investigation de telles maladies nécessiterait des cohortes homogènes et très larges. Ceci est dû à la présence d'effets modérés causés par une grande quantité de gènes réduisant énormément la puissance des études génétiques traditionnelles. Certains groupes se sont tournés vers des modèles animaux permettant l'investigation d'une maladie complexe dans un contexte de fort effet fondateur et génétiquement homogène. Le chien est alors ressorti comme une alternative très puissante à ce problème.

Le chien possède plusieurs avantages dans l'investigation de maladies humaines. Chez l'humain comme chez le chien, les maladies apparaissent spontanément au cours de la vie et souvent avec des symptômes cliniques très similaires<sup>108</sup>. De plus, le chien diverge moins de l'humain que d'autres modèles avec un taux de substitution de 0,35 par site, comparativement à 0,51 chez la souris<sup>109</sup>. Ce taux réfère au nombre de mutations synonymes à des sites fortement conservés et qui sont différentes entre deux espèces. Il agit comme mesure de l'éloignement génétique de deux espèces. La présence d'un nombre restreint d'insertions et de duplications de segments rend le génome canin assez compact avec une taille de 2,4 GB. Cette espèce possède aussi un grand nombre de gènes très similaire à l'humain. Finalement, les chiens reçoivent souvent des traitements pour diverses pathologies telles l'épilepsie et le cancer. Leur longévité réduite entraîne donc une évolution plus rapide de ces maladies et conséquemment une réponse plus rapide sur la validité d'un traitement. Alors que certaines études cliniques prennent de 5 à 15 ans chez l'humain, elles pourraient être faites en 1 à 3 ans chez le chiens<sup>110,111</sup>. Ces thérapies

pourraient ensuite être transposées chez l'humain. Les divers avantages du modèle canin peuvent être observés dans le Tableau 1 adapté de l'article *Leader of the Pack*<sup>112</sup>.

Un autre avantage du modèle canin est qu'il possède 450 maladies génétiques identifiées dont 360 ont des caractéristiques similaires à des maladies humaines communes<sup>113,114,115,116,117,118,119,120,121,122</sup>. En effet, ce modèle a démontré son efficacité dans l'investigation de maladies mendéliennes canines<sup>123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137</sup> incluant des maladies de déficience immunitaire, de narcolepsie, de maladies métaboliques, de cancer, de fonction immunitaires, de vision et d'épilepsie. Il s'agit tous de maladies complexes chez l'humain qui sont transmises de manière mendélienne chez le chien, ce qui facilite l'identification de gènes causatifs.

Cette réduction de la complexité génétique chez le chien provient de son histoire. Le chien moderne est le résultat de deux effets fondateurs. Le premier eut lieu il y a de cela 15 000 ans suite à la domestication des premiers loups. Le deuxième événement est la formation des races modernes qui ont en moyenne 200 ans. Une population aussi jeune que 200 ans signifie de longs blocs de déséquilibre de liaison (LD) facilitant ainsi l'utilisation d'approches génétiques. Ces blocs mesurent quelques fois jusqu'à plusieurs mégabases ce qui est entre 40 et 100 fois plus long que la longueur moyenne chez l'humain<sup>109,138</sup>. Cependant, les 15 000 ans d'existence du chien suggèrent de petits blocs de LD. En effet, la variation entre deux races canines est de 27%, ce qui est bien supérieure à la variation humaine entre deux populations estimée de 5 à 10%<sup>139</sup>. Aujourd'hui, la population canine est séparée en 360 races à travers le monde. De ce nombre, près de 160 races sont reconnues par l'American Kennel Club (AKC) comme étant des races pures<sup>140</sup>. Cette association impose des critères de reproduction très strictes pour le maintien des races pures, ce qui permet ainsi une conservation de l'homogénéité génétique acquise par les deux effets fondateurs<sup>113,114,115,116,117</sup>.

Tableau 1 : Comparaison du chien et de la souris

Considérations	Souris	Chien
Traits intéressants	Maladies variées, (souvent monogéniques) morphologie et comportement	Morphologie, comportement, et maladies (incluant l'épilepsie et le diabète)
Similarité au phénotype humain	Quelques fois	Souvent
Soins vétérinaires et informations	Seulement souris de laboratoire	Oui
Environnement partagé avec humains	Non	Oui
Pédigrées	Oui	Oui
Possibilité d'études fonctionnelles	Oui	Non
Type de population	Lignées consanguines	Races
Effets fondateurs	Il y a 100 ans	Il y a 15 000 ans et 200 ans
Déséquilibre de liaison	Long	Long et court
SNPs connus	Oui	Oui
Outils	SNPs et haplotypes. Puces de génotypage du génome entier	Puces de génotypage du génome entier

Les caractéristiques discutées préalablement permettent de définir une approche génétique en deux étapes. La première étape est l'étude d'association dans une race pure. Cette dernière utilise la puissance associée aux larges régions de LD, augmentant ainsi l'homogénéité génétique et diminuant la stratification populationnelle. Un long LD permet de faire une étude d'association du génome entier (GWAS) en utilisant seulement 30 000 marqueurs polymorphiques, alors qu'une étude humaine de la même ampleur en nécessiterait plusieurs centaines de milliers<sup>138</sup>. La deuxième étape utilise la forte variabilité entre les races afin de réduire la région d'investigation. Il arrive fréquemment que deux races se retrouvent avec une mutation commune transmise par un ancêtre commun. L'analyse de ces deux races ensemble permet alors de réduire la taille des blocs de LD et de cibler plus précisément l'emplacement de la mutation causative<sup>139,141</sup>.

Le modèle du chien a aussi fait ses preuves comme modèle puissant pour les études génétiques des maladies complexes<sup>94,142,143,144,145,146,147</sup>. La puissance du modèle canin est démontrée dans une étude sur le lupus érythémateux disséminé chez la race des Retrievers de la Nouvelle-Écosse. À l'aide de 81 cas et de 57 contrôles génotypés avec 22 000 polymorphismes d'un nucléotide (SNPs), les auteurs réussirent à identifier cinq régions statistiquement associées à la maladie<sup>143</sup>. En comparaison, une étude sur le lupus érythémateux disséminé chez l'humain contenant 1311 cas et 1783 contrôles génotypés avec 500 000 SNPs réussit aussi à identifier cinq loci associés<sup>148</sup>. Une autre étude faite sur une cohorte de 915 chiens provenant de 173 races différentes et génotypés avec 60 000 SNPs, a identifié 51 régions génomiques, expliquant une forte proportion de la variation dans 57 traits canins<sup>144</sup>. En comparaison, une méta-analyse humaine de 183 727 individus réussit à identifier 180 loci expliquant à peu près 10% de la variabilité de la taille chez l'humain<sup>149</sup>. Plusieurs autres études de ce type ont été effectuées aux cours des dernières années, ce qui démontre la puissance du modèle canin dans l'investigation de maladies complexes.

Malgré tous ces avantages, ce modèle possède néanmoins quelques limitations. La première est le manque de connaissance sur la formation de la race. Aucune association ne régule les accouplements dans le but de créer une nouvelle race. Ceci fait en sorte que l'origine ancestrale de plusieurs races est nébuleuse, compliquant l'utilisation de plusieurs races dans une même étude. Deuxièmement, les chiens ne sont sous aucun contrôle scientifique. Contrairement aux souris et aux rats, la reproduction des chiens est laissée aux éleveurs qui souhaitent souvent conserver certains traits aux dépens d'une propagation d'une maladie génétique dans la race. Finalement, la reconstruction de familles canines est parfois difficile étant donné que la plupart des chiens sont vendus à des particuliers. Ces limitations sont cependant minimales, comparativement à tous les avantages du modèle canin<sup>112</sup>.

#### **1.4 APPROCHES DE CARTOGRAPHIE GÉNÉTIQUE**

Tel que discuté précédemment, plusieurs types d'approches génétiques peuvent être utilisées chez le modèle canin. Cette section aura pour objectifs d'explorer les diverses études possibles et d'en expliquer la logique.

Les premières approches génétiques se sont concentrées sur les traits mendéliens qui étaient plus faciles à investiguer. C'est ainsi qu'est née l'étude de liaison. Cette dernière vise à identifier un allèle d'un marqueur qui ségrège fortement avec la maladie dans une famille. Pour ce faire, cette technique utilise une formule simple qui consiste à diviser la probabilité qu'un allèle ségrège avec la maladie en présence de liaison sur la probabilité qu'il ségrège en absence de liaison. Le logarithme en base 10 de cette valeur (LOD) nous permet alors d'obtenir de l'information sur la force de la liaison. Un LOD au-dessus de trois permet de définir une liaison étant donné qu'il n'y a qu'une chance sur 1000 d'accepter un faux positif. Un LOD sous -2 permet quant à lui de rejeter l'hypothèse de liaison<sup>150</sup>. Par ailleurs, ce type d'étude est divisé en deux catégories. Les études de type paramétriques infèrent un modèle de transmission et une pénétrance. Par opposition, les études de type non-paramétriques ne préconçoivent aucun modèle, les rendant moins puissantes dans la découverte de liaison, tout en étant résistantes aux erreurs dans la

définition du modèle de transmission<sup>150</sup>. Les grandes réussites associées à ce type d'étude chez l'humain comprennent la maladie d'Huntington<sup>151</sup>, la fibrose kystique<sup>152</sup>, l'hypertension<sup>153</sup>, etc. L'idée de cette technique a été développée en 1955<sup>154</sup>, mais est encore utilisée aujourd'hui. Chez le chien, ce type d'étude est peu utilisé dû à la difficulté de recruter des familles complètes et aussi dû à l'homogénéité génétique chez les chiens non-reliés.

L'étude d'homozygoté permet d'investiguer les maladies mendéliennes à transmission récessives. Elle consiste à identifier les régions d'homozygoté qui sont présentes chez les affectés et absentes chez les non affectés dans une population consanguine. En effet, la consanguinité augmente les chances que la mutation causative se retrouve dans un bloc d'homozygoté<sup>155</sup>. Tout comme l'étude de liaison, l'approche d'homozygoté est souvent abandonnée au profit du GWAS chez le chien (décrit en détails dans le paragraphe suivant), mais plusieurs succès ont tout de même été rapportés<sup>156,157,158,159,160,161,162,163</sup>.

Le troisième type d'étude génétique nommé est l'étude d'association à l'échelle du génome entier (GWAS : Genome-Wide Association Studies) est utilisé afin d'investiguer les maladies complexes. Le but dans ce genre d'étude est d'identifier un variant avec un effet fort expliquant un pourcentage de la variabilité d'une pathologie. L'hypothèse sous-jacente est qu'un allèle d'un marqueur sera en LD avec la mutation causative et qu'il sera transmis avec cette dernière plus souvent chez les cas que chez les contrôles. Le LD est défini comme une combinaison d'allèles observée plus ou moins souvent qu'elle ne le devrait, selon une ségrégation aléatoire. Ceci signifie qu'un allèle d'un marqueur et une mutation en LD co-ségrègeront plus souvent qu'ils ne le devraient par chance. Les GWAS peuvent être effectuées au niveau d'une population (étude cas-contrôle) ou des familles (étude familiale). L'étude familiale a l'avantage d'offrir une forte homogénéité génétique et d'éviter le problème de stratification populationnelle, mais réduit le nombre d'individus que l'on peut recruter. C'est pourquoi l'étude cas-contrôle est la plus utilisée chez l'humain comme chez le chien. Cette dernière consiste à recruter des cas et des contrôles non-reliés,



facilitant ainsi la formation d'une grande cohorte<sup>150</sup>. Ce type d'étude est particulièrement favorisé chez le chien où le recrutement de cas et de contrôles provenant de la même race pure permet d'obtenir une homogénéité génétique comparable à une étude familiale, sans les inconvénients reliés au recrutement de la cohorte. À ce jour, l'un des plus grands succès de GWAS est l'étude du Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) en 2007 qui permit d'identifier des loci associés à des maladies complexes telles que le diabète de type 1 et 2, l'athérosclérose, l'athérombose, l'obésité, l'arthrite rhumatoïde et bien d'autres<sup>164,165,166,167,168,169,170,171</sup>. Le modèle canin possède aussi son lot de succès avec ce genre d'étude tel que démontré dans la section précédente<sup>94,142,143,144,145,146,147</sup>.

Les trois études précédentes reposent toutes sur l'utilisation de marqueurs génétiques. Ces derniers sont des variations normales du génome pouvant être génotypés, ce qui permet ainsi de suivre leur transmission. Un type de marqueur est le microsatellite qui représente une répétition de deux, trois ou quatre nucléotides polymorphiques dans l'échantillon observé. Les microsatellites sont plus informatifs que les SNPs, étant donné qu'ils possèdent souvent plusieurs allèles. Cependant, les SNPs sont beaucoup plus utilisés de nos jours parce qu'ils sont plus fréquents dans le génome et permettent ainsi d'effectuer une cartographie beaucoup plus dense pour mieux situer la mutation causative. Un SNP est une mutation sur un nucléotide avec une fréquence de plus de 1% dans la population humaine. Une mutation plus rare que cela se nommerait un variant de un nucléotide et aurait moins d'utilité dans les études proposées<sup>150,172,173</sup>.

Chez l'humain, d'autres approches génétiques ont été développées tel que le séquençage de l'exome et le séquençage du génome entier. Le séquençage de l'exome nécessite la création de sondes spécifiques aux régions exoniques<sup>174</sup>. Le chien n'étant pas un modèle commun, de telles sondes n'existent pas, ce qui empêche pour l'instant l'utilisation de cette approche. Le séquençage du génome entier n'a pas ces restrictions et pourrait être utilisé chez les chiens. Cependant, le prix élevé de la technique réduit son utilisation. Ces techniques intéressantes pourront dans le futur faire progresser l'investigation de la génétique canine.

## 1.5 ÉTUDES PRÉLIMINAIRES

Dans le contexte des études génétiques de la MCL chez le GB, plusieurs étapes préliminaires ont été nécessaires. Le modèle GB est préférable au CKCS étant donné la prévalence plus faible de la maladie permettant de recruter aisément des affectés et des non affectés. En effet, le devis d'étude cas-contrôles nécessite la présence de cas et de contrôles; ce qui était impossible à obtenir chez les CKCS où la totalité des chiens sont affectés par la MCL. En collaboration avec Dr. Clare Rusbridge du Centre Vétérinaire de Stone Lion en Angleterre, une généalogie de 1262 GB sur 13 générations a été reconstruite. Sur ce nombre, 205 chiens (167 affectés et 38 non affectés) furent diagnostiqués par IRM. La généalogie contenait aussi une famille de 53 GB sur laquelle nous avons récolté l'acide désoxyribonucléique (ADN) de 19 affectés et 18 non affectés. À ce jour, l'ADN de 222 GB affectés et de 105 chiens provenant de 34 autres races brachycéphaliques a été récolté pour des études combinatoires entre le GB et le CKCS, telles que décrites dans la section 1.3 (Tableau 2). Parallèlement à la collection d'ADN, des tissus de chiens ont aussi été prélevés. En effet, ils le sont lors d'une opération ou en post-mortem et permettront de récolter de l'acide ribonucléique (ARN), qui pourrait être utile dans le cas où une mutation régulatrice est identifiée dans la MCL. Les tissus récoltés proviennent du muscle supra-occipital, de l'os occipital, du cervelet et de la moelle épinière (Tableau 3). Ces tissus semblent être les plus affectés dans la MCL et sont donc les principaux candidats dans l'investigation d'une dérégulation génique.

Tableau 2 : Cohorte de chiens d'autres races avec de l'ADN

	Total	Cas	Inconnu	Contrôle
YORKSHIRE TERRIER	4	4	0	0
WELSH SPRINGER SPANIEL	1	0	0	1
STAFFORDSHIRE BULL	3	3	0	0
SHIH TZU	2	0	1	1
SCOTTISH TERRIER	1	0	0	1
PUG	2	0	0	2
POMERANIAN	3	3	0	0
PAPILLION	3	3	0	0
NORFOLK TERRIER	1	0	0	1
MALTESE TERRIER	2	2	0	0
MALTESE	2	2	0	0
LHASA APSO	1	0	0	1
KC x CKCS	1	1	0	0
KING CHARLES	22	2	19	1
JACK RUSSEL TERRIER	1	1	0	0
IRISH STAFF TERRIER	1	0	0	1
HAVANESE	1	0	1	0
FRENCH BULLDOG	3	1	0	2
FOX TERRIER	1	0	0	1
SPRINGER SPANIEL	2	0	0	2
ENGLISH SPRINGER SPANIEL	1	0	0	1
ENGLISH BULLDOG	1	0	0	1
CORGI (PEMBROKE/SHIRE)	1	1	0	0
CROSSBREED	1	0	0	1
COCKER	1	0	0	1
COCKER SPANIEL	3	0	0	3
CKCS	2	0	0	2
CHIHUAHUA	2	2	0	0
CAVALIER/POMERANIAN	1	1	0	0
BOSTON TERRIER	3	1	0	2
BORDER COLLIE	1	0	0	1
BICHON FRISE	1	1	0	0
AUSTRALIAN TERRIER	1	1	0	0
APPENPINISHER	29	22	0	7

Tableau 3 : Description de la banque de tissus en fonction des chiens recrutés et des tissus récoltés

Races	Tissus				Statut pour la MCL		
	Muscle	Os occipital	Cervelet	Moelle épinière	Affectés	Non affectés	Inconnu
Bouvier Bernois	0	0	1	0	0	1	0
GB	3	3	2	3	3	0	0
Border Collie	1	1	1	1	0	1	0
CKCS	17	18	8	9	18	0	0
Dachshund	2	2	0	0	2	0	0
Japanese Chin	1	1	1	1	0	1	0
King Charles	1	1	0	0	0	0	1
Papillon	1	0	0	0	0	1	0
PUG	1	0	0	0	1	0	0
Yorkshire Terrier	2	2	1	1	2	0	0

## 2. BUTS ET HYPOTHÈSES

### 2.1 Problématique

Quoiqu'initialement considérée comme une maladie rare, la prévalence de la MCI chez l'humain est maintenant estimée à 1/1280<sup>6</sup>. La MCI demeure asymptomatique chez un grand nombre de cas, mais peut aussi devenir un handicap sévère. À ce jour, aucun estimé n'a été fait sur les coûts médicaux et sociaux associés à cette maladie. Cependant, les coûts associés à la chirurgie et à l'inaptitude des individus au travail laissent croire que la MCI a un impact économique important sur la société. De plus, la persistance fréquente des douleurs suite à la chirurgie cause une grande perte de la qualité de vie des individus atteints. Tous ces facteurs font de la MCI une maladie dévastatrice autant pour la société que pour l'individu, ce qui demande la découverte de nouveaux traitements plus efficaces.

La pathologie canine a aussi de graves effets. En effet, la douleur majoritairement associée à la SM chez les chiens mène souvent à leur euthanasie en absence de traitements efficaces. De fait, tout comme chez l'humain, la chirurgie permet seulement d'alléger les symptômes qui malheureusement ne disparaîtront jamais. De plus, les éleveurs de chiens dépensent des sommes très élevées pour diagnostiquer le problème par IRM afin d'essayer de réduire la prévalence de la maladie<sup>81</sup>. Ces coûts sont ensuite reflétés sur le prix de l'animal. Dans le cas de la MCL, le problème pourrait être réglé à l'aide d'un test de dépistage génétique efficace permettant ainsi de choisir des chiens non affectés pour la reproduction.

L'aspect multifactoriel de la pathologie humaine et canine rend l'identification de gènes causatifs très difficile. Malgré l'identification de deux régions liées à la pathologie humaine, aucune mutation n'a été identifiée<sup>60</sup>. L'utilisation du modèle canin a cependant l'avantage de réduire cette complexité en offrant un fond génétique très homogène<sup>112</sup>.

## 2.2 But et hypothèse

Le projet de recherche consiste à investiguer la MCL chez le GB à l'aide d'un devis d'études d'association cas-contrôles. Le but final du projet est l'identification de mutations associées à la maladie.

Notre hypothèse est que :

- (1) Des facteurs génétiques sous-tendent l'étiologie de la MCL chez le GB.
- (2) L'homogénéité génétique du GB conféré par deux effets fondateurs, ainsi que la forte prévalence de la MCL chez cette race permettra d'identifier une mutation associée à cette maladie.

À plus long terme, cette étude permettra de développer un test de dépistage de la malformation canine permettant ainsi de choisir des chiens non affectés pour la reproduction permettant ainsi d'éliminer la maladie chez les GB. De plus, la forte similarité entre la pathologie canine et humaine permet de croire que le gène associé pourra aussi être utilisé comme porte d'entrée dans l'investigation de la pathologie humaine.

### 3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 3.1 Cohorte et extraction d'ADN

Le recrutement de la cohorte de GB affectés et non affectés a été effectué à travers plusieurs cliniques vétérinaires en Australie, aux États-Unis, en Finlande, aux Pays-Bas et au Royaume-Uni. Les chiens ont tous été recrutés suite au consentement éclairé de leurs propriétaires. L'extraction d'ADN a été faite à l'aide du kit d'extraction Puregene® à partir de salive et de sang. Le phénotype est défini comme une herniation du cervelet 3mm sous le Foramen Magnum (Figure 5).

L'étude d'association du génome entier a été fait sur une cohorte de 56 GB. De ces 56 chiens, 36 sont affectés et 20 sont non affectés. Cette cohorte incluait une grande famille de 33 chiens qui contenait 18 non affectés et 15 affectés (voir Figure 7).

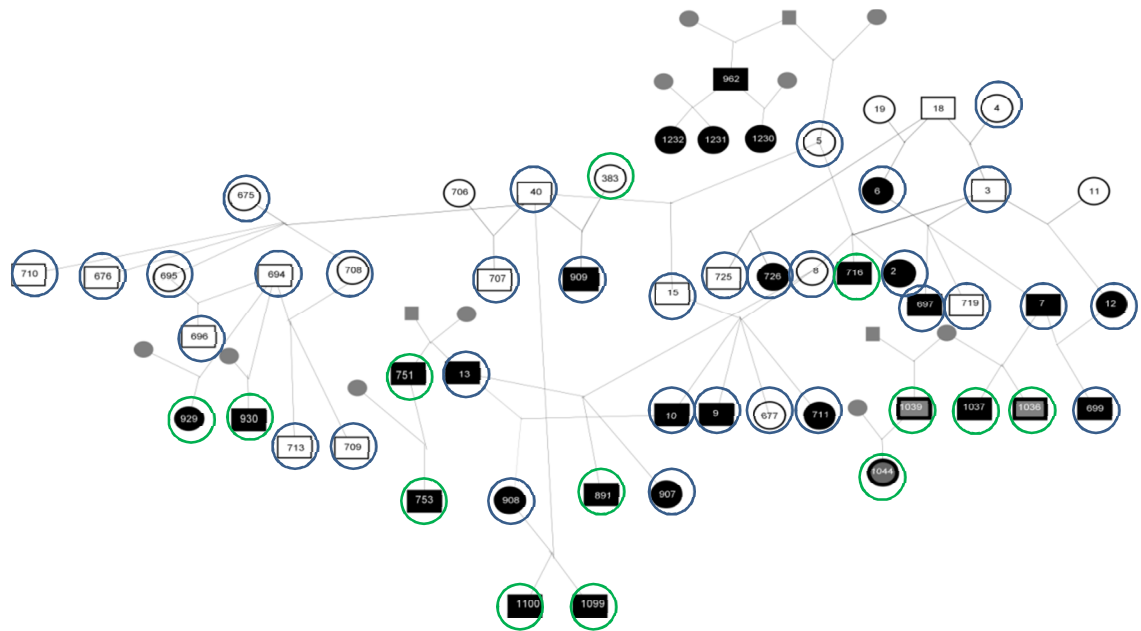


Figure 7: Représentation de la famille complète. Les cercles représentent les femelles et les carrés représentent les mâles. La couleur noire correspond aux affectés, le blanc aux non affectés et le gris signifie inconnu. Les cercles bleus représentent les individus familiaux dans la cohorte 1 et les cercles verts correspondent aux chiens présents dans la cohorte 2.

L'étude de cartographie fine subséquente a été faite à l'aide d'une cohorte composée de 217 chiens GB, 167 affectés, 37 non affectés et 13 phénotypes incertains. Cette cohorte contenait 41 membres d'une même famille qui était composée de 21 affectés, de 18 non affectés et de 2 phénotypes incertains.

La seconde étude d'association du génome entier visait l'identification d'un haplotype non restreint à la famille. Pour ce faire, deux devis d'étude ont été choisis : L'étude d'association cas-contrôles sur une plus grande cohorte et l'étude d'homozygotie sur plusieurs races affectées par MCL. Une cohorte de 140 chiens composée de 72 GB affectés, de 38 GB non affectés, de 3 GB avec des phénotypes incertains et de 27 chiens affectés d'autres races ont été utilisés. Les autres races affectées étaient réparties ainsi : 4 Affenpinscher, 4 King Charles, 5 Cavalier King Charles Spaniel, 2 Chihuahua, 3 Maltese Terriers, 3 Papillon, 3 Pomeranian, 3 Yorkshire Terrier. Toutes ces races sont affectées par MCL avec une prévalence plus ou moins élevée. Une description de toutes les cohortes utilisées dans ce mémoire est présentée au Tableau 4. Tout le recrutement a été fait par nos collaborateurs en Grande-Bretagne.

Tableau 4 : Description des cohortes utilisées

	<b>Individus</b>	<b>Études</b>
<b>Cohorte 1</b>	56 GB, 33 chiens familiaux (figure 7), 36 affectés et 20 non affectés	Étude d'association du génome entier initiale (section 4.1) et test de réplication (section 4.2)
<b>Cohorte 2</b>	57 GB, 13 chiens familiaux (figure 7), 36 affectés 18 non affectés et 3 inconnus	Test de réplication de la seconde étude d'association du génome entier (section 4.2)
<b>Cohorte 3 (1+2)</b>	113 GB, 46 chiens familiaux, 72 affectés, 38 non affectés et 3 inconnus	Seconde étude d'association du génome entier (section 4.2)
<b>Cohorte de cartographie fine</b>	217 GB, 46 chiens familiaux, 167 affectés et 37 affectés	Étude de cartographie fine (section 4.1.2.2)



### 3.2 Génotypage

36 GB affectés par MCL et 20 non affectés ont été génotypés à l'aide de la puce CanineSNP20 Beadchip d'Illumina ©. Cette technologie consiste en une puce sur laquelle se retrouvent des milliers de billes de couleurs variées, chacune attachée à un oligonucléotide spécifique. Ce dernier est spécifique à une séquence et permettra de la détecter. Suivant une hybridation et un processus d'élongation avec des nucléotides fluorescents, la puce sera lue à l'aide d'un ordinateur qui calculera le niveau de fluorescence associé à chaque bille et déterminera le génotype de l'individu pour cette séquence<sup>175</sup>.

Afin de réaliser l'étude d'association du génome entier, il a été nécessaire d'effectuer le génotypage de 22 362 sondes spécifiques à la détection de SNPs. Le programme Genomestudio a permis l'analyse de la puce et l'identification des génotypes. Tous les SNPs avec des fréquences d'appel (call rate (CR)) inférieures à 90% furent rejetées de toutes analyses subséquentes à l'aide du logiciel Plink V1.07<sup>176</sup> (fonction – geno).

Le génotypage pour l'étude de cartographie fine a été faite sur 217 chiens GB à l'aide de la technologie Sequenom iPLEX Gold ®<sup>177</sup>. Cette technologie consiste à utiliser un PCR multiplex pour amplifier séparément les deux allèles d'un SNP suivi d'une lecture des amplicons sur un spectromètre de masse<sup>177</sup>. Avec cette technique, 36 SNPs ont été génotypés avec une densité moyenne de 1 SNP/68kb à l'intérieur de la région d'intérêt de 2.9Mb sur le chromosome 2. Tous les SNPs polymorphiques identifiés dans l'étude d'association du génome entier ont été inclus. Le reste des marqueurs ont été choisis à l'aide du projet CANFAM 2.0. Celui-ci investigate les polymorphismes dans plusieurs races canines. Il permet donc d'identifier des SNPs informatifs dans des races proches du GB.

Le génotypage de la cohorte de 140 chiens pour la seconde étude d'association du génome entier a été fait à l'aide de la puce CanineHD beadchip d'Illumina ©. Cette puce

contient 173 662 sondes spécifiques à des SNPs répartis sur tout le génome canin. Elle est subséquemment analysée par le programme Genomestudio. Les SNPs avec une CR inférieur à 90% furent éliminés à l'aide du logiciel Plink v1.07<sup>176</sup> (fonction –geno). De plus, un filtre permettant d'éliminer les chiens avec une CR inférieur à 90% a aussi été utilisé (fonction –mind). Ces chiens avaient de l'ADN partiellement dégradé, causant un génotypage peu fiable et avec un bas taux de réussite. Le génotypage a été fait en collaboration avec le centre d'innovation de McGill.

### 3.3 Analyse des données

#### 3.3.1. Études d'association et de cartographie fine

Les SNPs avec une fréquence d'allèle mineure (MAF) sous 5% ont été exclus de l'étude avec la fonction –maf du programme Plink V1.07<sup>176</sup>. Les génotypes obtenus étaient ensuite analysés à l'aide de la fonction –assoc du même programme. Cette fonction permet de paralléliser l'analyse de toutes les données obtenues à l'aide d'un test de Chi-carré qui analyse la distribution des allèles individuels entre les cas et les contrôles. Pour la cartographie fine, les analyses ont été séparées en deux volets : analyse de la cohorte 1 et analyse de la cohorte sans la famille. L'analyse comparative des cohortes a été faite afin de mieux comprendre la variation dans les valeurs P des SNPs. Pour la 2<sup>ème</sup> étude d'association, les analyses ont été séparées en trois volets : la cohorte 1 (36 affectés et 20 non affectés), la cohorte 2 excluant ainsi la majorité des chiens familiaux (36 affectés, 18 non affectés et 3 phénotypes inconnus) et la cohorte 3 (cohorte 1 + cohorte 2, 72 affectés, 38 non affectés et 3 phénotypes inconnus). Cette méthode avait pour but d'identifier une région associée à la maladie et reproductible entre les cohortes afin de confirmer l'absence de biais.

Les haplotypes ont été reconstruits à l'aide des programmes Haploview v4.2<sup>178</sup> et PHASE<sup>179</sup>, afin de définir leurs limites et de mieux comprendre leurs distributions. Haploview fonctionne en testant la co-ségrégation entre un SNPs et tous les SNPs qui lui sont adjacents. Le niveau d'association entre deux marqueurs est subséquemment défini à

l'aide d'une valeur de corrélation associée à une couleur. Cette information est par la suite mise dans une figure triangulaire, ce qui permet d'avoir un résultat visuel très clair et de définir les régions avec peu de recombinaisons. Ces dernières se nomment bloc d'haplotype et tous les SNPs contenus dans ces régions ségréguent ensemble plus souvent qu'ils ne le devraient s'ils étaient indépendants. Le programme PHASE<sup>179</sup> permet de reconstruire les haplotypes de manière plus précise que le programme Haploview. PHASE fonctionne selon une méthode d'inférence qui consiste à tester des milliers d'haplotypes différents et d'identifier ceux qui ont le plus de chances d'être réels dans le contexte de la cohorte présentée.

### 3.3.2 Corrections pour l'inflation de l'erreur alpha et pour le biais d'admixture

Afin de faire une analyse objective des résultats, diverses corrections ont été appliquées. La correction de Bonferroni a été faite afin de corriger le problème d'inflation de l'erreur de type 1 (erreur alpha) causée par la présence de 22 362 tests indépendants. Cette correction consiste à diviser le seuil d'acceptation normal de 0,05 par le nombre de tests effectués. Le nouveau seuil d'acceptation corrigé était fixé à  $2,24 \times 10^{-6}$ . Ce seuil définit aussi l'association des haplotypes reconstruits. Pour la cartographie fine, un nouveau seuil d'acceptation corrigé de  $2,23 \times 10^{-6}$  a été utilisé, reflétant la somme du nombre de SNPs génotypés dans la cartographie initiale et ceux génotypés lors de la cartographie fine. Pour le 2<sup>ème</sup> criblage génomique, le seuil d'acceptation de l'étude a été fixé à  $2,88 \times 10^{-7}$  (0.05 divisé par 173 662 tests).

Une correction plus conservatrice, les permutations, a aussi été utilisée afin de valider les régions (fonction `-mperm` avec Plink V1.07<sup>176</sup>). Cette approche échange les phénotypes et les génotypes à l'intérieur de la cohorte, afin de tester si le score est réel ou s'il est le résultat d'un évènement rare<sup>180</sup>.

Le biais possible d'admixture dans les données du 1<sup>er</sup> criblage du génome entier a été corrigé par 2 programmes: Eigensoft V3.0<sup>181</sup> et l'association en sous-groupes. L'admixture a lieu lorsque deux sous-populations sont distribuées de manière inégales entre

les affectés et les non affectés. Avec Eigensoft<sup>181</sup>, la première étape est la définition de SNPs polymorphiques et permettant de bien séparer les chiens en sous-populations. Ces marqueurs permettent de reconstruire un Eigenvecteur, qui sépare les chiens en fonction de leur affiliation à des sous-populations. Un graphique à deux dimensions permettant de séparer les sous-populations est créé à l'aide de deux Eigenvecteurs définissant les deux axes. Ensuite, le programme corrige en fonction de la distance entre les divers groupes de chiens jusqu'à ce que les SNPs restants soient trop peu informatifs pour créer des Eigenvecteurs pouvant séparer correctement les individus. Ce programme fonctionne selon le principe des composantes principales, qui est très utilisé en génétique populationnelle. L'association en sous-groupes a été faite à l'aide de Plink v1.07<sup>176</sup> (fonction `-cluster` suivi d'un test `-cmh`). Les chiens ont été regroupés selon leur proximité génétique à l'aide des génotypes connus. Ensuite, une étude cas-contrôle est faite à l'intérieur de chacun de ces groupes et les résultats sont combinés afin de compenser la présence d'une forte association spécifique à un sous-groupe. Pour cette analyse, le test de Cochran–Mantel–Haenszel a été utilisé (Plink v1.07). Ce test utilise une table de contingence 2x2 comme le test Chi-carré utilisé dans les analyses précédentes. Cependant, celui-ci a deux degrés de liberté le rendant ainsi plus résistant dans l'analyse des données stratifiées.

### 3.3.3 *Étude d'homozygocité*

L'idée de base de la technique d'homozygocité est d'identifier une mutation récessive transmise depuis un ancêtre commun dans toutes ces races affectées. L'étude du pédigrée de la Figure 6 suggère une maladie récessive. Sachant que la plupart des races affectées partagent des ancêtres communs, l'hypothèse est qu'une mutation récessive est transmise de ces ancêtres aux races affectées. Cependant, le manque d'informations sur la formation des diverses races rend l'identification d'un ancêtre commun très difficile. C'est pourquoi cette étude est faite en plusieurs étapes. Premièrement, une région d'homozygocité chez le GB est identifiée suivi d'une validation dans les races génétiquement proches (le CKCS, le King Charles, l'Affenpinscher). Par la suite, cette région est validée dans les autres races plus distantes. L'absence d'une mutation causative

dans les races plus distantes n'invalidera pas la découverte, mais confirmera que la mutation n'est pas applicable à toutes les races affectées. Cette étude a été faite avec les données provenant de l'étude d'association du génome entier #2 avec l'aide du programme Plink V1.07. Je me suis occupé de toutes les analyses et des contrôles de qualité.

## 4. RÉSULTATS

### 4.1 Étude d'association du génome entier et cartographie fine

#### 4.1.1 Étude d'association du génome entier et corrections

Nous avons génotypé la cohorte de 56 chiens (cohorte 1, Tableau 5) à l'aide de la puce Canine20 beadchip d'Illumina ©. Ces données ont ensuite été filtrées avec des critères de MAF de 0.05 et de CR de 0.9. Les analyses subséquentes sont faites à l'aide des 14 437 SNPs ayant passé ces contrôles. Les résultats de ces analyses sont corrigés pour les tests multiples à l'aide de la correction de Bonferroni. Cette dernière a défini un nouveau seuil d'acceptation fixé à 5.65 ( $-\log(2,24 \times 10^{-6})$ ). Suite à cette correction, un total de 9 SNPs répartis sur 6 régions génomiques étaient significativement associées à la maladie (Figure 8).

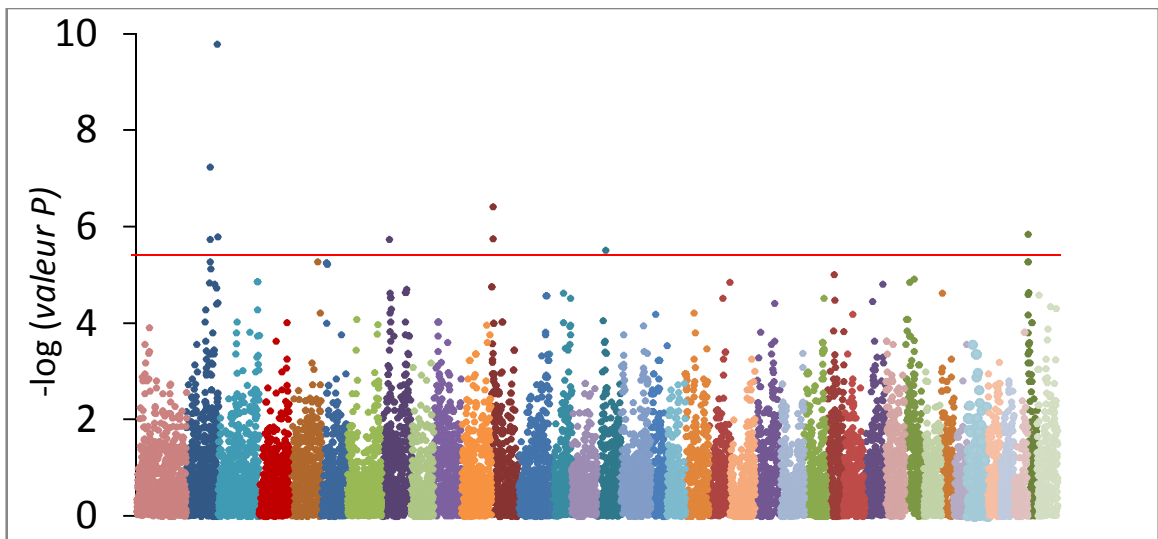


Figure 8 : Graphique de type Manhattan. L'axe des Y représente la force de l'association à l'aide du log de la valeur P. Chaque couleur sur l'axe des X représente un des 39 chromosomes du chien (de gauche à droite 1 à 39). L'analyse de ce graphique a permis d'identifier 9 SNPs avec des valeurs supérieures au seuil d'acceptation de 5.65 ( $-\log(2,24 \times 10^{-6})$ ).

L'utilisation de la correction de Bonferroni est parfois critiquée dans ce type d'étude selon le principe qu'elle est trop stringente. C'est pourquoi plusieurs études canines

préfèrent utiliser les permutations pour corriger l'inflation de l'erreur alpha<sup>143,182,183</sup>. Le nombre typique de permutations effectuées est 100 000. La comparaison des résultats entre ces deux techniques est présentée dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Comparaison des scores des 6 régions identifiées au-dessus Bonferroni après chacune des corrections appliquées.

Locus	SNP	Fréquence allélique		Valeur P initiale	Valeur P après Bonferroni	Valeur P corrigées par 100 000 permutations	Valeur P pour la correction des sous-groupes	Valeur P corrigées par Eigensoft
		Cas (n=36)	Contrôles (n=20)					
CHR 2 (locus 1)	S235550 42	0.11	0.70	$1.63 \times 10^{-10}$	$3,64 \times 10^{-6}$	0,00002	$4 \times 10^{-5}$	$1.86 \times 10^{-5}$
	S232328 40	0.24	0.70	$1.601 \times 10^{-6}$	$3,57 \times 10^{-2}$	0,02263	0.3842	$4.3 \times 10^{-3}$
CHR 2 (locus 2)	P105271 1	0.50	0	$5.668 \times 10^{-8}$	$1,27 \times 10^{-3}$	0,00299	$1.73 \times 10^{-2}$	$4.04 \times 10^{-3}$
	P963534	0.42	0	$1.831 \times 10^{-6}$	$4,09 \times 10^{-2}$	0,04575	0.5025	$7 \times 10^{-3}$
CHR 12 (locus 3)	P924392	0.042	0.43	$3.87 \times 10^{-7}$	$8,64 \times 10^{-3}$	0,01929	$9.33 \times 10^{-2}$	$4.45 \times 10^{-2}$
	P102445 4	0.069	0.45	$1.778 \times 10^{-6}$	$3,97 \times 10^{-2}$	0,05751	0.4027	$3.16 \times 10^{-2}$
CHR 8 (locus 4)	P823171	0.42	0	$1.831 \times 10^{-6}$	$4,09 \times 10^{-2}$	0,04575	0.5025	$2 \times 10^{-3}$
CHR 16 (locus 5)	P499746	0.028	0.35	$3.02 \times 10^{-6}$	$6,74 \times 10^{-2}$	0,01263	0.5613	$1 \times 10^{-3}$
CHR 38 (locus 6)	S241504 0	0.50	0.050	$1.439 \times 10^{-6}$	$3,21 \times 10^{-2}$	0,04409	0.3796	0.131

Étant donné que la correction de Bonferroni est normalement acceptée comme la plus stricte des deux techniques, les valeurs significatives avec cette correction l'étaient aussi après les permutations. Sous 100 000 permutations, un total de 10 SNPs demeuraient significatifs (voir annexe 2) et tous ségrégaient avec une des 6 régions identifiées avec la correction de Bonferroni.

Le potentiel biais d'admixture de ces six régions a été corrigé à l'aide de deux techniques : Eigensoft et l'association en sous-groupes. Eigensoft nécessite un contrôle positif afin de voir l'appauvrissement des SNPs informatifs. En annotant les chiens familiaux, il est possible de suivre leur séparation et d'arrêter le programme lorsque le regroupement de ces chiens ne se fait plus de manière efficace. Il a alors été possible de définir qu'après huit Eigenvecteurs, le programme devenait incapable de regrouper les chiens familiaux (voir Figure 9 pour séparation). La routine nécessite l'utilisation de SNPs informatifs et n'étant pas associés à la maladie. C'est pourquoi les mêmes filtres que précédemment furent utilisés et que tous les SNPs à 1Mb autour des 6 régions préalablement identifiées furent enlevés. L'avantage de ce programme est qu'il permet de visualiser les regroupements de chiens et de mieux comprendre les liens de parentés entre ceux-ci. Ceci a permis d'observer que les chiens familiaux et indépendants ne se regroupent pas, ce qui suggère qu'ils proviennent de sous-populations différentes. De plus, un troisième groupe laisse supposer que les chiens familiaux sont eux-mêmes composés de deux sous-populations. Ces informations démontrent qu'un potentiel biais de stratification pourrait être présent étant donné que la majorité des chiens non affectés se groupent avec les chiens familiaux qui semblent différer génétiquement des chiens indépendants. Il est important de noter que la famille provient du même éleveur et que la plupart des autres chiens ont été recrutés dans d'autres centres à travers le monde. Ceci pourrait expliquer la séparation entre les cas familiaux et non-reliés à l'aide du premier Eigenvecteur.



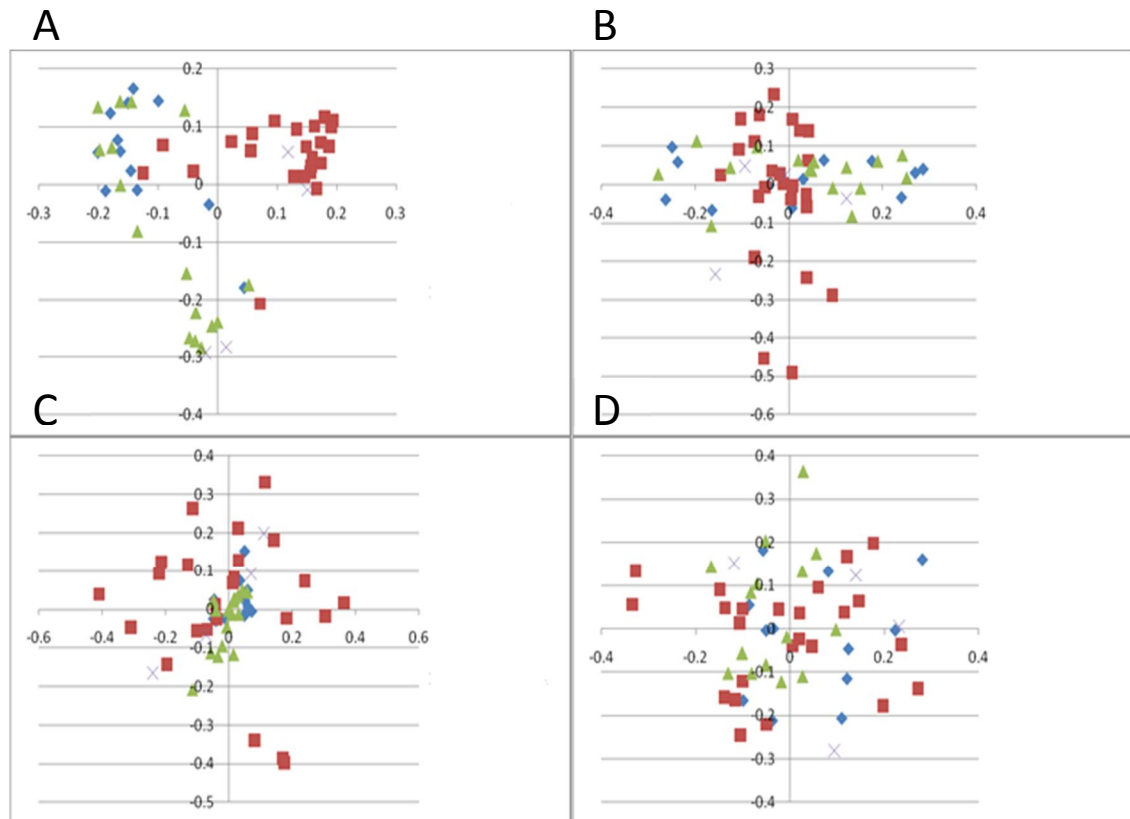


Figure 9: Séparation des chiens selon les composantes principales avec le programme Eigensoft. Le programme utilise les SNPs les plus informatifs pour créer les premiers Eigenvecteurs et continue à créer des Eigenvecteurs jusqu'à ce qu'il devienne impossible de regrouper les chiens. Les chiens sont ensuite mis dans un graphique composé de deux Eigenvecteurs (ex : dans (A), le Eigenvecteur 1 est l'axe des X et le Eigenvecteur 2 est l'axe des Y). Les chiffres sur chaque vecteur sont une mesure de l'éloignement de la norme définie par le croisement des deux Eigenvecteurs. Les Eigenvecteurs vont de 1 à 8, où 1 est le plus informatif et 8 le moins informatif. Les triangles représentent les contrôles familiaux, les losanges représentent les affectés familiaux, les carrés représentent les affectés non-reliés et les croix représentent les contrôles non-reliés. (A) Eigenvecteurs 1 et 2, (B) Eigenvecteurs 3 et 4, (C) Eigenvecteurs 5 et 6, (D) Eigenvecteurs 7 et 8.

La correction d'Eigensoft a ensuite été comparée à l'association en sous-groupes (Tableau 5). La première était beaucoup plus stringente, mais le locus 1 identifié dans l'analyse d'association reste presque significatif à travers toutes les corrections suggérant une association réelle à la MCL.

## 4.1.2 Région candidate locus 1

### 4.1.2.1 Locus 1 sur le chromosome 2

Le locus 1 sur le chromosome 2, contenant les 2 SNPs, S23555042 et S23232840, était la région la plus fortement associée à la MCL de l'analyse cas-contrôles (Tableau 5). Afin d'investiguer les limites et la distribution des haplotypes de cette région dans la cohorte de 56 chiens, nous avons utilisé Haploview V4.2, qui a identifié un bloc de LD de 2,9Mb et contenant le SNP S23555042. Cet haplotype a été associé à MCL avec une valeur  $P$  de  $6,87 \times 10^{-10}$ , ce qui est très fortement significatif considérant que le seuil de Bonferroni est de  $2,24 \times 10^{-6}$ . La distribution de cet haplotype était surreprésentée dans les chiens non affectés, indiquant un haplotype protecteur. Cet haplotype protecteur avait une fréquence allélique de 12,2% chez les cas et de 68,4% chez les contrôles (voir Figure 10).

### 4.1.2.2 Cartographie fine du Locus 1

Afin d'investiguer le bloc de LD de 2,9Mb décrit précédemment (Section 4.1.2.1), 36 SNPs répartis dans cette région ont été génotypés dans une cohorte de 217 chiens (incluant la cohorte 1 de 56 chiens). Suite aux contrôles de qualité de CR et de MAF fixés respectivement à 10% et 5%, 23 SNPs informatifs étaient encore présents dans la région. Le choix de ces SNPs a été fait en incorporant tous les marqueurs informatifs identifiés dans l'étude d'association du génome entier et en complétant avec des marqueurs polymorphiques selon le projet CANFAM 2.0 (voir section 3.2). La cohorte 2 de 217 chiens était plus puissante que la précédente et visait à diminuer la valeur  $P$  des SNPs précédemment identifiés. Les 23 SNPs restants étaient ensuite analysés à l'aide d'une étude cas-contrôles avec le programme Plink V1.07. Les résultats obtenus sont inclus dans le Tableau 6. Sachant que le nouveau seuil d'acceptation Bonferroni était fixé à  $2,23 \times 10^{-6}$ , aucun des SNPs n'avait un résultat significatif, incluant le SNP S23555042 qui avait le meilleur score dans la section 4.1.1.

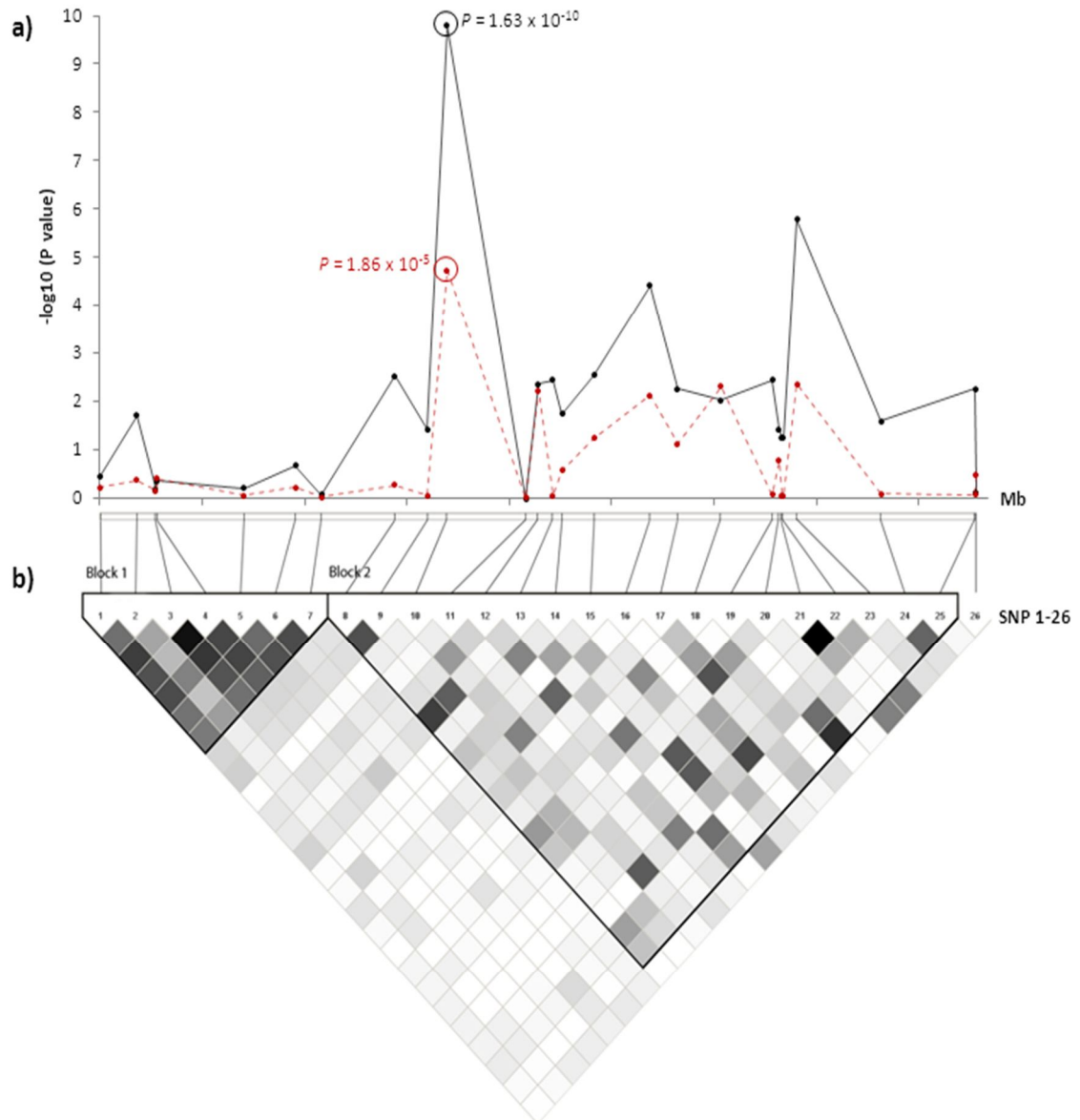


Figure 10: Haplotype protecteur de 2,9 Mb identifié dans une cohorte de 56 GB. La région associée est délimitée par le bloc 2. Ce bloc est associé avec une valeur P de  $6,87 \times 10^{-10}$  à la MCL. Le graphique au-dessus, représente le  $\log(\text{valeur P})$  des SNPs présents dans cette région. Il est possible d'observer en gris la valeur P initiale et en rouge, la valeur P corrigée par Eigensoft.

La cohorte 2 et la cohorte 1 ont ensuite été analysées séparément. Les résultats se retrouvent dans le Tableau 7. Ces données démontrent que la cohorte 2 ne possède aucun SNP significatif à l'intérieur de cette région et que les valeurs significatives provenaient toutes de la cohorte 1.

Tableau 6: Cartographie fine de la région de 2,9 Mb sur le chromosome 2 canin. Seulement les SNPs informatifs sont présentés dans ce tableau.

<b>Chr</b>	<b>SNP</b>	<b>Position</b>	<b>Fréquence chez les cas</b>	<b>Fréquence chez les contrôles</b>	<b>Valeur P</b>
<b>2</b>	P415528	85204236	0.2124	0.1071	0.06813
	P1418556	85364800	0.2582	0.1429	0.06334
	S23555042	85458684	0.2582	0.5536	9.915e-006
	S23127012	85478529	0.3824	0.625	0.000718
	TIGRP2P33813	85545528	0.3072	0.5893	4.763e-005
	rs22821898	85828226	0.3301	0.125	0.002044
	P1117805	85846274	0.06915	0.1667	0.1398
	P1183990	85903926	0.4771	0.3214	0.0314
	rs8997458	85949855	0.3596	0.6538	6.778e-005
	P425659	85975172	0.2418	0.1429	0.1038
	P1369658	86022513	0.3873	0.1852	0.004435
	P573920	86179658	0.2778	0.1786	0.1208
	P873878	86257573	0.4441	0.6964	0.0005155
	S2377949	86450414	0.5205	0.3148	0.005462
	P1102641	86586760	0.2288	0.125	0.08108
	S23347711	86722546	0.415	0.2143	0.004513
	S22926882	86796989	0.3013	0.2143	0.1863
	S23527171	87050810	0.2072	0.08929	0.03824
	P138110	87082051	0.1231	0.1923	0.3159
	P552115	87096976	0.3889	0.2143	0.01242
	P978122	87102132	0.3849	0.2143	0.01443
	S23232840	87170677	0.2833	0.5926	8.688e-006
	S23015697	87581942	0.25	0.1071	0.01916

Tableau 7 : Comparaison entre les valeurs P de la cohorte 1 et celle de la cohorte 2.

C hr	SNP	Position	Cohorte 1			Cohorte 2		
			Fréquence chez les cas	Fréquence chez les contrôles	Valeurs P	Fréquence chez les cas	Fréquence chez les contrôles	Valeurs P
2	P415528	85204236	0.1818	0.05	0.05202	0.2203	0.2059	0.8488
	P1418556	85364800	0.1515	0.05	0.1098	0.2839	0.2647	0.816
	S23555042	85458684	0.1212	0.625	5.642e-8	0.2754	0.3529	0.3493
	S23127012	85478529	0.2727	0.625	0.00034	0.3898	0.5294	0.1215
	P2P33813	85545528	0.2576	0.675	2.36e-5	0.3051	0.3824	0.3644
	rs22821898	85828226	0.2879	0.1	0.02292	0.3432	0.2647	0.3639
	P1117805	85846274	NA	NA	NA	0.07059	0.125	0.2958
	P1183990	85903926	0.5758	0.275	0.00260	0.4703	0.4118	0.5219
	rs8997458	85949855	0.5909	0.2222	0.00035	0.3423	0.4118	0.4298
	P425659	85975172	0.2273	0.075	0.04298	0.2458	0.2353	0.8944
	P1369658	86022513	0.3448	0.15	0.03178	0.3955	0.3438	0.5751
	P573920	86179658	0.3636	0.125	0.00755	0.2669	0.2059	0.4475
	P873878	86257573	0.5	0.2	0.00211	0.4359	0.4412	0.9538
	S2377949	86450414	0.3125	0.6842	0.00026	0.5045	0.4118	0.3138
	P1102641	86586760	0.2273	0.05	0.01591	0.2331	0.2353	0.9769
	S23347711	86722546	0.303	0.175	0.1425	0.4449	0.3529	0.3116
	S22926882	86796989	0.3485	0.1	0.00442	0.3017	0.2647	0.6591
	S23527171	87050810	0.2258	0.075	0.04601	0.2076	0.1765	0.6732
	P138110	87082051	0.08333	0	0.4669	0.1261	0.1765	0.4187
	P552115	87096976	0.3636	0.225	0.1351	0.3983	0.3235	0.4031
P978122	87102132	0.3636	0.225	0.1351	0.3932	0.3235	0.4354	
S23232840	87170677	0.2188	0.6667	9.447e-6	0.2759	0.4412	0.0488	
S23015697	87581942	0.1818	0.05	0.05202	0.2521	0.3235	0.3759	

#### 4.1.2.3 Étude d'haplotype du locus 1

Afin de définir les limites de l'haplotype dans notre cohorte 2, nous avons utilisé le programme Haploview V4.2. Nous avons identifié un nouvel haplotype de 1,9 Mb représenté dans la Figure 11. Cette région s'étend de la position 85204236 bp à 87170677 bp sur le chromosome 2. La comparaison entre les cohortes démontre une fois de plus que cette région dans la cohorte 2 ne semble pas du tout associée à la MCL. Afin d'observer la distribution de cet haplotype dans la cohorte, nous avons utilisé le programme PHASE. Tel que présenté dans le Tableau 8, l'haplotype 6 est fortement associé dans la cohorte entière, mais perd cette association lorsque les chiens familiaux présents dans l'étude d'association initiale sont enlevés de l'analyse.

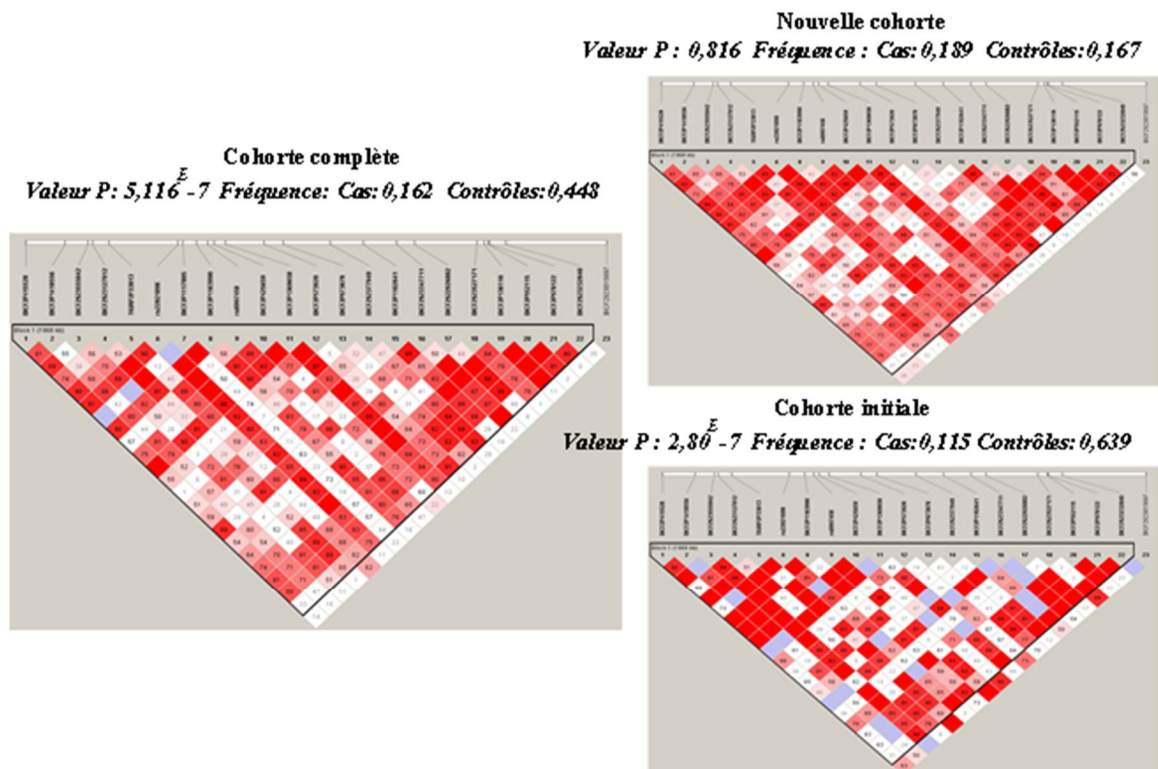


Figure 11: Reconstruction d'haplotypes à l'aide de Haploview V4.2. La cohorte complète est composée des 217 chiens de la cartographie fine. La cohorte initiale est composée des 56 GB de l'étude d'association du génome entier. La nouvelle cohorte est composée de tous les chiens absents de l'étude d'association du génome entier.

Tableau 8 : Fréquence et Valeur P des haplotypes reconstruits avec PHASE

Numéro	Cohorte complète			Cohorte 2		
	Fréquence chez les contrôles	Fréquence chez les cas	Valeur P	Fréquence chez les contrôles	Fréquence chez les cas	Valeur P
1	0,100	0,246	0,020	0,182	0,261	0,567
2	0,100	0,051	0,237	0,091	0,039	0,53
3	0,033	0,020	0,515	0,045	0,010	0,635
4	0,000	0,029	0,924	0,000	0,026	0,896
5	0,067	0,060	0,924	0,045	0,035	0,727
6	0,483	0,166	7.0E-08	0,091	0,148	0,669
7	0,017	0,037	0,673	0,045	0,042	0,639
8	0,033	0,034	0,728	0,091	0,039	0,529
9	0,033	0,034	0,728	0,091	0,039	0,529
10	0,033	0,063	0,547	0,091	0,071	0,938

\*La cohorte complète comprend les 217 chiens de la cartographie fine et la cohorte 2 exclue tous les chiens de l'étude d'association du génome entier initial.

Les fréquences alléliques démontrent que l'haplotype 6 est surreprésenté à l'intérieur de la famille et qu'en absence de celle-ci, les fréquences sont presque égales suggérant un fort biais d'admixture. À l'intérieur de la famille, l'haplotype 6 avait une distribution fortement biaisée vers les contrôles, suggérant une région protectrice familiale (voir Figure 12). La valeur P de cet haplotype dans la cohorte familiale a été évalué à  $5,39E-4$  et n'est pas significative. Cependant, il s'agit ici d'une cohorte de 38 chiens qui pourrait être insuffisante pour atteindre le seuil de signification génomique fixé à  $2,23 \times 10^{-6}$ .

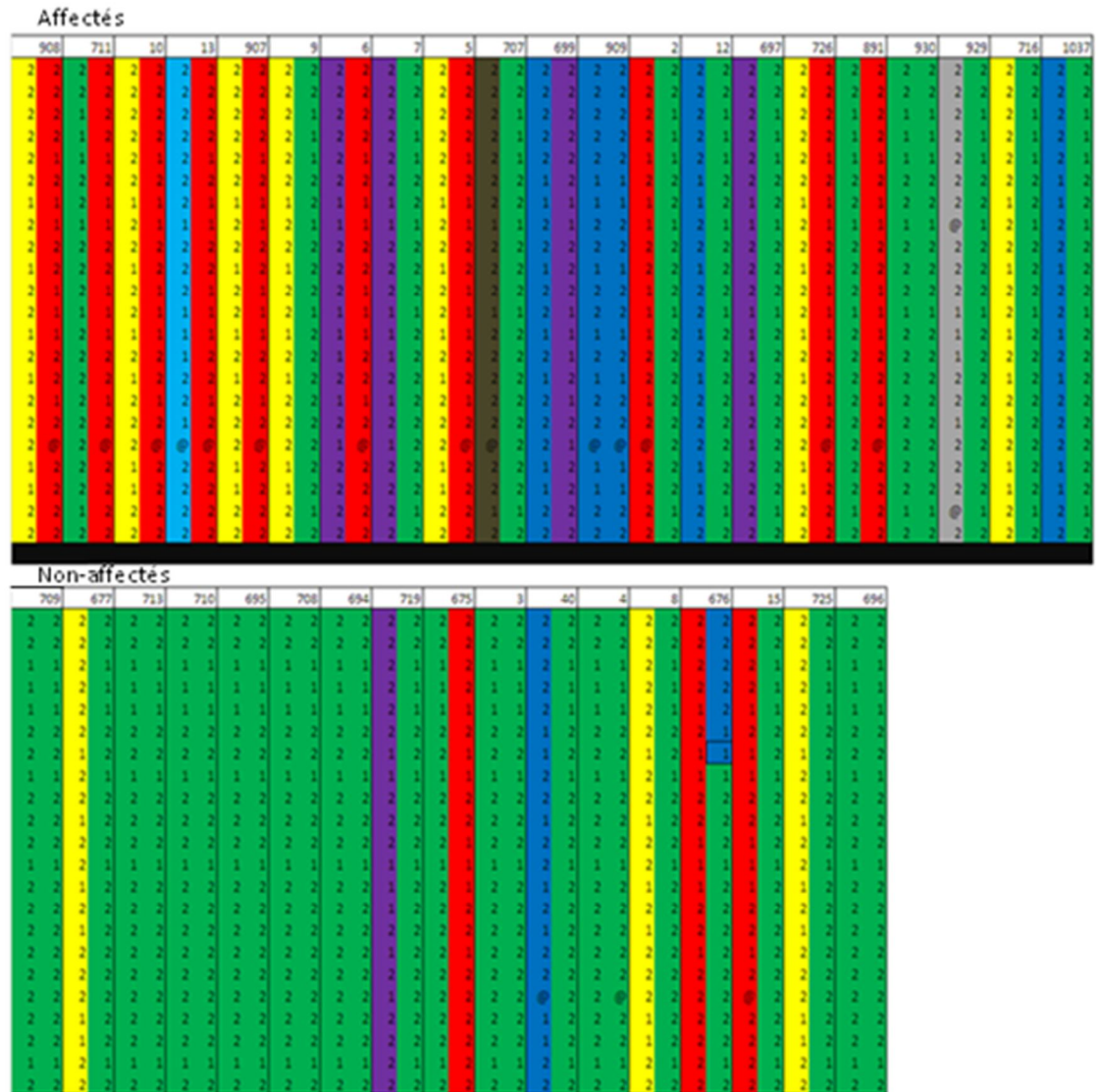


Figure 12: Distribution de l'haplotype 6 identifié par PHASE dans la famille principale de l'association du génome entier. Chaque couleur représente un haplotype différent et la couleur verte représente



#### 4.1.2.4 Gènes candidats du locus 1

Une recherche des bases de données publiques (UCSC<sup>184</sup>, EntrezGene<sup>185</sup> et Ensembl<sup>186</sup>) a permis d'identifier 8 gènes dans l'intervalle de 1.9 Mb associé à la MCL (Tableau 9) identifié dans la section 4.1.2.3.

Tableau 9 : Liste des gènes dans la région associée du locus 1 (85204236 bp à 87170677 bp)

Locus	Nom	Fonction	Implication chez l'humain
Chr 2	Kazrin isoform a ( <i>kaz</i> )	Composante des desmosomes nécessaire pour l'élongation axiale chez le <i>Xenopus Tropicalis</i> <sup>187</sup>	
	Ribosomal Protein L10a ( <i>RPL10a</i> )	Protéine ribosomale, nécessaire à l'activation ribosomale <sup>188</sup>	Impliqué dans la tumeur de Wilms <sup>188</sup>
	Tubulin alpha 3a ( <i>TUBA3</i> )	Formation des microtubules <sup>189</sup>	Impliqué dans la lissencéphalie <sup>189</sup>
	PR domain zinc finger protein 2 ( <i>PRDM2</i> )	Méthyl transférase, gène suppresseur de tumeur impliqué dans le rétinoblastome <sup>190</sup>	Impliqué dans le développement de cancer <sup>190</sup>
	Podoplanin ( <i>PDPN</i> )	Glycoprotéine membranaire, récepteur pour le virus de l'influenza <sup>191</sup>	Impliqué dans le cancer et suggéré comme marqueur de problèmes pulmonaires <sup>191</sup>
	dehydrogenase/reductase 3 ( <i>DHRS3</i> )	Deshydrogénase réductase <sup>192</sup>	Impliqué dans le cancer de la thyroïde <sup>192</sup>
	Lysyl hydroxylase 1 ( <i>PLOD1</i> )	Protéine membranaire lysyl hydroxylase <sup>193</sup>	Impliqué dans le syndrome Ehlers-Danlos <sup>193</sup>
	Mitofusin 2 ( <i>MFN2</i> )	Protéine membranaire impliquée dans la prolifération musculaire <sup>194</sup>	Impliqué dans le syndrome Charcot-Marie-Tooth <sup>194</sup>

Le génome canin n'est pas aussi bien annoté que chez l'humain et la plupart de ces gènes sont des prédictions basées sur une similarité de séquence avec un orthologue d'autres mammifères. Dans cette région, seul le gène *Podoplanin* a été annoté comme un gène fonctionnel chez le chien. Étant donné le manque de ressources sur l'expression génétique canine, nous nous sommes majoritairement concentrés sur la fonction du gène,

ainsi que sur les phénotypes rapportés afin d'investiguer la plausibilité biologique de ces gènes comme candidat pour la MCL. Le gène *Kazrin* était particulièrement intéressant dû à son implication dans l'élongation axiale chez le *Xenopus Tropicalis*. Un *knock-out* de ce gène entraînait la formation d'un crâne statistiquement plus court que la norme<sup>187</sup>. Ce phénotype s'allie fortement à l'hypothèse que la MCL est due à une insuffisance mésodermique, engendrant un sous-développement du crâne. Selon ces données, *Kazrin* est un excellent candidat pour la MCL. Le séquençage de ce gène est en cours, mais à présent aucune mutation suivant la transmission prédite par l'haplotype 6 n'a été identifiée.

### **4.1.3 Régions candidates locus 2 à 6**

#### *4.1.3.1 Étude d'association du génome entier locus 2 à 6*

Malgré le fait que les locus 2 à 6 n'ont pas atteint le seuil d'acceptation suivant les corrections pour la stratification (Tableau 3), il demeurerait important de valider leurs candidatures par des études plus approfondies. Les haplotypes de ces régions ont été reconstruits avec le programme Haploview (voir Figure 13). Tous les haplotypes avaient un effet protecteur et contrairement au locus 1, aucun des nouveaux blocs de LD n'avait une valeur P significative sous le seuil de Bonferroni de  $2,24 \times 10^{-6}$ . Les fréquences alléliques de tous ces haplotypes sont incluses dans la Figure 13.

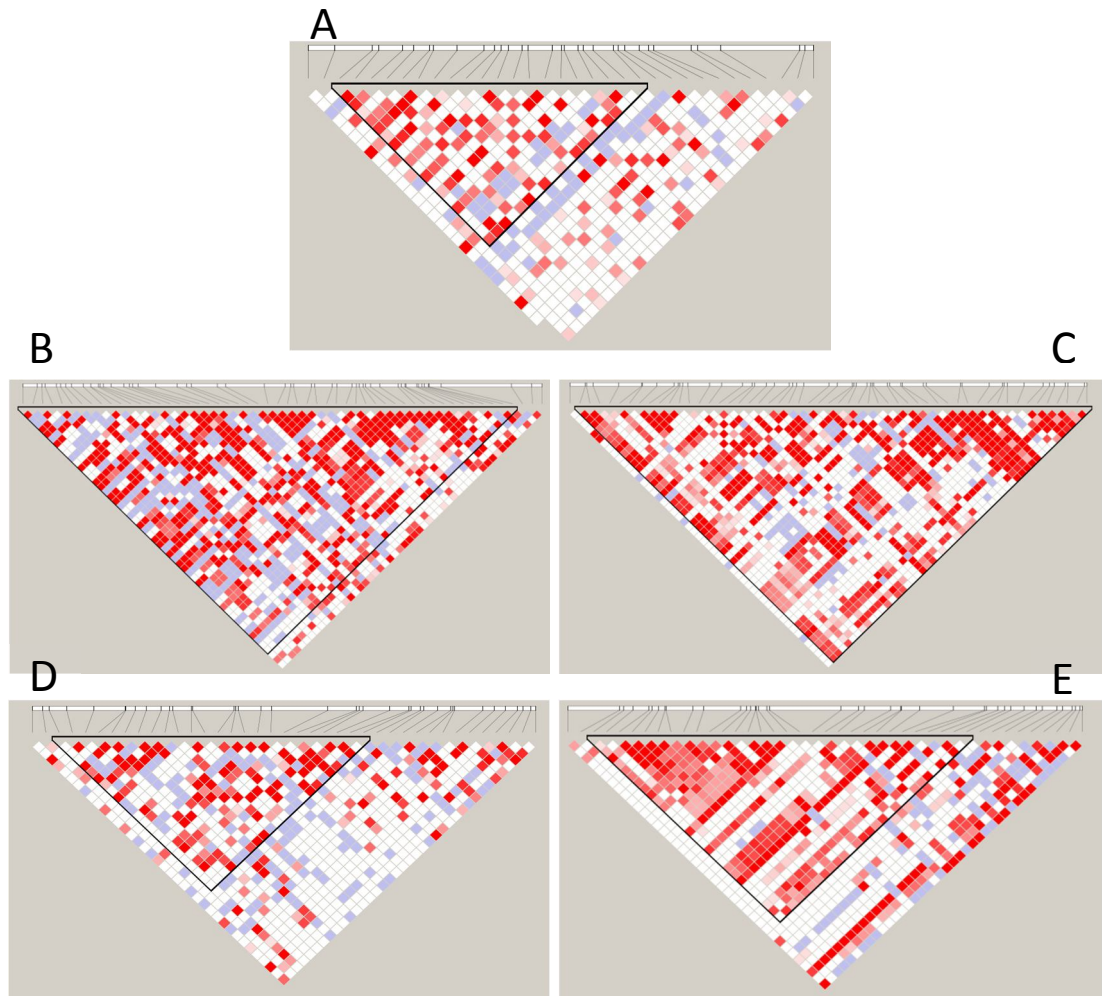


Figure 13: Reconstruction des haplotypes des locus 2 à 6. (A) locus 2 le chromosome 2. Valeur P du meilleur haplotype = 0,0005. Fréquence allélique contrôles-cas : 28,9%-5,4% (B) Locus 3 sur chromosome 12. Valeur P du meilleur haplotype = 0,0003. Fréquence allélique contrôles-cas : 21,1%-1,4% (C) locus 4 sur le chromosome 8. Valeur P du meilleur haplotype = 0,0002. Fréquence allélique contrôles-cas : 71,1%-33,3% (D) locus 5 sur le chromosome 16. Valeur P du meilleur haplotype = 0,0003. Fréquence allélique contrôles-cas : 21,1%-1,4% (E) locus 6 sur le chromosome 38. Valeur P du meilleur haplotype = 0,0004. Fréquence allélique contrôles-cas :

#### 4.1.3.2 Génotypages supplémentaires des locus 2 à 6

Les deux SNPs les plus fortement associés à MCL dans chacune de ces 6 régions ont été génotypés dans une plus large cohorte de 217 chiens (incluant 167 affectés, 37 non

affectés et 13 phénotypes incertains) afin de vérifier leur candidature. Une simple analyse cas-contrôle à l'aide du programme Plink V 1.07 a montré une diminution des valeurs P de tous les locus, sauf Locus 6 sur chromosome 38 (voir Tableau 10).

Tableau 10 : Résultats obtenus suite au génotype supplémentaire des locus 2 à 6

Locus/ Chromosome	SNP	Fréquence allélique		Valeur P dans la cohorte 1	Valeur P dans la cohorte 2
		Cas	Contrôles		
<b>Locus 2/ CHR 2</b>	P1052711	0.46	0.07	$5.668 \times 10^{-8}$	$1.34 \times 10^{-6}$
	P963534 (0.98 Mb)	0.46	0.09	$1.831 \times 10^{-6}$	$5.3 \times 10^{-6}$
<b>Locus 3/ CHR 12</b>	P924392	0.09	0.37	$3.87 \times 10^{-7}$	$2.99 \times 10^{-6}$
	P1024454 (0.3 Mb)	0.12	0.36	$1.778 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-4}$
<b>Locus 4/ CHR 8</b>	P823171	0.54	0.1	$1.831 \times 10^{-6}$	$2.97 \times 10^{-7}$
	P438587 (0.2 Mb)	x	x	4,80E-05	x
<b>Locus 5/ CHR 16</b>	P499746	0.028	0.35	$3.02 \times 10^{-6}$	0.0003515
	G630849576 (5 MB)	0.538	0.2174	3,49E-05	0.000125
<b>Locus 6/ CHR 38</b>	S2415040	0.50	0.050	$1.439 \times 10^{-6}$	$3.52 \times 10^{-8}$
	P1371241 (0.16 Mb)	0.5063	0.1087	1,33E-05	$1.48 \times 10^{-6}$

## 4.2 Étude d'association du génome entier : Cohorte 2

### 4.2.1 Étude d'association

Le problème d'admixture discuté dans la section 4.1.2.3 restreint énormément la puissance de l'étude. Une nouvelle étude d'association avec une cohorte de 113 chiens (cohorte 3) et avec une micropuce de 173 662 SNPs a été effectuée. Étant donné que la famille représente pour 50% de nos contrôles, il était impossible de l'exclure de la nouvelle analyse sans sacrifier beaucoup de puissance (voir Annexe 3 pour résultats sans la famille). Cependant, en ajoutant de nouveaux contrôles et de nouveaux cas, le biais familial devrait être réduit. La cohorte 3 comprenait 113 GB (72 atteints, 38 non-atteints et 3 phénotypes inconnus) et 27 autres races affectées (voir section 3.1). L'analyse d'association a été faite seulement en considérant les GB. Étant donné que le programme Eigenstrat n'avait pas permis de corriger correctement le fort biais de stratification du locus 1 dans la section 4.1.1, nous nous sommes dirigés vers une autre approche. La seule façon d'identifier un biais d'admixture dans cette étude était de reconstruire les haplotypes et d'observer leur distribution. Les locus candidats identifiés au cours de cette analyse étaient tous investigués afin de mieux comprendre l'effet pathogénique de chacun. Tel que mentionné dans la section 3.3.1, l'analyse du 2<sup>ème</sup> criblage génomique a été divisé en 3 cohortes, la cohorte 3 (113 chiens), la cohorte 1 contenant les 56 chiens de la première étude d'association et la cohorte 2 contenant le reste des chiens (57 chiens, 36 atteints, 18 non atteints et 3 phénotypes inconnus). Le but de cette division était d'identifier un locus associé dans les 2 sous-cohortes permettant de conclure à une absence d'admixture. Les résultats principaux de l'analyse sont inclus dans le Tableau 11. Seule la région sur le chromosome 13 a été associée à la MCL avec une valeur P au-dessus du seuil de Bonferroni fixé à  $2,88 \times 10^{-7}$  dans la cohorte complète. Aucune région n'avait de réplification entre les deux cohortes.

Tableau 11 : Valeur P des régions les plus fortement associées à la MCL dans la cohorte combinée comparativement à la cohorte 1 et à la cohorte 2

Chr	SNP	Position	Fréquence chez les affectés	Fréquence chez les non affectés	Cohorte complète	Cohorte 2	Cohorte 1
2	P21202	80282465	0.3051	0	1,67E-06	1,47E-06	0,0006051
3	P219474	56813514	0.14	0.7273	8,52E-07	0,0003739	0,003856
13	S2316213	60163980	0	0.2031	1,59E-07	0,001789	2,09E-05
	G630748072	62949222	0	0.1613	3,04E-06	0,1188	8,32E-06
	G630748023	62977358	0	0.1562	4,36E-06	0,1188	1,57E-05
	S2448414	63567739	0	0.1562	4,36E-06	0,1188	1,57E-05
	P185055	64142982	0	0.1562	4,36E-06	0,1188	1,57E-05
	G630746923	64015162	0.01562	0.2031	5,03E-06	0,03898	0,0001056
14	P1212233	61801052	0.2344	0.5781	2,47E-06	0,003869	1,19E-08
21	P832412	33338867	0.2903	0.74	2,22E-06	4,99E-08	0,001521
27	P241640	20292522	0.1797	0.5156	1,38E-06	0,0002645	0,0009458
	P143019	20218981	0.1875	0.5156	2,72E-06	0,0005053	0,0009458
	P684447	22776367	0.3281	0.6774	5,48E-06	0,000361	0,002389
35	P455161	6198596	0.01923	0.2667	5,54E-06	3,78E-06	0,003949

#### 4.2.2 Étude d'haplotypes

Le candidat principal à la suite de l'analyse d'association du nouveau criblage était le chromosome 13. Afin de connaître la distribution de cet haplotype et de vérifier s'il était associé ou non à la MCL, nous avons utilisé le programme PHASE. Les résultats du chromosome 13 se retrouvent dans le Tableau 12. Ce tableau permet d'observer les haplotypes les plus fréquents pour cette région.

La région sur le chromosome 13 mesure 4 Mb de 60163980pb à 64142982pb. Un haplotype protecteur rare (#3) retrouvé chez 12% des non affectés et chez aucun affecté semble être responsable de l'association de cette région dans la cohorte complète (Tableau 12). Ce bloc de LD est surreprésenté dans la famille, ce qui concorde avec les valeurs P obtenues dans le Tableau 11. Cet haplotype est particulièrement intéressant parce qu'il est

complètement absent chez les affectés. Malgré le fait qu'il est plutôt rare dans la cohorte non familiale, le seul GB avec cet haplotype est tout de même non affecté. De plus, la présence d'un haplotype protecteur à l'extérieur de la famille (#1) pourrait être le signe qu'une région commune à ces deux haplotypes est responsable de cet effet. Avec la densité actuelle, il est impossible d'identifier cette région commune, mais une cartographie fine de la région pourrait permettre de mieux cibler la mutation protectrice.

Tableau 12 : Fréquence et distribution des haplotypes à travers la cohorte totale, la cohorte sans la famille et la cohorte familiale pour la région candidate sur le chromosome 13

Numéro	Cohorte complète			Cohorte sans la famille			Cohorte familiale		
	Fré- quence chez les non affectés	Fré- quence chez les affectés	Valeur P	Fré- quence chez les non affectés	Fré- quence chez les affectés	Valeur P	Fré- quence chez les non affectés	Fré- quence chez les affectés	Valeu r P
1	0,58	0,33	0,000	0,52	0,18	8 <sup>E</sup> -07	0,67	0,82	0,1295
2	0,16	0,28	0,038	0,26	0,32	0,794	0,05	0,16	0,2187
3	0,12	0	3 <sup>E</sup> -07	0,02	0	0,031	0,23	0	0,0003
4	0,01	0	0,095	0	0	0	0,02	0	0,2225

#### 4.2.3 Gènes candidats de la région sur chromosome 13

Un total de 25 gènes se retrouvent dans la région candidate sur le chromosome 13 (voir Tableau 13)<sup>185</sup>. Le seul gène potentiellement intéressant basé sur sa fonction et les atteintes humaines est RUN and FYVE domain containing 3 (*RUFY3*). Cette protéine est impliquée dans l'inhibition de la croissance neuronale<sup>195</sup>.

Tableau 13 : Gènes de la région associée sur le chromosome 13

Nom	Abréviation
solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4	<i>SLC4A4</i>
RUN and FYVE domain containing 3	<i>RUFY3</i>
submaxillary gland androgen regulated protein 3A	<i>SMR3A</i>
YTH domain containing 1	<i>YTHDC1</i>
UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A1, complex locus	<i>UGT2A1</i>
UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4	<i>UGT2B4</i>
sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1	<i>SULT1E1</i>
group-specific component (vitamin D binding protein)	<i>GC</i>
gonadotropin-releasing hormone receptor	<i>GNRHR</i>
sulfotransferase	<i>SULT1D1</i>
UDP-glucuronosyltransferase UGT2B31	<i>UGT2B31</i>
casein beta	<i>CSN2</i>
sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1	<i>SULT1B1</i>
odontogenic, ameloblast associated	<i>ODAM</i>
amelotin	<i>AMTN</i>
deoxycytidine kinase	<i>DCK</i>
MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1A (yeast)	<i>MOBKLI1A</i>
enamelin	<i>ENAM</i>
ameloblastin (enamel matrix protein)	<i>AMBN</i>
transmembrane protease, serine 11A	<i>TMPRSS11</i>
signal transducing adaptor family member 1	<i>STAP1</i>
G-rich RNA sequence binding factor 1	<i>GRSF1</i>
UTP3, small subunit (SSU) processome component, homolog (S)	<i>UTP3</i>
ubiquitin-like modifier activating enzyme 6	<i>UBA6</i>
centromere protein C 1	<i>CENPC1</i>

### 4.3 Étude d'homozygoté

Tel que mentionné précédemment, des chiens d'autres races affectées (voir section 3.1) ont été génotypés afin d'identifier une région commune à toutes les races affectées. Tel qu'expliqué dans la section 3.3.3, cette technique visait à identifier une région homozygote



transmise par un ancêtre commun à toutes les races affectées par la MCI. Le Tableau 14 compare les proportions de chiens homozygotes entre les GB affectés et les non affectés pour différentes régions génomiques. Les 5 régions avec la plus grande différence entre les cas et les contrôles sont présentées. Avec une différence d'homozygotie maximale de 40%, aucune région n'était exclusivement homozygote dans l'un ou l'autre de ces groupes.

Tableau 14 : Régions d'homozygotie dans les GB avec la plus grande divergence entre les cas et les contrôles

CHR	Position	Cas : Contrôles homozygotes	Proportion affectée homozygote	Proportion non affectée homozygote
20	4824556-4834874	26:30	40,625%	81,081%
20	5975071-6067898	24:28	37,5%	75,675%
26	40020829-40059584	31:4	48,437%	10,810%
19	8803509-9308744	32:31	50%	83,783%
23	35779606-36229023	19:23	29,687%	62,162%

Par la suite, une analyse d'homozygotie a été effectuée dans les races plus proches génétiquement afin de confirmer que l'absence de régions homozygotes était liée à l'aspect multigénique de la maladie et non simplement à l'éloignement génétique de ces races. L'étude a été faite chez 4 races génétiquement reliées : 5 GB affectés, 5 CKCS affectés, 4 King Charles affectés et 4 Affenpinsher affectés (Tableau 15). Les cinq GB ont été choisis aléatoirement. Il était impossible d'inclure tous les chiens de cette race étant donné qu'ils auraient complètement biaisé l'analyse en surreprésentant leurs propres régions homozygotes. Un grand nombre de régions étaient fortement partagées entre ces 4 races. La région sur chromosome 4 est particulièrement intéressante, car elle est partagée par tous les chiens, sauf un. Elle contient un gène connu sous le nom de Growth hormone receptor (*GHR*) dont les mutations causent une forme de nanisme<sup>196,197</sup>. Cette région serait donc intéressante si ce n'était du fait que tous les GB sont homozygotes pour cette dernière (affectés et non affectés).

Tableau 15 : Régions d'homozygotie partagées par 4 races génétiquement proches

Nombre de chiens affectés homozygotes	Chromosome	Position de départ	Position de fin	Races ne partageant pas ce segment
17	4	70140909	70683264	1 Affenpinscher
16	25	5563500	6698424	1 KC, 1 CKCS
16	12	34501418	34857665	1 CKCS, 1 GB
16	9	56434621	56792382	1 CKCS, 1 GB
15	35	18749846	18868642	1 KC, 1 Affen, 1GB
15	31	5944742	6978562	1 Affen, 2 GB
15	31	3058088	3688440	3 CKCS
15	30	4179405	4808061	3 GB
15	20	4845023	5664359	1 Affen, 2 CKCS
15	15	9444732	9977592	1Affen, 1 CKCS, 1GB
15	13	4011324	4025406	2 Affen, 1 CKCS
15	12	42692313	43024073	3 GB
15	9	30745103	30795413	1KC, 2 CKCS
15	9	27204161	28053901	1 KC, 2 GB
15	6	26683898	27535949	1 KC, 1 Affen, 1 CKCS
15	1	102585908	103121770	1 CKCS, 2 GB

GHR pourrait néanmoins être un déterminant majeur de la petite taille de tous les chiens investigués (toutes ces races étant des «toy breeds»). La région avec la plus forte disproportion dans le Tableau 15 sur le chromosome 20 est aussi présente dans les régions les plus partagées à travers ces 4 races affectées. Cependant, aucune des régions identifiées n'était homozygote dans les 27 autres races affectées.

## 5. Discussion

Cette étude a permis l'identification de plusieurs régions associées à la MCL. De plus, le modèle canin a prouvé son importance comme modèle pour les études génétiques des maladies complexes. Cette complexité et les résultats obtenus de notre étude seront discutés dans cette section.

### 5.1 Régions associées à la MCL

Suite aux études d'association présentées dans la section 4, le locus 1 sur le chromosome 2 semble fortement associé à la MCL. Cette région de 1,9Mb représente un haplotype protecteur familial qui est présent chez 20 non-atteints et 52 atteints dans la cohorte de la cartographie fine. Cet haplotype semblait initialement causé par un biais d'admixture, mais la faible association à MCL dans la cohorte familiale laisse croire autrement. L'effet protecteur à l'intérieur de la famille n'est pas statistiquement significatif, mais la Figure 12 (Section 4.1.2.3) démontre l'importance de cette région. Cette région n'explique probablement qu'une petite partie de la variabilité génétique. Par contre, ces résultats fournissent un point d'entrée vers une meilleure compréhension de la pathogénèse de la MCL. Tel que discuté précédemment, le gène *Kazrin* est un des candidats les plus forts dans cette région. La fonction de ce gène reste à ce jour majoritairement inconnu. Ce gène interagit avec la periplakine dans les desmosomes et est associé aux interactions cellules-cellules<sup>198</sup>. Il est impliqué dans la différenciation des kératinocytes et la régulation des jonctions qui les unient<sup>187</sup>. Il a aussi été proposé que *Kazrin* soit impliqué dans l'apoptose à travers *BAX* et *ARP*<sup>199</sup>. De plus, le *knock-out* de ce gène chez la grenouille est responsable de malformations cranio-faciales comprenant un sous-développement du crâne<sup>200</sup>, ce qui en fait un candidat très intéressant pour la pathogénèse de la MCL. Ce phénotype est compatible avec l'hypothèse sur l'étiologie de la MCL suggérant qu'une petite FCP conduit à l'obstruction du foramen magnum avec une herniation des amygdales cérébelleuses. Il sera très pertinent de séquencer ce gène chez des chiens atteints et non-atteints de la même famille, afin d'investiguer son rôle dans la MCL.

La région sur le chromosome 13 identifiée par l'étude d'association du génome entier sur la cohorte de 113 GB représente une excellente région candidate pour la MCL. Cet haplotype protecteur de 4Mb est la seule région possédant un SNP significatif. Une étude de cartographie fine sera effectuée sur cette région afin de réduire la région d'investigation et de potentiellement identifier la cause de ce puissant haplotype protecteur chez d'autres chiens non-familiaux. En effet, cette région a probablement un des effets les plus marqués des régions investiguées. Une telle affirmation est possible, étant donné qu'aucun affecté à l'intérieur comme à l'extérieur de la famille ne semble partager cet haplotype. On peut émettre l'hypothèse que la présence de cet haplotype soit suffisante pour prévenir le développement de la maladie. L'identification d'un haplotype protecteur rare pourrait fortement influencer les méthodes des éleveurs de GB et tout au moins diminuer la prévalence de la maladie chez cette population. Un total de 25 gènes étaient annotés dans cette région, parmi lesquels le gène *RUFY3* représente le meilleur candidat selon son patron d'expression chez l'humain et sa fonction connue. La seule fonction qui est associée à *RUFY3*, à ce jour, est l'inhibition de la croissance axonale<sup>195</sup>. Cette fonction est compatible avec l'hypothèse de la MCI voulant que le cerveau soit trop gros pour le crâne. De plus, l'expression de ce gène chez l'humain est limitée au cerveau ce qui expliquerait que la MCL n'a pas d'atteintes pléiotropiques. Dans le cas où la maladie est complexe, nous pourrions assumer que ce gène affecte légèrement la taille du cerveau et que cela, combiné à un sous-développement de la FCP, pourrait contribuer de façon significative à la pathogénèse de la MCL.

L'étude d'homozygocité a identifié une région sur le chromosome 20 avec une forte disproportion d'homozygocité entre les affectés et les non affectés des chiens GB (Tableau 14). Cette région était fortement partagée à travers les 4 races affectées et génétiquement reliées (voir section 4.3) et représente une région candidate intéressante. L'absence de régions complètement homozygotes montre que le locus causatif de la MCL n'est pas partagé de manière récessive à travers les diverses races affectées. Cette conclusion ne s'applique qu'aux locus récessifs, laissant la possibilité qu'un locus dominant soit partagé.

## 5.2 Haplotypes protecteurs

Un total de 2 régions ont été discutées plus en profondeur dans le cadre de cet ouvrage : la région sur le chromosome 2 et celle sur le chromosome 13.

Le locus 1 sur le chromosome 2 a été identifié à l'aide de la première étude d'association du génome entier sur une cohorte de 56 GB. Suite à une investigation plus poussée, il a été conclu que cette région était majoritairement protectrice à l'intérieur de la famille. La reconstruction des haplotypes des locus 2 à 6 a aussi identifié des haplotypes protecteurs. Un haplotype protecteur a aussi pu être observé dans la région associée sur le chromosome 13 et identifié à l'aide de l'étude d'association du génome entier sur la cohorte de 113 GB.

L'identification des haplotypes protecteurs dans toutes ces régions associées contredit la prémisse selon laquelle des mutations causatives seraient responsables de la maladie. Les haplotypes protecteurs ont été reportés à plusieurs reprises dans la littérature<sup>201,202,203</sup>, mais ils demeurent beaucoup moins fréquents que les haplotypes causatifs. Notre incapacité à identifier un haplotype causatif soulève donc une question sur la transmission de la maladie. En effet, nous sommes confrontés à une étude où toutes les régions identifiées (significatives et non-significatives) ont tous des effets protecteurs. Cette caractéristique de notre étude a initialement été vue comme un biais causé par la présence d'une grande famille. Cependant, l'analyse approfondie de la distribution de ces haplotypes suggère plutôt que la famille aurait joué un effet positif dans la découverte de régions associées. La raison est que dans le cas d'une maladie complexe, l'utilisation de familles permet de réduire la variabilité génétique et de mieux cibler certains des déterminants de la maladie.

Suite à cette conclusion, nous avons élaboré une nouvelle hypothèse expliquant la présence des haplotypes protecteurs dans nos études d'association à la MCL. L'idée est que le trait brachycéphalique commun à tous les chiens affectés serait le déterminant majeur de l'apparition de la maladie. Tel que mentionné dans l'introduction, un chien brachycéphalique a un crâne de taille réduite qui pourrait expliquer l'apparition de la

MCL. Les régions identifiées dans notre étude contiennent des variants ou des modificateurs génétiques avec des effets modérés qui pourraient entraîner une légère diminution de la taille du cerveau ou une légère augmentation de la taille de la FCP protégeant ainsi contre le développement de la maladie. Ces mutations protectrices auraient pu apparaître bien avant la formation de la race du GB et auraient commencé à donner un avantage reproductif très récemment avec la formation du phénotype brachycéphalique. Selon cette idée, la maladie aurait une complexité inattendue. Malgré cette complexité, l'identification de 2 régions fortement associées à la MCL confirme tout de même la puissance du modèle canin. À l'aide de la forte homogénéité génétique de la race en plus de la famille, il est probable que nous pourrions identifier un grand nombre de variants génétiques associés à cette maladie. Notre étude représente une grande progression face aux études humaines qui n'ont à ce jour identifié aucun gène prédisposant à cette maladie.

### **5.3 Modèle du chien**

Tel que mentionné dans l'introduction, le modèle canin a été utile à plusieurs reprises afin d'investiguer des maladies autant complexes que mendéliennes. Les résultats obtenus dans ce mémoire démontrent une fois de plus la puissance de ce modèle dans l'investigation de maladies complexes. La MCL s'est révélée plus complexe qu'initialement conçue et selon notre hypothèse de la pathogénèse inversée basée sur des haplotypes protecteurs, il est possible qu'un grand nombre de gènes expliquent ce trait. Une telle complexité chez l'humain aurait été impossible à détecter même à l'intérieur d'une famille. La forte homogénéité génétique du chien a permis d'identifier 2 régions fortement associées de manière protectrice à la maladie. Quoique ces résultats compliquent peut-être le transfert de connaissance vers l'humain, il s'agit tout de même d'un premier pas vers une meilleure compréhension de la MCL et de la MCI. De plus, ce type de génétique est une découverte qui pourrait peut-être expliquer une partie de l'héritabilité manquante chez l'humain. Dans cette optique, le chien serait un excellent modèle pour en faire l'étude.

## 5.4 Études futures

Les prochaines étapes de ce projet consisteront à continuer l'investigation des régions candidates et d'investiguer les autres régions potentiellement associées. *Kazrin* représente un excellent candidat pour la MCL. Le séquençage de son cadre de lecture est présentement en cours, mais aucune mutation commune dans la famille n'a été identifiée pour l'instant. Le reste des exons du gène seront séquencés au cours des prochains mois. La région sur le chromosome 13 sera quant à elle soumise à une cartographie fine afin d'identifier un gène candidat. Dans le cas où aucune mutation pathogénique n'est identifiée dans la région codante des gènes candidats, des études d'expression à l'aide des tissus récoltés seront effectuées. Nous considérons aussi la possibilité de séquencer la totalité des régions associées à l'aide du séquençage de nouvelle génération permettant ainsi d'investiguer les séquences codantes de tous les gènes présents ainsi que les régions régulatrices. En ce moment, l'absence de ressources pour le génome canin élimine la possibilité d'un séquençage de l'exome. De plus, le séquençage de la totalité de la région devra être fait sur plusieurs chiens étant donné qu'aucune ressource comme Hapmap et 1000 genome n'est disponible chez le chien afin de séparer les variants communs de ceux potentiellement pathogéniques.

Par la suite, nous comptons aussi investiguer la région sur le chromosome 38 qui était la seule région sur laquelle nous avons observé une augmentation de la valeur P lors de la cartographie fine (voir section 4.1.2.2). Des 6 locus investigués à cette étape, il s'agissait du seul à montrer une valeur P augmentée, suggérant une réelle association. Cette étape sera effectuée grâce au programme PHASE permettant de reconstruire les haplotypes de cette région à l'aide des données de la nouvelle étude d'association du génome entier.

Une région sur le chromosome 27 retrouvée dans le Tableau 10 est aussi un candidat intéressant. Cette région n'est pas significative sous Bonferroni, mais le score de cette région semble venir également des deux cohortes, ce qui en fait un candidat intéressant qui ne serait peut-être pas influencé par la famille. L'investigation de cette

région sera aussi faite à l'aide du logiciel PHASE afin de mieux comprendre la distribution des haplotypes de cette région dans notre cohorte.

Finalement, une nouvelle approche sera utilisée dans l'investigation de la MCL. Des données quantitatives sur la taille des structures de la tête ont été recueillies chez les GB contenus dans l'étude d'association du génome entier de 140 chiens avec 173 662 SNPs. Une étude de trait quantitatif (QTL) sera effectuée afin d'identifier des gènes associés à la MCL. Cette technique à l'avantage de tester la divergence de taille des structures du crâne entre les affectés et les non affectés, ce qui augmente la chance de détecter une association. L'idée est que si la maladie est multigénique, alors les gènes impliqués dans son étiologie agiront sur plusieurs structures et alors l'utilisation du QTL permettra d'identifier le lien entre un gène et la structure qu'il influence. Le succès de cette analyse permettrait de mieux comprendre l'étiologie de la MCL.



## 6. Conclusion

Cette étude a identifié 2 nouvelles régions associées à la MCL chez le GB. Leur analyse a permis de détecter des haplotypes protecteurs fortement associés à la maladie. Ces haplotypes étaient tous surreprésentés dans une famille de 41 chiens, suggérant que leur effet était plus marqué dans ce groupe. L'investigation de ces 2 régions ainsi que de toutes les autres régions avec une faible association a permis d'observer que tous les haplotypes semblaient suivre cette tendance protectrice. Ainsi, il a été possible de poser l'hypothèse que la pathogénèse de la MCL était inversée. Plus précisément, tous les GB sont affectés dû à leur condition brachycéphalique et les gènes protecteurs agissent comme des modificateurs réduisant l'impact de ce trait physiologique présent dans toute la race. Il s'agit là d'une hypothèse, mais si elle s'avère réelle, elle sera à notre connaissance le premier rapport sur ce type d'héritabilité. En plus de cela, nous espérons que l'investigation des régions associées dans la MCL permettra de développer un test diagnostique chez le chien afin d'éliminer la maladie et servira de porte d'entrée dans la pathologie humaine.

<b>Annexe 1: Résumé des maladies et des syndromes associés à la MCI</b>			
Syndromes (phénotype MIM#)	Locus, Gène	Fonction du gène	Références
<b>Origine mésodermique</b>			
Achondroplasie (MIM# 100800)	4p16.3, <i>FGFR3</i> (fibroblast growth factor receptor 3)	Récepteur transmembranaire de facteur de croissance contrôlant la signalisation FGF durant le développement.	Nakai et al. 1995 ; Bauer et al. 2005; Caldarelli et al. 2007 ; Richette et al. 2008
Syndrome de Crouzon (MIM# 123500) Syndrome d'Apert (MIM#101200)	10q26.13, <i>FGFR2</i> (Fibroblast growth factor receptor-2)	Récepteur transmembranaire de facteur de croissance contrôlant la signalisation FGF durant le développement.	Cinalli et al. 1995; Park et al. 1994 ; Reardon et al. 1995
Syndrome Hajdu-Cheney (MIM# 102500)	1p12-p11, <i>NOTCH2</i> (Notch gene homolog 2)	Protéine transmembranaire de type Notch 1 jouant un rôle dans le métabolisme osseux.	Di Rocco and Oi 2005; Simpson et al. 2011
Syndrome Klippel-Feil (MIM# 118100)	8q22.1, <i>GDF6</i> (growth/differentiation factor 6)	Morphogène osseux régulant la formation d'articulations dans les membres, le crâne et le squelette axial.	Tubbs et al. 2003 ; Tassabehji et al. 2008
Syndrome Loeys-Dietz type 1 (MIM# 609192)	9q22.33, <i>TGFBR1</i> (Transforming growth factor, beta receptor 1)	Protéine serine/thréonine kinase impliquée dans la signalisation TGF-beta.	Loeys et al. 2006
Syndrome Noonan-1 (MIM# 163950)	12q24.13, <i>PTPN11</i> (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 )	Protéine tyrosine kinase impliquée dans la signalisation MAPK à travers RAS.	Croonen et al. 2008; Holder-Espinasse and Winter, 2003
Maladie de Paget (MIM# 602080)	Hétérogénéité génétique : 5q31, <i>PDB4</i> (Paget disease of bone 4) 5q35.3, <i>SQSTM1</i> (Sequestosome 1) 18q21.33, <i>TNFRSF11A</i> (Tumor necrosis factor	<i>PDB4</i> : fonction inconnue. <i>SQSTM1</i> : Lie l'ubiquitine et régule l'activation de la voie de signalisation NF-kB. <i>TNFRSF11A</i> : Membre de la famille des récepteur de TNF et est essentiel dans le développement des ostéoclastes et des	Otsuka et al. 2004; Richards et al. 2001

	receptor superfamily, member 11a)	ganglions lymphatiques.	
Dysplasie cléidocraniale (MIM#600211)	6p21.1, <i>RNX2</i> (Runt-related transcription factor 2)	Facteur de transcription, impliqué dans la différenciation des ostéoclastes.	Vari et al. 1996 ; Ziros et al. 2007
Syndrome Velocardiofaciale (MIM#192430)	Délétion de 1.5 à 3.0 Mb sur le chromosome 22q11.2. Quelques cas causés par une mutation dans <i>TBX-1</i> .	<i>TBX1</i> : Facteur de transcription avec un domaine de conservé de liaison à l'ADN T-box.	Hultman et al. 2000; Yagi et al. 2003
Rachitisme hypophosphatémique (MIM# 307800)	Xp22.11, <i>PHEX</i> (phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked)	Métalloprotéase Zinc-dépendante trouvé dans la surface cellulaire des ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes.	Caldemeyer et al. 1995; The HYP Consortium 1995
Syndrome Shprintzen-Goldberg (MIM# 182212)	15q21.1, <i>FBNI</i> (Fibrillin1) dans certains cas	Matrice de glycoprotéines extracellulaires servant de composant des microfibrilles.	Sood et al. 1996; Greally 2006
Origine inconnue			
Syndrome de Costello (MIM# 218040)	11p15.5, <i>HRAS</i> (v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)	Membre de la famille des oncogènes Ras fonctionnant dans les voies de transduction du signal.	Gripp et al. 2010; White et al. 2005
Syndrome de la délétion Chromosome 1p32-p31 (MIM# 613735)	1p32-p31, <i>NF1A</i> (Nuclear factor 1)	Facteur de transcription CAAT box, joue un rôle important dans le développement.	Lu et al. 2007
Déficiência hormonale pituitaire combinée -4 (MIM#262700)	1q25.2, <i>LHX4</i> (LIM-homeobox 4)	Facteur de transcription, fonctionne durant le développement de la glande pituitaire et du système nerveux.	Machinis et al. 2001; Tajima et al. 2004
Malformation macrocéphalie capillaire (MIM# 602501)	Inconnu	Inconnu	Garavelli et al. 2005; Conway et al. 2007

Impression basilaire primaire (MIM#109500)	Inconnu	Inconnu		Bentley et al. 1975
Réarrangements chromosomiques 16p11.2	Inconnu	Inconnu		Schaaf et al. 2011
Syndrome de William ou syndrome de la délétion 7q11.23 (MIM#194050)	Délétion de 1.5 à 1.8Mb sur le chromosome 7q11.23	Inconnu		Ferrero et al. 2007, Mercuri et al. 1997, Pober and Filiano 1995
Syndrome blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus de type II (BPES) (MIM# #110100)	3q22.3, <i>FOXL2</i> (Forkhead box L2)	Facteur de transcription forkhead, important dans le développement ovarien		Paquis et al. 1998 ; Crisponi et al. 2001
Déficience idiopatique en hormone de croissance (MIM# 173100)	17q23.3, <i>GHI</i> (growth hormone)	Hormone de croissance.		Tubbs et al. 2003 ; Alatzoglou et al. 2010
Origine ectodermique				
Neurofibromatosis type I (MIM# 162200)	17q11.2, (neurofibromin)	<i>NFI</i>	Régulateur négatif de la voie de signalisation Ras.	Tubbs et al. 2003 ; Tubbs et al. 2004a ; Yohay 2006
Syndrome kabuki (MIM# 147920)	12q12-q14; (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2)	<i>MLL2</i>	Méthyltransférase d'histone important dans le contrôle épigénétique de l'état de la chromatine.	Ciprero et al 2005; Ng et al. 2010
Syndrome de la lissencéphalie de Miller-Dieker (MIM#247200)	17p13.3, (platelet-activating factor acetylhydrolase ( isoform Ib)	<i>PAFAH1B1</i>	Enzyme inhibitrice du « platelet-activating factor », importante dans la migration neuronale.	Nagamani et al. 2009

Origine endodermique			
Fibrose Kystique (MIM# 219700)	7q31.2, <i>CFTR</i> (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	Membre de la famille des transporteurs « ATP-binding cassette ». Canaux chlorures.	Bobadilla et al. 2002 ; Patel et al. 2011

Annexe 2: 10 SNPs significatifs suivant 100 000 permutations dans l'étude d'association du génome entier initiale

CHR	SNP	Position	Score avec permutations
<b>2 (locus 1)</b>	BICF2S23555042	85458684	2,00E-05
	BICF2S23232840	87170677	0,02865
<b>2 (locus 2)</b>	BICF2P1052711	64756277	0,00046
	BICF2P963534	65745071	0,01315
	BICF2P688671	65209708	0,0497
<b>12 (locus 3)</b>	BICF2P924392	6720932	0,007
	BICF2P1024454	7038783	0,02784
<b>8 (locus 4)</b>	BICF2P823171	22440540	0,03354
<b>16 (locus 5)</b>	BICF2P499746	26848226	0,03845
<b>38 (locus 6)</b>	BICF2S2415040	4286737	0,03027

Annexe 3 : Meilleurs scores de la cohorte de la seconde étude d'association du génome entier sans la famille

Chromosome	SNP	Position	Fréquence chez les affectés	Fréquence chez les non affectés	Cohorte sans famille
<b>2</b>	P21202	80282465	0.5	0	1,47E-06
<b>16</b>	P296719	28407743	0	0.4	1,90E-06
<b>13</b>	P155672	40852647	0.03947	0.4375	3,33E-06
<b>35</b>	P455161	6198596	0	0.25	3,78E-06
<b>39</b>	TIGRP2P135233	31811399	0.01818	0.4	4,30E-06
<b>6</b>	TIGRP2P82657	42709231	0.04545	0.45	4,79E-06
<b>10</b>	S23640227	41622898	0.1463	0.5588	4,88E-06
<b>21</b>	G630657404	11870689	0	0.25	7,08E-06
<b>21</b>	TIGRP2P287709	49443153	0.4722	0	7,17E-06
<b>31</b>	2P344565	5387241	0.01282	0.3125	7,93E-06

## Bibliographie

1. Schijman, E. History, anatomic forms, and pathogenesis of Chiari I malformations. *Childs Nerv Syst* **20**, 323–328 (2004).
2. Chiari, H. Concerning alterations in the cerebellum resulting from cerebral hydrocephalus. 1891. *Pediatr Neurosci* **13**, 3–8 (1987).
3. PEACH, B. ARNOLD-CHIARI MALFORMATION: ANATOMIC FEATURES OF 20 CASES. *Arch. Neurol.* **12**, 613–621 (1965).
4. Massimi, L., Peppucci, E., Peraio, S. & Rocco, C. History of Chiari type I malformation. *Neurological Sciences* **32**, 263–265 (2011).
5. Barkovich, A. J., Wippold, F. J., Sherman, J. L. & Citrin, C. M. Significance of cerebellar tonsillar position on MR. *AJNR Am J Neuroradiol* **7**, 795–799 (1986).
6. Meadows, J., Kraut, M., Guarnieri, M., Haroun, R. I. & Carson, B. S. Asymptomatic Chiari Type I malformations identified on magnetic resonance imaging. *J. Neurosurg.* **92**, 920–926 (2000).
7. Milhorat, T. H. *et al.* Chiari I malformation redefined: clinical and radiographic findings for 364 symptomatic patients. *Neurosurgery* **44**, 1005–1017 (1999).
8. Ellenbogen, R. G., Armonda, R. A., Shaw, D. W. & Winn, H. R. Toward a rational treatment of Chiari I malformation and syringomyelia. *Neurosurg Focus* **8**, E6 (2000).
9. Koyanagi, I. & Houkin, K. Pathogenesis of syringomyelia associated with Chiari type 1 malformation: review of evidences and proposal of a new hypothesis. *Neurosurgical Review* **33**, 271–285 (2010).
10. Roy, A. K., Slimack, N. P. & Ganju, A. Idiopathic syringomyelia: retrospective case series, comprehensive review, and update on management. *Neurosurg Focus* **31**, E15 (2011).
11. Kurisu, K., Hida, K., Aoyama, T. & Houkin, K. [A successful treatment for a case of idiopathic syringomyelia with syrinx located in the anterior horn]. *No Shinkei Geka* **39**, 1079–1084 (2011).
12. Bogdanov, E. I., Heiss, J. D., Mendeleovich, E. G., Mikhaylov, I. M. & Haass, A. Clinical and neuroimaging features of ‘idiopathic’ syringomyelia. *Neurology* **62**, 791–794 (2004).
13. Klekamp, J. The pathophysiology of syringomyelia - historical overview and current concept. *Acta Neurochir (Wien)* **144**, 649–664 (2002).
14. Struck, A. F. & Haughton, V. M. Idiopathic syringomyelia: phase-contrast MR of cerebrospinal fluid flow dynamics at level of foramen magnum. *Radiology* **253**, 184–190 (2009).
15. Mesiwala, A. H., Shaffrey, C. I., Gruss, J. S. & Ellenbogen, R. G. Atypical hemifacial microsomia associated with Chiari I malformation and syrinx: further evidence indicating that chiari I malformation is a disorder of the paraaxial mesoderm. Case report and review of the literature. *J. Neurosurg.* **95**, 1034–1039 (2001).
16. Nishikawa, M., Sakamoto, H., Hakuba, A., Nakanishi, N. & Inoue, Y. Pathogenesis of Chiari malformation: a morphometric study of the posterior cranial fossa. *J. Neurosurg.* **86**, 40–47 (1997).

17. Badie, B., Mendoza, D. & Batzdorf, U. Posterior fossa volume and response to suboccipital decompression in patients with Chiari I malformation. *Neurosurgery* **37**, 214–218 (1995).
18. Vega, A., Quintana, F. & Berciano, J. Basichondrocranium anomalies in adult Chiari type I malformation: a morphometric study. *J. Neurol. Sci.* **99**, 137–145 (1990).
19. Stovner, L. J., Bergan, U., Nilsen, G. & Sjaastad, O. Posterior cranial fossa dimensions in the Chiari I malformation: relation to pathogenesis and clinical presentation. *Neuroradiology* **35**, 113–118 (1993).
20. Furtado, S. V., Thakre, D. J., Venkatesh, P. K., Reddy, K. & Hegde, A. S. Morphometric analysis of foramen magnum dimensions and intracranial volume in pediatric Chiari I malformation. *Acta Neurochir (Wien)* **152**, 221–227; discussion 227 (2010).
21. Aydin, S., Hanimoglu, H., Tanriverdi, T., Yentur, E. & Kaynar, M. Y. Chiari type I malformations in adults: a morphometric analysis of the posterior cranial fossa. *Surgical Neurology* **64**, 237–241 (2005).
22. Amer, T. A. & el-Shmam, O. M. Chiari malformation type I: a new MRI classification. *Magn Reson Imaging* **15**, 397–403 (1997).
23. Vannemreddy, P., Nourbakhsh, A., Willis, B. & Guthikonda, B. Congenital Chiari malformations. *Neurol India* **58**, 6–14 (2010).
24. Marin-Padilla, M. & Marin-Padilla, T. M. Morphogenesis of experimentally induced Arnold--Chiari malformation. *J. Neurol. Sci.* **50**, 29–55 (1981).
25. Schady, W., Metcalfe, R. A. & Butler, P. The incidence of craniocervical bony anomalies in the adult Chiari malformation. *J. Neurol. Sci.* **82**, 193–203 (1987).
26. Nyland, H. & Krogness, K. G. Size of posterior fossa in Chiari type 1 malformation in adults. *Acta Neurochir (Wien)* **40**, 233–242 (1978).
27. Tubbs, R. S., Hill, M., Loukas, M., Shoja, M. M. & Oakes, W. J. Volumetric analysis of the posterior cranial fossa in a family with four generations of the Chiari malformation Type I. *J Neurosurg Pediatr* **1**, 21–24 (2008).
28. GARDNER, W. J. HYDRODYNAMIC MECHANISM OF SYRINGOMYELIA: ITS RELATIONSHIP TO MYELOCELE. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **28**, 247–259 (1965).
29. BARRY, A., PATTEN, B. M. & STEWART, B. H. Possible factors in the development of the Arnold-Chiari malformation. *J. Neurosurg.* **14**, 285–301 (1957).
30. Goldstein, F. & Kepes, J. J. The role of traction in the development of the Arnold-Chiari malformation. An experimental study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **25**, 654–666 (1966).
31. Royo-Salvador, M. B., Solé-Llenas, J., Doménech, J. M. & González-Adrio, R. Results of the section of the filum terminale in 20 patients with syringomyelia, scoliosis and Chiari malformation. *Acta Neurochir (Wien)* **147**, 515–523; discussion 523 (2005).
32. Tubbs, R. S. *et al.* Critical analysis of the Chiari malformation Type I found in children with lipomyelomeningocele. *J. Neurosurg.* **106**, 196–200 (2007).
33. McLone, D. G. & Knepper, P. A. The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatr Neurosci* **15**, 1–12 (1989).



34. McLone, D. G. & Dias, M. S. The Chiari II malformation: cause and impact. *Childs Nerv Syst* **19**, 540–550 (2003).
35. Isu, T., Sasaki, H., Takamura, H. & Kobayashi, N. Foramen magnum decompression with removal of the outer layer of the dura as treatment for syringomyelia occurring with Chiari I malformation. *Neurosurgery* **33**, 844–849; discussion 849–850 (1993).
36. Lee, H. S. *et al.* Surgical results of arachnoid-preserving posterior fossa decompression for Chiari I malformation with associated syringomyelia. *Journal of Clinical Neuroscience* doi:10.1016/j.jocn.2011.06.034
37. Doughty, K. E., Tubbs, R. S., Webb, D. & Oakes, W. J. Delayed resolution of Chiari I-associated hydromyelia after posterior fossa decompression: case report and review of the literature. *Neurosurgery* **55**, 711 (2004).
38. Lynn, D. J., Newton, H. B. & Rae-Grant, A. *The 5-minute neurology consult.* (Lippincott Williams & Wilkins: 2003).
39. Schijman, E. & Steinbok, P. International survey on the management of Chiari I malformation and syringomyelia. *Childs Nerv Syst* **20**, 341–348 (2004).
40. Cheng, J. S., Nash, J. & Meyer, G. A. Chiari type I malformation revisited: diagnosis and treatment. *Neurologist* **8**, 357–362 (2002).
41. Coria, F., Quintana, F., Rebollo, M., Combarros, O. & Berciano, J. Occipital dysplasia and Chiari type I deformity in a family. Clinical and radiological study of three generations. *J. Neurol. Sci.* **62**, 147–158 (1983).
42. Herman, M. D., Cheek, W. R. & Storrs, B. B. Two siblings with the Chiari I malformation. *Pediatr Neurosurg* **16**, 183–184 (1990).
43. Zakeri, A., Glasauer, F. E. & Egnatchik, J. G. Familial syringomyelia: case report and review of the literature. *Surg Neurol* **44**, 48–53 (1995).
44. George, S. & Page, A. B. Familial Arnold-Chiari Type I malformation. *Eye (Lond)* **20**, 400–402 (2006).
45. Mavinkurve, G. G., Sciubba, D., Amundson, E. & Jallo, G. I. Familial Chiari type I malformation with syringomyelia in two siblings: case report and review of the literature. *Child's Nervous System* **21**, 955–959 (2005).
46. Murphy, R. L., Tubbs, R. S., Grabb, P. A. & Oakes, W. J. Chiari I malformation and idiopathic growth hormone deficiency in siblings. *Childs Nerv Syst* **22**, 632–634 (2006).
47. Weisfeld-Adams, J. D., Carter, M. R., Likeman, M. J. & Rankin, J. Three sisters with Chiari I malformation with and without associated syringomyelia. *Pediatr Neurosurg* **43**, 533–538 (2007).
48. Stovner, L. J., Cappelen, J., Nilsen, G. & Sjaastad, O. The Chiari type I malformation in two monozygotic twins and first-degree relatives. *Ann. Neurol.* **31**, 220–222 (1992).
49. Cavender, R. K. & Schmidt, J. H., 3rd Tonsillar ectopia and Chiari malformations: monozygotic triplets. Case report. *J. Neurosurg.* **82**, 497–500 (1995).
50. Gripp, K. W., Scott, C. I., Jr, Nicholson, L., Magram, G. & Grissom, L. E. Chiari malformation and tonsillar ectopia in twin brothers and father with autosomal dominant spondylo-epiphyseal dysplasia tarda. *Skeletal Radiol.* **26**, 131–133 (1997).

51. Atkinson, J. L., Kokmen, E. & Miller, G. M. Evidence of posterior fossa hypoplasia in the familial variant of adult Chiari I malformation: case report. *Neurosurgery* **42**, 401–403; discussion 404 (1998).
52. Tubbs, R. S., Wellons, J. C., 3rd, Blount, J. P. & Oakes, W. J. Syringomyelia in twin brothers discordant for Chiari I malformation: case report. *J. Child Neurol.* **19**, 459–462 (2004).
53. Atkinson, J. L., Kokmen, E. & Miller, G. M. Evidence of posterior fossa hypoplasia in the familial variant of adult Chiari I malformation: case report. *Neurosurgery* **42**, 401–403; discussion 404 (1998).
54. Solth, A., Barrett, C., Holliman, D. & Mitchell, P. Chiari malformation in female monozygotic twins. *Br J Neurosurg* **24**, 607–608 (2010).
55. Szewka, A. J., Walsh, L. E., Boaz, J. C., Carvalho, K. S. & Golomb, M. R. Chiari in the family: inheritance of the Chiari I malformation. *Pediatr. Neurol.* **34**, 481–485 (2006).
56. Speer, M. C. *et al.* A genetic hypothesis for Chiari I malformation with or without syringomyelia. *Neurosurg Focus* **8**, E12 (2000).
57. Schanker, B. D. *et al.* Familial Chiari malformation: case series. *Neurosurg Focus* **31**, E1 (2011).
58. Robenek, M., Kloska, S. P. & Husstedt, I. W. Evidence of familial syringomyelia in discordant association with Chiari type I malformation. *Eur. J. Neurol.* **13**, 783–785 (2006).
59. Mendelevich, E. G., Bogdanov, E. I. & Chuvashaev, I. R. [Family cases of syringomyelia and Arnold-Chiari anomalies]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* **100**, 93–95 (2000).
60. Boyles, A. L. *et al.* Phenotypic definition of Chiari type I malformation coupled with high-density SNP genome screen shows significant evidence for linkage to regions on chromosomes 9 and 15. *Am. J. Med. Genet. A* **140**, 2776–2785 (2006).
61. Zhang, H., Hu, W. & Ramirez, F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.* **129**, 1165–1176 (1995).
62. Lin, G. *et al.* Homo- and heterotypic fibrillin-1 and -2 interactions constitute the basis for the assembly of microfibrils. *J. Biol. Chem.* **277**, 50795–50804 (2002).
63. Corson, G. M., Chalberg, S. C., Dietz, H. C., Charbonneau, N. L. & Sakai, L. Y. Fibrillin binds calcium and is coded by cDNAs that reveal a multidomain structure and alternatively spliced exons at the 5' end. *Genomics* **17**, 476–484 (1993).
64. McLain, K., Schreiner, C., Yager, K. L., Stock, J. L. & Potter, S. S. Ectopic expression of Hox-2.3 induces craniofacial and skeletal malformations in transgenic mice. *Mech. Dev.* **39**, 3–16 (1992).
65. Matsuoka, T. *et al.* Neural crest origins of the neck and shoulder. *Nature* **436**, 347 (2005).
66. Barnes, G. L., Hsu, C. W., Mariani, B. D. & Tuan, R. S. Chicken Pax-1 gene: structure and expression during embryonic somite development. *Differentiation* **61**, 13–23 (1996).

67. Mansouri, A., Hallonet, M. & Gruss, P. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 851–857 (1996).
68. Schimmenti, L. A. *et al.* Homonucleotide expansion and contraction mutations of PAX2 and inclusion of Chiari 1 malformation as part of renal-coloboma syndrome. *Hum. Mutat.* **14**, 369–376 (1999).
69. Fujisawa, H., Hasegawa, M., Kida, S. & Yamashita, J. A novel fibroblast growth factor receptor 2 mutation in Crouzon syndrome associated with Chiari type I malformation and syringomyelia. *J. Neurosurg.* **97**, 396–400 (2002).
70. McGaughran, J. M., Oates, A., Donnai, D., Read, A. P. & Tassabehji, M. Mutations in PAX1 may be associated with Klippel-Feil syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **11**, 468–474 (2003).
71. McMahon, J. A. *et al.* Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev.* **12**, 1438–1452 (1998).
72. Garcia-Miñaur, S. *et al.* Interstitial deletion of the long arm of chromosome 5 in a boy with multiple congenital anomalies and mental retardation: Molecular characterization of the deleted region to 5q22.3q23.3. *Am. J. Med. Genet. A* **132**, 402–410 (2005).
73. Hilal, L. *et al.* Unusual phenotypic features in a patient with a novel splice mutation in the GHRHR gene. *Mol. Med.* **14**, 286–292 (2008).
74. Halmos, G. *et al.* Expression of growth hormone-releasing hormone and its receptor splice variants in human prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 4707–4714 (2002).
75. Miró, X. *et al.* Haploinsufficiency of the murine polycomb gene Suz12 results in diverse malformations of the brain and neural tube. *Dis Model Mech* **2**, 412–418 (2009).
76. Squazzo, S. L. *et al.* Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome Res.* **16**, 890–900 (2006).
77. Wójcik, C. *et al.* Rubinstein-Taybi syndrome associated with Chiari type I malformation caused by a large 16p13.3 microdeletion: a contiguous gene syndrome? *Am. J. Med. Genet. A* **152A**, 479–483 (2010).
78. Carr, C. W. *et al.* Chiari I malformation, delayed gross motor skills, severe speech delay, and epileptiform discharges in a child with FOXP1 haploinsufficiency. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 1216–1220 (2010).
79. Kirberger, R. M., Jacobson, L. S., Davies, J. V. & Engela, J. Hydromyelia in the dog. *Vet Radiol Ultrasound* **38**, 30–38 (1997).
80. Rusbridge, C. *et al.* Syringohydromyelia in Cavalier King Charles spaniels. *J Am Anim Hosp Assoc* **36**, 34–41 (2000).
81. Rusbridge, C. & Knowler, S. P. Hereditary aspects of occipital bone hypoplasia and syringomyelia (Chiari type I malformation) in cavalier King Charles spaniels. *Vet. Rec.* **153**, 107–112 (2003).
82. Wolfe, K. C. & Poma, R. Syringomyelia in the Cavalier King Charles spaniel (CKCS) dog. *Can. Vet. J.* **51**, 95–102 (2010).

83. Rusbridge, C., Greitz, D. & Iskandar, B. J. Syringomyelia: current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J. Vet. Intern. Med.* **20**, 469–479 (2006).
84. Pincott, J. R., Davies, J. S. & Taffs, L. F. Scoliosis caused by section of dorsal spinal nerve roots. *J Bone Joint Surg Br* **66**, 27–29 (1984).
85. Van Biervliet, J., de Lahunta, A., Ennulat, D., Oglesbee, M. & Summers, B. Acquired cervical scoliosis in six horses associated with dorsal grey column chronic myelitis. *Equine Vet. J.* **36**, 86–92 (2004).
86. Loder, R. T., Stasikelis, P. & Farley, F. A. Sagittal profiles of the spine in scoliosis associated with an Arnold-Chiari malformation with or without syringomyelia. *J Pediatr Orthop* **22**, 483–491 (2002).
87. Munro, K. J. & Cox, C. L. Investigation of hearing impairment in Cavalier King Charles spaniels using auditory brainstem response audiometry. *J Small Anim Pract* **38**, 2–5 (1997).
88. *The genetic and endocrinic basis for differences in form and behavior: as elucidated by studies of contrasted pure-line dog breeds and their hybrids: Stockard, Charles Rupert, 1879-1939: Free Download & Streaming: Internet Archive.* at <<http://www.archive.org/details/geneticendocrini00stoc>>
89. Scrivani, P. V., Thompson, M. S., Winegardner, K. R., Dewey, C. W. & Scarlett, J. M. Association between frontal-sinus size and syringohydromyelia in small-breed dogs. *Am. J. Vet. Res.* **68**, 610–613 (2007).
90. Raybaud, C. & Di Rocco, C. Brain malformation in syndromic craniosynostoses, a primary disorder of white matter: a review. *Childs Nerv Syst* **23**, 1379–1388 (2007).
91. Cinalli, G. *et al.* Chiari malformation in craniosynostosis. *Childs Nerv Syst* **21**, 889–901 (2005).
92. Carrera, I., Dennis, R., Mellor, D. J., Penderis, J. & Sullivan, M. Use of magnetic resonance imaging for morphometric analysis of the caudal cranial fossa in Cavalier King Charles Spaniels. *Am. J. Vet. Res.* **70**, 340–345 (2009).
93. Cross, H. R., Cappello, R. & Rusbridge, C. Comparison of cerebral cranium volumes between cavalier King Charles spaniels with Chiari-like malformation, small breed dogs and Labradors. *J Small Anim Pract* **50**, 399–405 (2009).
94. Bannasch, D. *et al.* Localization of canine brachycephaly using an across breed mapping approach. *PLoS ONE* **5**, e9632 (2010).
95. Rusbridge, C., Knowler, S. P., Pieterse, L. & McFadyen, A. K. Chiari-like malformation in the Griffon Bruxellois. *J Small Anim Pract* **50**, 386–393 (2009).
96. Levine, D. N. The pathogenesis of syringomyelia associated with lesions at the foramen magnum: a critical review of existing theories and proposal of a new hypothesis. *J. Neurol. Sci.* **220**, 3–21 (2004).
97. Rusbridge, C. & Knowler, S. P. Inheritance of occipital bone hypoplasia (Chiari type I malformation) in Cavalier King Charles Spaniels. *J. Vet. Intern. Med.* **18**, 673–678 (2004).
98. Levine, D. N. Intracranial pressure and ventricular expansion in hydrocephalus: have we been asking the wrong question? *J. Neurol. Sci.* **269**, 1–11 (2008).

99. Moritani, T. *et al.* Magnetic resonance venography of achondroplasia: correlation of venous narrowing at the jugular foramen with hydrocephalus. *Clin Imaging* **30**, 195–200 (2006).
100. Lu, D., Lamb, C. R., Pfeiffer, D. U. & Targett, M. P. Neurological signs and results of magnetic resonance imaging in 40 cavalier King Charles spaniels with Chiari type 1-like malformations. *Vet. Rec.* **153**, 260–263 (2003).
101. Cerda-Gonzalez, S. *et al.* Morphology of the caudal fossa in Cavalier King Charles Spaniels. *Vet Radiol Ultrasound* **50**, 37–46 (2009).
102. Schmidt, M. J., Biel, M., Klumpp, S., Schneider, M. & Kramer, M. Evaluation of the volumes of cranial cavities in Cavalier King Charles Spaniels with Chiari-like malformation and other brachycephalic dogs as measured via computed tomography. *Am. J. Vet. Res.* **70**, 508–512 (2009).
103. Pouratian, N., Sansur, C. A., Newman, S. A., Jane, J. A., Jr & Jane, J. A., Sr Chiari malformations in patients with uncorrected sagittal synostosis. *Surg Neurol* **67**, 422–427; discussion 427–428 (2007).
104. Griffiths, P. D. *et al.* Differential growth rates of the cerebellum and posterior fossa assessed by post mortem magnetic resonance imaging of the fetus: implications for the pathogenesis of the chiari 2 deformity. *Acta Radiol* **45**, 236–242 (2004).
105. Rusbridge, C. Chiari-like malformation with syringomyelia in the Cavalier King Charles spaniel: long-term outcome after surgical management. *Vet Surg* **36**, 396–405 (2007).
106. Dewey, C. W., Berg, J. M., Barone, G., Marino, D. J. & Stefanacci, J. D. Foramen magnum decompression for treatment of caudal occipital malformation syndrome in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **227**, 1270–1275, 1250–1251 (2005).
107. Parker, J. E., Knowler, S. P., Rusbridge, C., Noorman, E. & Jeffery, N. D. Prevalence of asymptomatic syringomyelia in Cavalier King Charles spaniels. *Vet. Rec.* **168**, 667 (2011).
108. Mueller, F., Fuchs, B. & Kaser-Hotz, B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res.* **27**, 155–164 (2007).
109. Lindblad-Toh, K. *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* **438**, 803–819 (2005).
110. Hansen, K. & Khanna, C. Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. *Eur. J. Cancer* **40**, 858–880 (2004).
111. Khanna, C. *et al.* A randomized controlled trial of octreotide pamoate long-acting release and carboplatin versus carboplatin alone in dogs with naturally occurring osteosarcoma: evaluation of insulin-like growth factor suppression and chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2406–2412 (2002).
112. Karlsson, E. K. & Lindblad-Toh, K. Leader of the pack: gene mapping in dogs and other model organisms. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 713–725 (2008).
113. Patterson, D. F. Companion animal medicine in the age of medical genetics. *J. Vet. Intern. Med.* **14**, 1–9 (2000).
114. Ostrander, E. A., Galibert, F. & Patterson, D. F. Canine genetics comes of age. *Trends Genet.* **16**, 117–124 (2000).

115. Ostrander, E. A. & Kruglyak, L. Unleashing the canine genome. *Genome Res.* **10**, 1271–1274 (2000).
116. Parker, H. G. & Ostrander, E. A. Canine genomics and genetics: running with the pack. *PLoS Genet.* **1**, e58 (2005).
117. Wayne, R. K. & Ostrander, E. A. Lessons learned from the dog genome. *Trends Genet.* **23**, 557–567 (2007).
118. Gershwin, L. J. Veterinary autoimmunity: autoimmune diseases in domestic animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1109**, 109–116 (2007).
119. Khanna, C. *et al.* The dog as a cancer model. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1065–1066 (2006).
120. Löscher, W., Schwartz-Porsche, D., Frey, H. H. & Schmidt, D. Evaluation of epileptic dogs as an animal model of human epilepsy. *Arzneimittelforschung* **35**, 82–87 (1985).
121. Overall, K. L. Natural animal models of human psychiatric conditions: assessment of mechanism and validity. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **24**, 727–776 (2000).
122. Vail, D. M. & MacEwen, E. G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest.* **18**, 781–792 (2000).
123. Jezyk, P. F., Felsburg, P. J., Haskins, M. E. & Patterson, D. F. X-linked severe combined immunodeficiency in the dog. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **52**, 173–189 (1989).
124. Lingaas, F. *et al.* Genetic markers linked to neuronal ceroid lipofuscinosis in English setter dogs. *Anim. Genet.* **29**, 371–376 (1998).
125. Lin, L. *et al.* The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* **98**, 365–376 (1999).
126. Jónasdóttir, T. J. *et al.* Genetic mapping of a naturally occurring hereditary renal cancer syndrome in dogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 4132–4137 (2000).
127. Hungs, M. *et al.* Identification and functional analysis of mutations in the hypocretin (orexin) genes of narcoleptic canines. *Genome Res.* **11**, 531–539 (2001).
128. Sidjanin, D. J. *et al.* Canine CNGB3 mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus ACHM3. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1823–1833 (2002).
129. Clark, L. A. *et al.* Linkage analysis and gene expression profile of pancreatic acinar atrophy in the German Shepherd Dog. *Mamm. Genome* **16**, 955–962 (2005).
130. Lohi, H. *et al.* Expanded repeat in canine epilepsy. *Science* **307**, 81 (2005).
131. Zangerl, B. *et al.* Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics* **88**, 551–563 (2006).
132. Acland, G. M. *et al.* Linkage analysis and comparative mapping of canine progressive rod-cone degeneration (prcd) establishes potential locus homology with retinitis pigmentosa (RP17) in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3048–3053 (1998).

133. Chabas, D., Taheri, S., Renier, C. & Mignot, E. The genetics of narcolepsy. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **4**, 459–483 (2003).
134. Lingaas, F. *et al.* A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 3043–3053 (2003).
135. Chase, K., Sargan, D., Miller, K., Ostrander, E. A. & Lark, K. G. Understanding the genetics of autoimmune disease: two loci that regulate late onset Addison's disease in Portuguese Water Dogs. *Int. J. Immunogenet.* **33**, 179–184 (2006).
136. Madsen, M. B. *et al.* Identification of 2 loci associated with development of myxomatous mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniels. *J. Hered.* **102 Suppl 1**, S62–67 (2011).
137. Starr, A. N. *et al.* Hereditary evaluation of multiple developmental abnormalities in the Havanese dog breed. *J. Hered.* **98**, 510–517 (2007).
138. Sutter, N. B. *et al.* Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in *Canis familiaris*. *Genome Res.* **14**, 2388–2396 (2004).
139. Parker, H. G. *et al.* Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science* **304**, 1160–1164 (2004).
140. Club, A. K. *The Complete Dog Book: 20th Edition.* (Ballantine Books: 2006).
141. Parker, H. G. *et al.* Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Res.* **17**, 1562–1571 (2007).
142. Chase, K., Lawler, D. F., Carrier, D. R. & Lark, K. G. Genetic regulation of osteoarthritis: A QTL regulating cranial and caudal acetabular osteophyte formation in the hip joint of the dog (*Canis familiaris*). *Am. J. Med. Genet. A* **135**, 334–335 (2005).
143. Wilbe, M. *et al.* Genome-wide association mapping identifies multiple loci for a canine SLE-related disease complex. *Nat. Genet.* **42**, 250–254 (2010).
144. Boyko, A. R. *et al.* A simple genetic architecture underlies morphological variation in dogs. *PLoS Biol.* **8**, e1000451 (2010).
145. Vaysse, A. *et al.* Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. *PLoS Genet.* **7**, e1002316 (2011).
146. Lark, K. G., Chase, K. & Sutter, N. B. Genetic architecture of the dog: sexual size dimorphism and functional morphology. *Trends Genet.* **22**, 537–544 (2006).
147. Chase, K. *et al.* Genetic basis for systems of skeletal quantitative traits: principal component analysis of the canid skeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 9930–9935 (2002).
148. Hom, G. *et al.* Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N. Engl. J. Med.* **358**, 900–909 (2008).
149. Lango Allen, H. *et al.* Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature* **467**, 832–838 (2010).
150. *Statistical Genetics: Gene Mapping Through Linkage and Association.* (Taylor & Francis: 2008).
151. Gusella, J. F. *et al.* A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**, 234–238 (1983).

152. Kerem, B. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073–1080 (1989).
153. Wallace, C. *et al.* Linkage analysis using co-phenotypes in the BRIGHT study reveals novel potential susceptibility loci for hypertension. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 323–331 (2006).
154. MORTON, N. E. Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* **7**, 277–318 (1955).
155. Alkuraya, F. S. Homozygosity mapping: one more tool in the clinical geneticist's toolbox. *Genet. Med.* **12**, 236–239 (2010).
156. Hartley, C. *et al.* Congenital keratoconjunctivitis sicca and ichthyosiform dermatosis in Cavalier King Charles spaniel dogs-part II: candidate gene study. *Veterinary Ophthalmology* (2012).doi:10.1111/j.1463-5224.2012.00987.x
157. Shearman, J. R. *et al.* Mapping cerebellar abiotrophy in Australian Kelpies. *Anim. Genet.* **42**, 675–678 (2011).
158. Kropatsch, R. *et al.* Generalized progressive retinal atrophy in the Irish Glen of Imaal Terrier is associated with a deletion in the ADAM9 gene. *Mol. Cell. Probes* **24**, 357–363 (2010).
159. Drögemüller, C. *et al.* A deletion in the N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) gene in Greyhounds with polyneuropathy. *PLoS ONE* **5**, e11258 (2010).
160. Farias, F. H. G. *et al.* An ADAMTS17 splice donor site mutation in dogs with primary lens luxation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 4716–4721 (2010).
161. Drögemüller, C. *et al.* A missense mutation in the SERPINH1 gene in Dachshunds with osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet.* **5**, e1000579 (2009).
162. Moody, J. A., Famula, T. R., Sampson, R. C. & Murphy, K. E. Identification of microsatellite markers linked to progressive retinal atrophy in American Eskimo Dogs. *Am. J. Vet. Res.* **66**, 1900–1902 (2005).
163. van de Sluis, B. *et al.* Refined genetic and comparative physical mapping of the canine copper toxicosis locus. *Mamm. Genome* **11**, 455–460 (2000).
164. Saxena, R. *et al.* Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* **316**, 1331–1336 (2007).
165. Zeggini, E. *et al.* Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* **316**, 1336–1341 (2007).
166. Todd, J. A. *et al.* Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat. Genet.* **39**, 857–864 (2007).
167. Samani, N. J. *et al.* Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **357**, 443–453 (2007).
168. Ouwehand, W. H. Platelet genomics and the risk of atherothrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **5 Suppl 1**, 188–195 (2007).
169. Thomson, W. *et al.* Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat. Genet.* **39**, 1431–1433 (2007).
170. Plenge, R. M. *et al.* Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **39**, 1477–1482 (2007).



171. Frayling, T. M. *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* **316**, 889–894 (2007).
172. Daw, E. W., Heath, S. C. & Lu, Y. Single-nucleotide polymorphism versus microsatellite markers in a combined linkage and segregation analysis of a quantitative trait. *BMC Genet.* **6 Suppl 1**, S32 (2005).
173. The International HapMap Project. *Nature* **426**, 789–796 (2003).
174. Choi, M. *et al.* Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 19096–19101 (2009).
175. Butler, H. & Ragoussis, J. BeadArray-based genotyping. *Methods Mol. Biol.* **439**, 53–74 (2008).
176. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).
177. Ehrich, M., Böcker, S. & van den Boom, D. Multiplexed discovery of sequence polymorphisms using base-specific cleavage and MALDI-TOF MS. *Nucleic Acids Res.* **33**, e38 (2005).
178. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263–265 (2005).
179. Stephens, M., Smith, N. J. & Donnelly, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 978–989 (2001).
180. Han, B., Kang, H. M. & Eskin, E. Rapid and accurate multiple testing correction and power estimation for millions of correlated markers. *PLoS Genet.* **5**, e1000456 (2009).
181. Patterson, N., Price, A. L. & Reich, D. Population Structure and Eigenanalysis. *PLoS Genet* **2**, e190 (2006).
182. Awano, T. *et al.* Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 2794–2799 (2009).
183. Tsai, K. L. *et al.* Genome-wide association studies for multiple diseases of the German Shepherd Dog. *Mamm. Genome* **23**, 203–211 (2012).
184. UCSC Genome Browser Home. at <<http://genome.ucsc.edu/>>
185. Home - Gene - NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>>
186. Ensembl Genome Browser. at <<http://useast.ensembl.org/index.html>>
187. Sevilla, L. M., Nachat, R., Groot, K. R. & Watt, F. M. Kazrin regulates keratinocyte cytoskeletal networks, intercellular junctions and differentiation. *J. Cell. Sci.* **121**, 3561–3569 (2008).
188. RPL10A ribosomal protein L10a [Homo sapiens] - Gene - NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4736>>
189. OMIM Entry - \*602529 - TUBULIN, ALPHA-1A; TUBA1A. at <<http://omim.org/entry/602529>>
190. OMIM Entry - \*601196 - PR DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2; PRDM2. at <<http://omim.org/entry/601196?search=PRDM2&highlight=prdm2>>

191. OMIM Entry - \*608863 - PODOPLANIN; PDPN. at  
<<http://omim.org/entry/608863?search=PDPN&highlight=pdpn>>
192. OMIM Entry - \*612830 - SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE/REDUCTASE FAMILY, MEMBER 3; DHRS3. at  
<<http://omim.org/entry/612830?search=DHRS3&highlight=dhrs3>>
193. OMIM Entry - \*153454 - PROCOLLAGEN-LYSINE, 2-OXOGLUTARATE 5-DIOXYGENASE; PLOD1. at  
<<http://omim.org/entry/153454?search=PLOD1&highlight=plod1>>
194. OMIM Entry - \*608507 - MITOFUSIN 2; MFN2. at  
<<http://omim.org/entry/608507?search=mfn2&highlight=mfn2>>
195. Mori, T., Wada, T., Suzuki, T., Kubota, Y. & Inagaki, N. Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity. *J. Biol. Chem.* **282**, 19884–19893 (2007).
196. El Kholy, M. *et al.* Growth hormone/IGF-I axis and growth hormone receptor mutations in idiopathic short stature. *Horm Res Paediatr* **76**, 300–306 (2011).
197. Derr, M. A. *et al.* The growth hormone receptor (GHR) c.899dupC mutation functions as a dominant negative: insights into the pathophysiology of intracellular GHR defects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E1896–1904 (2011).
198. Groot, K. R., Sevilla, L. M., Nishi, K., DiColandrea, T. & Watt, F. M. Kazrin, a novel periplakin-interacting protein associated with desmosomes and the keratinocyte plasma membrane. *J. Cell Biol.* **166**, 653–659 (2004).
199. Wang, Q., Liu, M., Li, X., Chen, L. & Tang, H. Kazrin F is involved in apoptosis and interacts with BAX and ARC. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **41**, 763–772 (2009).
200. Cho, K. *et al.* Kazrin, and its binding partners ARVCF- and delta-catenin, are required for *Xenopus laevis* craniofacial development. *Dev. Dyn.* **240**, 2601–2612 (2011).
201. Del Puerto, F. *et al.* Protective Human Leucocyte Antigen Haplotype, HLA-DRB1\*01-B\*14, against Chronic Chagas Disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1587 (2012).
202. Wadley, A. L., Lombard, Z., Cherry, C. L., Price, P. & Kamerman, P. R. Analysis of a previously identified ‘pain protective’ haplotype and individual polymorphisms in the GCH1 gene in Africans with HIV-associated sensory neuropathy: a genetic association study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* (2012).doi:10.1097/QAI.0b013e31824bcc17
203. Pidasheva, S. *et al.* Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q. *PLoS ONE* **6**, e25038 (2011).

