

Analyse de la paralysie laryngée et de son caractère héréditaire chez les Bouviers des Flandres et Huskys Sibériens afin de démontrer l'intérêt de son étude dans le cadre d'un projet de génétique comparé

Auteur : Mitchell, Elora

Promoteur(s) : Farnir, Frederic

Faculté : Faculté de Médecine Vétérinaire

Diplôme : Master en médecine vétérinaire

Année académique : 2019-2020

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/9729>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**Analyse de la paralysie laryngée et de son caractère héréditaire
chez les Bouviers des Flandres et Huskys Sibériens afin de
démontrer l'intérêt de son étude dans le cadre d'un projet de
génétique comparé**

*Analysis of laryngeal paralysis and its hereditary nature in Bouviers des
Flandres and Siberian Huskies in order to demonstrate the interest of its study
within the framework of comparative genomics project*

Elora MITCHELL

Travail de fin d'études
présenté en vue de l'obtention du grade de Médecin Vétérinaire

ANNÉE ACADÉMIQUE 2019/2020

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur.

**Analyse de la paralysie laryngée et de son caractère héréditaire
chez les Bouviers des Flandres et Huskys Sibériens afin de
démontrer l'intérêt de son étude dans le cadre d'un projet de
génétique comparé**

*Analysis of laryngeal paralysis and its hereditary nature in Bouviers des
Flandres and Siberian Huskies in order to demonstrate the interest of its study
within the framework of comparative genomics project*

Elora MITCHELL

Tuteur : Frédéric Farnir

Biostatistique et bioinformatique appliquées aux sciences vétérinaires

Travail de fin d'études
présenté en vue de l'obtention du grade de Médecin Vétérinaire

ANNÉE ACADÉMIQUE 2019/2020

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

Le projet européen LUPA regroupait des vétérinaires et généticiens de 12 pays dans le but d'identifier des mutations génétiques à l'origine de pathologies héréditaires communes aux chiens et à l'homme. L'espèce canine, du fait de sa sélection intensive, de l'environnement commun à l'homme et de sa relative proximité phylogénique avec l'espèce humaine, est un bon modèle pour les maladies génétiques humaines, permettant de comparer plus facilement que chez l'humain les génomes des individus sains et atteints afin d'identifier la (les) mutation(s) mise(s) en cause.

L'objectif de cette étude est d'utiliser une approche similaire : identifier une pathologie commune aux deux espèces et de vérifier son caractère héréditaire tant chez le chien que chez l'homme. Il s'agit de la première étape indispensable avant la sélection des individus participants à l'étude et l'analyse coûteuse de leurs génomes (même si celle-ci devient de plus en plus accessible).

Analyse de la paralysie laryngée et de son caractère héréditaire chez les Bouviers des Flandres et Huskys Sibériens

The Européen LUPA Project gathered veterinarians and geneticists from 12 countries to identify genetic mutations involved in inherited pathologies common to dogs and humans. The canine species, due to its intensive selection and its relative phylogenetic proximity with the human species is a good genetic model for human affections, making it easier to compare genomes between healthy and affected dogs in order to identify the involved mutation(s).

The objective of this study is to identify a pathology common to both species and to check its heritability both in dogs and in humans. This is the first essential step before the selection of individuals to be included in the study and the costly analysis of their genomes.

Analysis of laryngeal paralysis and its hereditary character in Bouviers des Flandres and Siberian Huskies

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon tuteur de stage, M. Frédéric Farnir, qui m'a permis de découvrir un domaine scientifique que je n'aurais pas eu la chance de découvrir autant à travers ma formation, ainsi que pour sa disponibilité, son suivi, et ses nombreux conseils qui m'ont énormément apporté pour la réalisation de ce travail. Sincères remerciements.

Je remercie ensuite ma famille et mon compagnon qui ont pris le temps de relire mon travail et m'ont apportés leurs conseils, ainsi que pour leur soutien tout au long de mes études et dans l'élaboration de ce projet en particulier.

Pour finir, je souhaite remercier mes colocataires et amies, ainsi que tous mes amis étudiants vétérinaires qui m'ont apporté leur soutien durant la réalisation de ce travail et durant l'ensemble de mes études.

Sommaire

Introduction.....	7
1. Bases génétiques de la sélection raciale et intérêt en médecine humaine.....	7
1.1. Sélection raciale et maladie héréditaire chez le chien.....	7
1.2. Intérêt de l'étude des maladies héréditaires du chien pour la médecine humaine	8
2. Projet LUPA	10
2.1. Historique, objectifs et résultats du projet LUPA.....	10
2.2. Critères de sélection des gènes et pathologies candidates.....	11
3. La paralysie laryngée.....	12
3.1. Une pathologie intéressante à étudier dans le cadre du projet LUPA.....	12
3.2. Aperçu général sur la paralysie laryngée.....	13
4. Caractère héréditaire de la paralysie laryngée chez l'homme et chez le chien	22
4.1. Analyse du caractère héréditaire de la paralysie laryngée chez le chien d'après la littérature.....	22
4.2. Analyse du caractère héréditaire de la paralysie laryngée chez l'Homme d'après la littérature.....	25
4.3. Etude du caractère héréditaire de la paralysie laryngée chez le chien.....	26
5. Protocole et intérêt de l'identification du gène et de la mutation à l'origine d'une pathologie.....	28
5.1. Protocole.....	28
5.2. Intérêts pratiques de l'identification des gènes mutés.....	31
Conclusion.....	32
Bibliographie.....	33

Introduction

Le chien et l'Homme sont souvent confrontés aux mêmes pathologies. Certaines pathologies sont la conséquence d'une mutation génétique héréditaire. Il y a un grand intérêt à identifier les gènes impliqués et déterminer les mutations qui induisent ces maladies pour comprendre leur physiopathologie et ainsi espérer développer un traitement ou des tests génétiques de dépistages. Les objectifs étant de permettre un traitement précoce aux patients humains et canins, de sortir de la reproduction les chiens porteurs de la mutation et ainsi diminuer la prévalence de la maladie au sein des races fortement touchées.

1. Bases génétiques de la sélection raciale et intérêt en médecine humaine

1.1. Sélection raciale et maladie héréditaire chez le chien

Le chien est la cinquième espèce dont le génome a été séquencé après l'Homme, la souris, le rat et le chimpanzé. Son génome contient environ 20 000 gènes, chaque gène pouvant s'exprimer sous différentes formes, les allèles. (1,12) Ces variations alléliques sont à l'origine de la diversité génétique entre individus. La fréquence des allèles dans une population suit l'équilibre de Hardy Weinberg et est donc prédictible uniquement si les conditions suivantes sont respectées : grande population, accouplement aléatoire et les effets de la sélection, mutation et migration peuvent être ignorés. Or ces forces évolutives ne peuvent pas être ignorées dans l'espèce canine et sont au contraire très présentes. Dès le début de sa domestication, le chien a été sélectionné afin de répondre à des besoins de l'Homme : la chasse, la garde, la gestion des troupeaux ovins. Puis les pratiques d'élevage se sont améliorées afin de créer des races sur base de critères morphologiques, comportementaux ou physiologiques. Ces pratiques d'élevage comprennent l'utilisation d'individus « fondateurs », une sélection stricte de leur descendants et l'utilisation d'accouplements consanguins. Ces accouplements non aléatoires mêlant accouplements assortis positifs (*) et consanguinité ont ainsi permis de créer des groupes d'individus ayant tous les mêmes allèles pour certains gènes. (1, 12)

* Accouplements assortis positifs (Homogamie) : Accouplement entre des individus ayant des phénotypes similaires au locus qui régissent le trait.

L'objectif de cette sélection était de ne reproduire que les individus ayant des allèles codant pour des critères morphologiques recherchés pour la race. Malheureusement, ce mode de sélection a pour effet de sélectionner également indirectement des allèles mutants à l'origine de pathologies. Cette sélection indirecte provient généralement de la proximité génomique d'un allèle mutant avec l'allèle morphologique que l'on cherche à stabiliser dans la race. En outre, les pathologies transmises sont souvent non visibles à la naissance, les individus sont donc sélectionnés pour la reproduction avant que les pathologies ne soient visibles dans la majorité des cas. (1)

La majorité des maladies héréditaires sont autosomales récessives ou complexes. Dans le cas de maladies récessives, les individus hétérozygotes sont des porteurs sains, et les maladies ne sont détectées que chez les animaux homozygotes récessifs. Les allèles délétères ont donc la possibilité de se propager dans la population avant d'être détectés. Lors de sélection non aléatoire, détaillée plus haut, la diversité génétique est diminuée pour réduire la variabilité phénotypique, et le risque de croiser deux parents porteurs sains et obtenir des descendants homozygotes malades est donc plus élevé. En effet, l'accouplement consanguin et l'accouplement assorti sont connus pour réduire la fréquence des hétérozygotes et à l'inverse augmenter la fréquence des homozygotes. (1)

On observe ainsi que pratiquement toutes les races de chien, obtenues via cette sélection sur critère morphologique, ont une ou plusieurs pathologies dont l'incidence dans la race est beaucoup plus importante que dans le reste de la population canine. (1) Ainsi sur les 342 races de chiens reconnues officiellement par la fédération cynologique internationale (21), plus de 600 maladies héréditaires ont déjà été dénombrées (10).

1.2. Intérêt de l'étude des maladies héréditaires du chien pour la médecine humaine

L'humain, comme tout autre être vivant, peut subir des mutations de son ADN et celles-ci peuvent induire des pathologies héréditaires.

Lorsque l'on veut étudier les maladies génétiques héréditaires, et identifier la(les) mutation(s) responsable(s), on veut idéalement utiliser plusieurs individus très proches génétiquement, avec

parmi eux plusieurs individus atteints de la pathologie et d'autres sains. L'intérêt que leur génome soit proche est d'avoir peu de différences de séquence, et ainsi de pouvoir relever plus facilement des différences qui ne sont observées que chez les individus malades et qui sont absentes chez les individus sains.

L'inconvénient de la recherche dans le domaine des maladies génétiques humaines est que les sujets atteints ont un génome très différent les uns des autres puisque la population humaine n'a pas subi de croisements dirigés qu'a subi la population canine.

A l'opposé, la sélection raciale canine a permis d'obtenir des nombreux animaux aux génomes très proches ce qui facilite grandement l'étude des différences entre leurs séquences génétiques. Et la sélection indirecte de mutations sources de pathologie lors de la sélection raciale a permis d'obtenir potentiellement un grand nombre d'individus atteints de ces maladies, pourtant rares chez l'homme. On peut donc en principe comparer l'ADN d'un grand groupe de chiens. (1)

Parmi les autres espèces animales ayant subi une sélection afin de créer des races, le chien présente plusieurs avantages. Premièrement, la diversité génétique via la sélection raciale est une des plus importante du règne animal (15,16). Deuxièmement, il s'agit d'une espèce qui bénéficie d'une excellente surveillance médicale de nos jours, ce qui présente plusieurs avantages : un très grand nombre de chiens atteints de pathologies mêmes rares sont dépistés et suivis médicalement. Ensuite, l'espèce canine vie dans un environnement partagé avec l'homme, l'influence environnementale sur le génome peut donc être considéré comme quasi similaire entre ces deux espèces : ils sont soumis aux mêmes agents mutagènes (pesticides, pollution urbaine, fumée de cigarette), mangent généralement des produits industriels, ont une activité physique relativement proche de l'homme, etc. Et pour finir, ces deux espèces ont une importante proximité phylogénique (2), ce qui donne la perspective d'inférer des gènes impliqués dans des pathologies humaines sur base des gènes impliqués dans des pathologies canines similaires (l'inverse étant également vrai).

2. *Projet LUPA*

2.1. **Historique, objectifs et résultats du projet LUPA**

Le projet européen LUPA regroupait des vétérinaires et généticiens de 12 pays dont l'objectif était de collecter et analyser l'ADN de chiens afin d'identifier les mutations causant des pathologies que l'on retrouve à la fois dans certaines races de chiens et chez l'homme. (1, 11)

L'intérêt de ce projet est multiple :

- Identifier les pathologies plus présentes dans certaines races que dans le reste de la population,
- Identifier les gènes et les mutations induisant la pathologie,
- Une fois le gène identifié on peut développer des tests pour une identification rapide des animaux porteurs et ainsi écarter de la reproduction ces chiens pour diminuer l'incidence de la maladie dans la population,
- Identifier le gène orthologue chez l'homme et pouvoir l'étudier, ainsi que les mécanismes moléculaires associés à la mutation, pour tenter de trouver un traitement.

Démarré en 2008, le projet LUPA a étudié de nombreuses maladies, telles que les tumeurs mammaires, les mélanomes, la maladie valvulaire mitrale myxomateuse, la cardiomyopathie dilatée, le diabète, la dermatite atopique, les épilepsies, etc. Ce projet a permis d'identifier les mutations génétiques à l'origine d'une maladie pour plusieurs maladies monogéniques humaines, tel que :

- La dyskinésie ciliaire primitive : l'analyse de 15 Bergers Anglais en bonne santé et 5 atteints a permis l'identification d'un segment de 15 Mb sur le chromosome 34 pour lequel tous les chiens affectés étaient homozygotes : mutation dans le gène CCDC39. (11)
- Ichtyose : L'analyse de 20 Golden retrievers atteints et 20 contrôles a permis d'identifier les gènes atteints (KRT10, TGM1, PNPLA1, FAM83H), de créer un test diagnostique canin et d'identifier le gène orthologue humain. Ce gène n'avait pas encore été associé à aucune condition dermatologique chez l'Homme, et cette étude a démontré son rôle important dans la fonction de barrière cutanée. (1,4, 11)

2.2. Critères de sélection des gènes et pathologies candidats

Identifier une maladie cible est l'étape initiale indispensable dans un travail de recherche telle que ceux organisés dans le cadre du projet LUPA. Les critères qui semblent pertinents pour la sélection d'une pathologie à étudier sont :

- Une pathologie humaine suffisamment proche de la pathologie chez le chien pour émettre l'hypothèse d'un gène causal orthologue dans les deux espèces ;
- Une pathologie relativement facile à détecter et diagnostiquer pour avoir suffisamment de cas répertoriés chez les chiens.
- Pathologie dont le caractère héréditaire et associé à une ou plusieurs races est objectivable ;
- Une pathologie dont le gène causal n'a pas encore été identifié ni chez le chien ni chez l'homme.

L'université de Sydney a créé le catalogue OMIA : Online Mendelian Inheritance in Animals. Il répertorie les pathologies héréditaires chez différentes espèces animales autre que l'homme (pour lequel il existe un catalogue propre : OMIM) et la souris :



Summary

	dog	cattle	cat	pig	sheep	horse	chicken	rabbit	goat	Other	TOTAL
TOTAL TRAITS/DISORDERS	747	532	349	271	248	237	221	96	85	654	3529
Mendelian trait/disorder	332	249	101	78	106	58	129	57	17	243	1435
Mendelian trait/disorder; likely causal variant(s) known	266	152	69	36	51	46	47	11	11	131	835
Likely causal variants	392	202	111	45	66	93	62	13	15	107	1124
Potential models for human disease	439	210	215	119	109	132	50	52	37	358	1753

On voit que pour le chien, sur un total de 747 pathologies et caractères d'intérêt (groupes sanguins, couleurs et texture du pelage) répertoriés, 439 peuvent servir de modèle pour des maladies humaines et seulement 266 sont des pathologies dont le gène et la mutation sont décrits. Il reste donc 173 pathologies pouvant servir de modèle pour les maladies humaines mais dont le gène et la mutation ne sont pas encore connus. (10, 22)

3. La paralysie laryngée

3.1. Une pathologie intéressante à étudier dans le cadre du projet LUPA

La base de données de l'OMIA permet de sélectionner sur les 173 pathologies dont le gène et la mutation ne sont pas encore connus, un ensemble de pathologies répondant aux critères de sélection précédemment cités. (22)

OMIA ID	Phene	Species Scientific Name	Species Common Name	Gene	Year Key Mutation First Reported	Date Last Modified
OMIA 000259-9615	Deafness	Canis lupus familiaris	dog			2013-12-30
OMIA 000795-9615	Persistent truncus arteriosus	Canis lupus familiaris	dog			2013-08-05
OMIA 000030-9615	Alopecia, generic	Canis lupus familiaris	dog			2013-08-05
OMIA 001206-9615	Laryngeal paralysis	Canis lupus familiaris	dog			2016-10-17
OMIA 000765-9615	Pancreatic insufficiency, exocrine	Canis lupus familiaris	dog			2013-05-20
OMIA 000330-9615	Elbow dysplasia	Canis lupus familiaris	dog			2013-05-20
OMIA 001790-9615	Chondrodysplasia, Labrador	Canis lupus familiaris	dog			2013-04-23
OMIA 000432-9615	Haemolytic anaemia, autoimmune	Canis lupus familiaris	dog			2011-10-29

Après une étude de ces différentes pathologies, la paralysie laryngée est la pathologie qui a semblé la plus intéressante à étudier. En effet la littérature scientifique, tant sur la pathologie humaine que canine, est suffisamment importante pour pouvoir l'analyser en profondeur et semble indiquer de nombreux points communs entre les pathologies dans les deux espèces ce qui peut suggérer une origine génétique commune.

Chez l'humain comme chez le chien, des paralysies laryngées sont décrites chez les très jeunes patients, sans aucune cause externe identifiée. Ainsi chez le nouveau-né humain, une paralysie des cordes vocales associée à un déficit respiratoire, causé par une paralysie laryngée congénitale, est décrite. Chez le chien, les cas de paralysie laryngée sont plus fréquents chez l'animal adulte ; cependant une origine génétique est clairement mise en cause du fait de la fréquence beaucoup plus importante de cette pathologie dans certaines races, et tout particulièrement le Bouvier des Flandres et le Husky Sibérien.

3.2. Aperçu général sur la paralysie laryngée

La paralysie laryngée consiste en un déficit dans l'innervation du muscle crico-arythénoïdien dorsal responsable de l'abduction des cartilages arythénoïdes et donc un déficit dans l'ouverture de la glotte lors du passage de l'air. Ce muscle étant innervé par le nerf laryngé récurrent.

Il existe deux formes de paralysie laryngée : la paralysie laryngée congénitale et la paralysie laryngée acquise (tumeur, trauma, endocrinopathie tel que l'hypothyroïdie, l'hypoadénocorticisme, idiopathique). Nous ne traiterons que de la 1^{ère} forme dans le sens où elle est purement d'origine génétique sans cause externe.

La paralysie peut être unilatérale ou bilatérale, avec bien entendu des conséquences cliniques bien plus graves dans les cas bilatéraux.

Les résultats électrodiagnostic d'une étude menée sur des chiens atteints de cette pathologie suggèrent une forme de dépérissement de la neuropathie axonale, bien que cela n'ait pas été confirmé histopathologiquement. En effet on a remarqué une diminution de l'amplitude des potentiels d'action des muscles cricoarythénoïdiens et la diminution de la vitesse de conduction nerveuse lors de ces tests électrodiagnostiques. L'examen histologique de la branche musculaire du larynx récurrent dans une étude a révélé une perte de grosses fibres nerveuses, une dégénérescence axonale et une fibrose du nerf sans signe de régénération nerveuse. L'évaluation des biopsies de muscles cricoarythénoïdiens a révélé un schéma d'atrophie neurogène. (7, 9, 18)

Rappels anatomiques, physiologiques et pathologiques :

Le larynx est composé de cinq cartilages principaux : le cartilage thyroïde, cricoïde, l'épiglotte et les deux cartilages arythénoïdes. Les arythénoïdes sont la partie mobile qui permet la fonction principale du larynx : ouvrir ou fermer l'entrée vers les voies respiratoires inférieures selon que l'on inspire ou que l'on déglutit respectivement. Ces deux petits cartilages ont une forme complexe et sont composés de différents processus : les processus corniculés forment la marge dorsale du larynx, les processus vocaux auxquels les cordes vocales sont fixées, les processus cunéiformes forment la marge latéro-dorsale et les processus musculaires auxquels sont rattachés les muscles crico-arythénoïdiens. Lors de paralysie laryngée se sont ces muscles qui

sont non fonctionnels, or leur rôle est l'abduction des cartilages arythénoïdes et donc l'ouverture de la glotte lors de l'inspiration afin de permettre le passage de l'air.

Le nerf laryngé caudal est responsable de l'innervation du muscle cricoaryténoïdien dorsal. Ce nerf est issu du nerf récurrent qui suit un trajet différent à droite et à gauche : du côté gauche il part du tronc cérébral et redescend jusqu'au cœur où il contourne l'aorte avant de remonter jusqu'au larynx, tandis que du côté droit il contourne l'artère sous-clavière.

Le nerf laryngé récurrent innerve non seulement les muscles laryngés mais également la partie thoracique cervicale et crânienne de l'œsophage via le nerf laryngé pararécurrent. Les nerfs pararécurrents peuvent provenir soit directement du nerf vague au niveau des branches nerveuses laryngées récurrentes ou comme première branche des nerfs laryngés récurrents. Par conséquent, les chiens atteints de paralysie laryngée peuvent être sujets à un développement de dysmotilité œsophagienne ou de mégasophage, semblable à ce que l'on a chez les chiens atteints de polyneuropathie associé à une paralysie laryngée d'apparition gériatrique. Il ne faut donc pas exclure du diagnostic différentiel de paralysie laryngée congénitale les chiens présentant des dysfonctions œsophagiennes (régurgitation,) en supposant qu'il s'agit d'une polyneuropathie. De plus des régurgitations peuvent apparaître suite à une hernie hiatale provoquée par la pression négative chronique dans le tractus respiratoire provoquée par la paralysie laryngée. (7, 9, 18)

La paralysie laryngée congénitale chez le chien

La paralysie laryngée congénitale est une pathologie héréditaire qui est retrouvée en plus grande fréquence dans deux races : le Bouvier des Flandres et le Husky de Sibérie, ainsi que les croisés Husky qui ont le phénotype yeux bleus et tête blanche tachetée. Les symptômes apparaissent chez l'animal âgé de moins de 12 mois.

On retrouve cette paralysie laryngée également dans d'autres races mais l'incidence de la paralysie laryngée est alors beaucoup plus faible, et généralement associée à un contexte de polyneuropathie complexe (donc associé à d'autres symptômes neurologiques) ou dans la pathologie appelée polyneuropathie paralysie laryngée d'apparition gériatrique (associé à un processus dégénératif du nerf).

Le signalement (Husky Sibérien ou Bouviers des Flandres de moins de 12 mois), associés aux signes cliniques (paralysie laryngée de stade 3 ou 4) permet de poser un diagnostic de paralysie laryngée avec une sensibilité de 98,5% et une spécificité de 91,6% avant même tout examen complémentaire de confirmation.

La perte de fonction du nerf laryngé caudal et donc le manque ou l'absence d'abduction des aryténoïdes lors de l'inspiration induit une plus grande résistance à l'écoulement de l'air. Les conséquences sont multiples : le déficit d'apport en oxygène vers les poumons passe généralement inaperçu au repos mais se manifestera par une intolérance à l'effort plus ou moins importante en fonction de la gravité de la paralysie et de son caractère unilatéral ou bilatéral. Les turbulences induites par cette résistance vont quant à elles induire un bruit typique de stridor. Le manque de tension des cordes vocales lors de l'aboiement vont se manifester par un aboiement faible et rauque.

Les signes cliniques seront aggravés par toute pathologie respiratoire primaire ou toute pathologie induisant de l'œdème pulmonaire, ainsi que par toute situation induisant une tachypnée : effort physique, stress, excitation, ou une dyspnée : surpoids.

L'absence de traitement peut conduire à des pathologies secondaires. En effet les aryténoïdes risquent de subir des frictions l'un contre l'autre suite à leur mauvaise abduction et l'adduction passive excessive induite par la pression négative causée par l'obstruction des voies aériennes à chaque inspiration. Les muqueuses recouvrant les cartilages peuvent ainsi subir un processus inflammatoire, comprenant de l'œdème avec épaissement des muqueuses qui va diminuer encore d'avantage le diamètre de passage de l'air et aggraver les signes cliniques.

La pression négative excessive induite par la mauvaise abduction des aryténoïdes à l'inspiration peut engendrer des pathologies secondaires tel que des méga-œsophages, hernies hiatales, de l'œdème pulmonaire.

La perte de fonction des aryténoïdes va induire une mauvaise fermeture de la glotte lors de la déglutition, ce qui peut conduire au passage d'aliments vers la trachée et provoquer une pneumonie par aspiration. Ceci représente le risque le plus important lors de paralysie laryngée.

Comme cité précédemment, le signalement associé aux signes cliniques permettent un diagnostic avec une sensibilité et spécificité très élevés.

Il est cependant indispensable d'éliminer les autres causes de dyspnée inspiratoire associée à un stridor incluses dans le diagnostic différentiel tel qu'une tumeur laryngée, corps étranger ou abcès laryngé.

L'examen laryngoscopique permet par un examen relativement peu invasif d'éliminer les différentes causes non neuromusculaires de paralysie laryngée. Cet examen nécessite néanmoins un protocole de sédation précis afin d'obtenir un animal suffisamment sédaté pour permettre une bonne visualisation du larynx par relaxation suffisante de la mâchoire, sans atteindre une anesthésie trop profonde agissant sur la fonction des arythénoïdes. Un protocole recommandé est ainsi l'utilisation de thiopental intraveineux car il n'altère pas la fonction laryngée tout en induisant une tachypnée du fait de son effet dépresseur respiratoire qui est intéressant pour cet examen. Le protocole Diazepam-Ketamine n'est pas optimal car il a un effet myorelaxant et le protocole Acepromazine-Propofol, Acepromazine-Thiopental ou Diazepam-Ketamine induisent 50% de faux positif (mauvaise abduction des arythénoïdes induit par l'anesthésie).

Deux types de laryngoscopies sont envisageables : la laryngoscopie perorale ou transnasale. La voie perorale est l'examen gold standard car elle nécessite une simple sédation.

La visualisation du larynx en mouvement permet ainsi d'observer la bonne abduction des arythénoïdes à l'inspiration et l'adduction passive à l'expiration. Il faut faire attention à ce que l'abduction ai bien lieu durant l'inspiration car 45% des cas de paralysie laryngée vont présenter une adduction passive à l'inspiration causée par la pression négative excessive, suivie d'une légère abduction passive secondaire à l'expiration. A ne pas confondre avec l'abduction active physiologique à l'inspiration.

Les patients en état de dyspnée sévère induite par la paralysie laryngée doivent en premier lieu être stabilisés par un traitement médical d'urgence avant d'envisager toute chirurgie. Ce traitement médical se base sur l'oxygénothérapie, la sédation et le refroidissement de l'animal si besoin.

L'espérance de vie des animaux atteints était auparavant faible, principalement suite aux complications de pneumonies par erreur de lieu. Aujourd'hui le pronostic est bien meilleur grâce à l'utilisation de la technique chirurgicale de latéralisation unilatérale. Le traitement chirurgical est donc généralement recommandé. Un traitement conservatif peut être considéré dans certains cas : si le patient est âgé (risque anesthésique), quand les signes cliniques sont faibles ou lorsque les propriétaires refusent la chirurgie. Dans ce cas un traitement à base d'anti-inflammatoires pour limiter l'inflammation des arythénoïdes sera prescrit, accompagné de

recommandations pour limiter les complications : gestion du poids, limiter les efforts physiques, les fortes températures, etc.

Le traitement chirurgical comporte différentes techniques envisageables, le but étant d'augmenter le diamètre de la glotte pour faciliter le passage de l'air à l'inspiration et éviter l'aspiration paradoxale du ou des arythénoïdes vers la glotte lors de l'inspiration. Ainsi d'après la loi de Poiseuille, comme la résistance est inversement proportionnelle au rayon à la puissance quatre, une faible augmentation du diamètre aura un effet important sur la diminution de la résistance au passage de l'air.

Mais une ouverture totale de la glotte n'est pas une solution idéale car il faut préserver la fonction de carrefour entre le système digestif et respiratoire du larynx, et limiter le passage des aliments vers les voies respiratoires lors de la déglutition pour éviter les pneumonies par erreur de lieu.

De plus la chirurgie doit être la moins traumatique possible pour limiter la réaction inflammatoire post-chirurgicale avec un gonflement excessif des structures du larynx qui augmenterait le risque de dyspnée très sévère au réveil.

Si l'on prend en compte ces différents paramètres, la procédure la plus utilisée actuellement est la latéralisation du cartilage arythénoïde, malgré un taux de complication de 10 à 58% dont majoritairement de pneumonie par aspiration (10 à 28%).

D'après des études récentes, les techniques de laryngectomie partielle (exérèse des cordes vocales et d'une partie des processus corniculés et vocaux, via un laser diode, par approche transorale) et la ventriculocordectomie par laryngotomie ventrale sont plus avantageuses et commencent à être de plus en plus pratiquées.

De nombreuses techniques ont été développées au cours du temps, certaines abandonnées car trop de complications rapportées, d'autres ont été testées expérimentalement mais ne donnent pas encore de résultats satisfaisants (réinnervation et greffes neuromusculaires). (9)

TABLE 1: Surgical treatment methods with their reported percentages of improvement, aspiration pneumonia, minor complications (persistent stridor, coughing, gagging, panting, seroma formation, exercise intolerance or vomiting), webbing and mortality rate.

Treatment method	Improvement (%)	Aspiration pneumonia (%)	Minor complications (%)	Webbing (%)	Mortality (%)
Unilateral arytenoid lateralisation ^{1,2,3,4,5}	90	10–28	9–56	-	0–14
Bilateral arytenoid lateralisation ^{6,4}	-	11–89	-	-	67
Bilateral arytenoid lateralisation with ventriculocordectomy ⁷	88	15	30	-	0
Castellated laryngofissure with ventriculocordectomy ⁶	100	-	40	40	-
Partial laryngectomy, transoral approach with or without ventriculocordectomy ^{4,8,9}	88–90	6–33	44	8–14	30
Partial laryngectomy, transoral approach – diode laser ¹⁰	100	10	-	0	-
Ventriculocordectomy, transoral approach ^{11,12}	83	15	40–73	13	-
Ventriculocordectomy, ventral approach ¹³	93	3	6	0	-

¹, Demetriou and Kirby (2003); ², Griffiths *et al.* (2001); ³, Hammel *et al.* (2006); ⁴, MacPhail and Monnet (2001); ⁵, White (1989); ⁶, Burbridge *et al.* (1998); ⁷, Schofield *et al.* (2007); ⁸, Ross *et al.* (1991); ⁹, Trout *et al.* (1994); ¹⁰, Olivieri *et al.* (2009); ¹¹, Asulp *et al.* (1997); ¹², Holt and Harvey (1994); ¹³, Zikes and McCarthy (2012). For more information on these sources, please see the full reference list of the article, Kitshoff, A.M., Van Goethem, B., Stegen, L., Vandekerckhove, P. & De Rooster, H., 2013, 'Laryngeal paralysis in dogs: An update on recent knowledge', *Journal of the South African Veterinary Association* 84(1), Art. #909, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.4102/jsava.v84i1.909>

La paralysie laryngée chez l'homme

La paralysie laryngée congénitale fait partie des maladies humaines rares dites orphelines sous l'appellation « Paralysie congénitale des cordes vocales » (numéro ORPHA 137932) ou Syndrome de Gerhardt.

Il s'agit d'une paralysie unilatérale ou bilatérales des cordes vocales suite à un défaut des nerfs moteurs du larynx. Les symptômes apparaissent dès la naissance et consiste en une modification de la voix, la présence d'un stridor, de cris de faible intensité, d'une dysphonie, voir une aphonie. Certains cas plus graves présentent des difficultés pour s'alimenter, respirer, voir une insuffisance respiratoire. Les nouveau-nés atteints ont souvent besoin d'une intubation immédiate et d'une éventuelle trachéotomie.

On remarque donc que les symptômes sont similaires chez l'humain et le chien.

L'anatomie du larynx est très proche entre l'homme et le chien. Le nerf laryngé inférieur ou nerf récurrent est le nerf principal responsable de l'innervation de tous les muscles intrinsèques du larynx, à l'exception du muscle cricothyroïdien. Les nerfs récurrents droit et gauche ne suivent également pas exactement le même trajet dans les deux espèces.

Le nerf récurrent gauche vient du nerf vague, contourne l'arc aortique et remonte en longeant la trachée et l'œsophage avant d'entrer dans le larynx juste en arrière de l'articulation cricothyroïdienne.

Le nerf récurrent droit se ramifie du vague à la base du cou, contourne l'artère sous-clavière, remonte latéralement vers la trachée et pénètrent dans le larynx entre les cartilages cricoïde et thyroïdien.

Comme on le voit, le nerf laryngé gauche suit un trajet plus long chez l'homme ainsi que chez le chien car il doit aller jusqu'au cœur pour contourner l'aorte, alors que le droit contourne l'artère sous-clavière qui se trouve plus proche sur son trajet. Ceci rend le nerf gauche plus vulnérable aux différentes pathologies tant neurodégénératives que traumatiques : compressions, tractions ; ainsi qu'aux frictions induites par l'aorte, beaucoup plus sous pression que l'artère sous-clavière.

La majorité des cas de paralysie vocale bilatérale peuvent être attribués à des anomalies structurelles du système nerveux central, telles que la malformation d'Arnold-Chiari (un développement anormal du tube neural à la suite d'un processus tératogène au cours des quatre premières semaines de gestation), le méningomyélocèle et le méningocèle. Le diagnostic différentiel de la paralysie laryngée est donc assez vaste, il comprend également toutes les pathologies d'origine néoplasique, traumatique, iatrogène (chirurgie), neurotoxique et dans le cas qui nous intéresse : les maladies neuromusculaires héréditaires. Mais la paralysie bilatérale des cordes vocales en tant que trouble héréditaire est rare. Hollinger n'a décrit qu'un seul cas familial dans une étude qui comprenait 149 nourrissons et enfants (6). Les profils de transmission liés au sexe, autosomiques dominants et autosomiques récessifs ont tous été décrits dans la littérature.

Dans la paralysie unilatérale, la voix peut être rauque et soufflante, mais il n'y a habituellement pas d'obstruction des voies aériennes, car l'abduction controlatérale est suffisante.

Dans la paralysie bilatérale, les deux cordes sont situées en général entre 2 et 3 mm de la ligne médiane. Le diamètre des voies aériennes est insuffisant, ce qui entraîne un stridor et une dyspnée lors des efforts modérés. La voix est d'intensité faible et la modulation du ton limitée.

Le traitement lors de dyspnée sévère est le même chez l'Homme et chez le chien : l'intubation ou la trachéotomie d'urgence.

La trachéotomie pratiquée en urgence est une intervention indispensable lors de détresse respiratoire sévère. En effet, avant sa généralisation à tous les cas de paralysie laryngée avec signes cliniques respiratoires sévères, le taux de mortalité était élevé. Aucune étude n'a été réalisée sur le sujet mais différents cas rapportés montrent l'importance de cette intervention. Dans l'étude effectuée par Plott, sur quatre frères atteints, seul un des trois frères a subi une trachéotomie (retirée à un an et demi), alors qu'un stridor significatif était présent à la naissance.

chez tous ces patients. Le seul à avoir survécu étant l'enfant ayant subi la trachéotomie, les autres sont tous décédés 15 heures après la naissance. (17)

Une conséquence importante rapportée dans les cas non traités est un retard mental. Ce retard a été mis en évidence à l'âge adulte chez un grand nombre de patients n'ayant pas reçu les soins nécessaires à une bonne oxygénation en urgence (intubation et/ou trachéotomie) ainsi qu'un maintien sous trachéotomie tant que l'adduction des arythénoïdes ne se rétablissait pas d'elle-même ou via un traitement chirurgical. Selon l'étude menée par Richard R et Gacek M.D. ce retard mental peut être imputé à l'anoxie induite par l'obstruction des voies respiratoires durant une longue période, induisant une hypoxémie cérébrale (3). Or depuis que la trachéotomie d'urgence est pratiquée de manière systématique, les cas de retard mentaux ne sont plus du tout rapportés, comme le démontre les cas rapportés dans cette même étude.

La trachéotomie est une procédure invasive mais la paralysie héréditaire des abducteurs congénitaux nécessitant une intubation pour le soutien des voies respiratoires se résolvant rarement spontanément avant l'âge d'un an, l'intubation à long terme seule est peu pratique.

Dans l'étude de Plott, les trois enfants survivants avaient tous des voies respiratoires adéquates à l'âge de 18 mois. Grundfast et Milmoie ont décrit un père, un fils et une fille avec un stridor néonatal et des difficultés à avaler, dont les signes cliniques se sont rétablis à 14 mois, tout en sachant que les deux ont subi une trachéotomie (5). Cunningham et al. ont eu une expérience similaire avec trois frères et sœurs nés avec divers degrés de dysfonctionnement des abducteurs. Tous ont finalement retrouvé une activité neuromusculaire normale. Cependant, on rapporte également des cas ne présentant pas de rétablissement spontané, et ce tout au long de la vie, dans trois études de cohortes.

Une fois l'urgence de l'obstruction respiratoire stabilisée, la paralysie laryngée congénitale héréditaire présente un bon pronostic puisque de nombreux cas d'individus atteints ont présenté un rétablissement spontané de la fonction neuro-musculaire avant l'âge adulte. Pour cela l'intubation endotrachéale à la naissance doit être suivie d'une trachéotomie précoce une fois que le diagnostic est terminé et que les causes rapidement réversibles de paralysie bilatérale des cordes vocales ont été exclues (masses, maladie d'Arnold-Chiari). Une IRM de la tête et de la poitrine doit être effectuée si l'endoscopie ne révèle pas la cause de la paralysie. Puis, une étude généalogique devrait être réalisée pour rechercher des membres de la famille présentant des symptômes subcliniques et des anomalies neuromusculaires associées. Ceci pouvant aider à

déterminer le pronostic de récupération fonctionnelle, à prédire la probabilité d'autres handicaps et à déterminer le risque de récurrence dans les grossesses futures.

Dans les cas humains ne montrant pas de récupération spontanée, un traitement chirurgical est nécessaire et l'objectif est sensiblement le même que lors de chirurgie chez le chien : rétablir une filière glottique de diamètre suffisant pour un passage de l'air inhalé adéquat.

Le traitement peut se faire par chirurgie endoscopique, soit par fixation d'une corde vocale en abduction par voie translaryngée ou extralaryngée (cordopexies), soit par cordectomie ou aryténoïdectomie au laser. Certains cas nécessitent une chirurgie par voie externe : L'aryténoïdopexie ou l'aryténoïdectomie.

La récupération spontanée décrite chez l'Homme n'a pas été observée chez le chien, probablement lié à son espérance de vie plus courte et des soins très importants nécessaires lors de trachéotomie permanente. Les chiens ne subissant pas de chirurgie vont généralement mourir précocement de complications tel que la pneumonie par erreur de lieu tel qu'expliqué précédemment. (6, 18)

La plasticité du système nerveux central pourrait expliquer la récupération progressive de la fonction abductrice qui a été observée dans certains cas au fur et à mesure du tri des circuits abducteur-adducteur croisés.

On peut donc conclure de cette comparaison entre l'aspect anatomo-pathologique de la paralysie laryngée chez l'humain et chez le chien, que la pathologie est relativement similaire dans les deux espèces. Mais, comme expliqué précédemment, les cas humains sont relativement rares et on possède peu de rapport de cas récents, ce qui rend la comparaison limitée. Mais déterminer son origine n'est néanmoins pas négligeable car cette pathologie n'est pas à sous-estimer puisqu'un nouveau-né atteint et non pris en charge très rapidement (quelques heures) est en grand risque de mort par hypoxie et hypercapnie sévère comme le montre différentes études, dont l'étude historique de Plott. (17)

Une origine neurologique héréditaire est suspectée dans les deux espèces, or le seul nerf responsable de la fonction motrice des cartilages arythénoïdes est le nerf laryngé récurrent pour les deux espèces.

On peut donc supposer qu'une même mutation puisse être la cause de la dysfonction de ce nerf dans les cas de paralysie héréditaire chez le chien et chez l'humain.

Comme l'expliquent Isaacson et Moya dans leur étude, « la paralysie congénitale des abducteurs du larynx est un symptôme énigmatique. Une meilleure compréhension de ses causes attend les progrès de l'électrophysiologie laryngée clinique et l'analyse complète de l'autopsie du cerveau, des nerfs périphériques et de la musculature laryngée des personnes atteintes ». (8)

Dans ce contexte, se baser non pas sur les symptômes pour remonter vers l'origine anatomique potentielle, puis vers la mutation causale, mais au contraire partir de la mutation génétique pour identifier l'origine de la maladie semble être une nouvelle voie d'approche intéressante.

4. Caractère héréditaire de la paralysie laryngée chez l'homme et chez le chien d'après la littérature

4.1. Analyse du caractère héréditaire de la paralysie laryngée chez le chien

Le docteur Dirsko J. F. von Pfeil a mené une étude (19) entre 2009 et 2014 comprenant 25 Huskies d'Alaska atteints de paralysie laryngée dans l'objectif de déterminer les caractéristiques de cette pathologie et son caractère héréditaire au sein de cette race de travail. Des données ont été collectées pour chaque chien concernant la signalisation; les antécédents; les résultats des examens physiques, orthopédiques, neurologiques et laryngés; les résultats histologiques ; ainsi que pour 8 d'entre eux, le traitement et les résultats post-opératoires obtenus.

L'âge moyen au début des signes cliniques était de 6,4 mois. L'examen neurologique a révélé des signes de mononeuropathie du nerf laryngé récurrent mais pas de polyneuropathie.

Les résultats de l'analyse du pedigree suggèrent un mode récessif autosomique d'hérédité de la paralysie laryngée congénitale, avec pénétrance variable (tous les individus possédant un certain génotype n'expriment pas le phénotype correspondant).

Huit (32%) chiens ont subi une procédure de latéralisation des arythénoïdes du côté gauche afin de traiter leur paralysie laryngée. Des sections nerveuses ont été examinées sur ces chiens traités

chirurgicalement. Les nerfs ont été évalués pour la dégénérescence axonale, la démyélinisation, la perte de fibres et la prolifération des cellules de Schwann. L'examen histologique des nerfs moteurs et des plaques d'extrémité motrices chez certains chiens dans la présente étude a révélé une dégénérescence wallérienne dans le nerf laryngé récurrent, fournissant des preuves de perte de motoneurones.

Tous les propriétaires des chiens traités chirurgicalement ont signalé une amélioration conséquente de la respiration et de l'activité de leurs chiens après la chirurgie. Aucune récurrence n'a été rapportée à l'examen de suivi final 26 mois après la chirurgie. Aucun autre cas de pneumonie par aspiration ou autre complication n'a été observé. Pour 7 chiens traités chirurgicalement, l'activité a été progressivement augmentée et ils ont pu reprendre une activité sportive conséquente (mushing compétitif ou récréatif).

Sur les 17 chiens traités non chirurgicalement (68% des 25 chiens), 4 sont morts d'asphyxie secondaire à la paralysie laryngée congénitale. En revanche, une amélioration spontanée des signes cliniques entre la naissance et la maturité sans aucune intervention chirurgicale a été rapportée pour 10 chiens (40%). Ces chiens n'avaient plus de bruit respiratoire et ont continué comme animaux de compagnie; cependant, aucun n'est devenu actif et n'a couru des courses de traîneau.

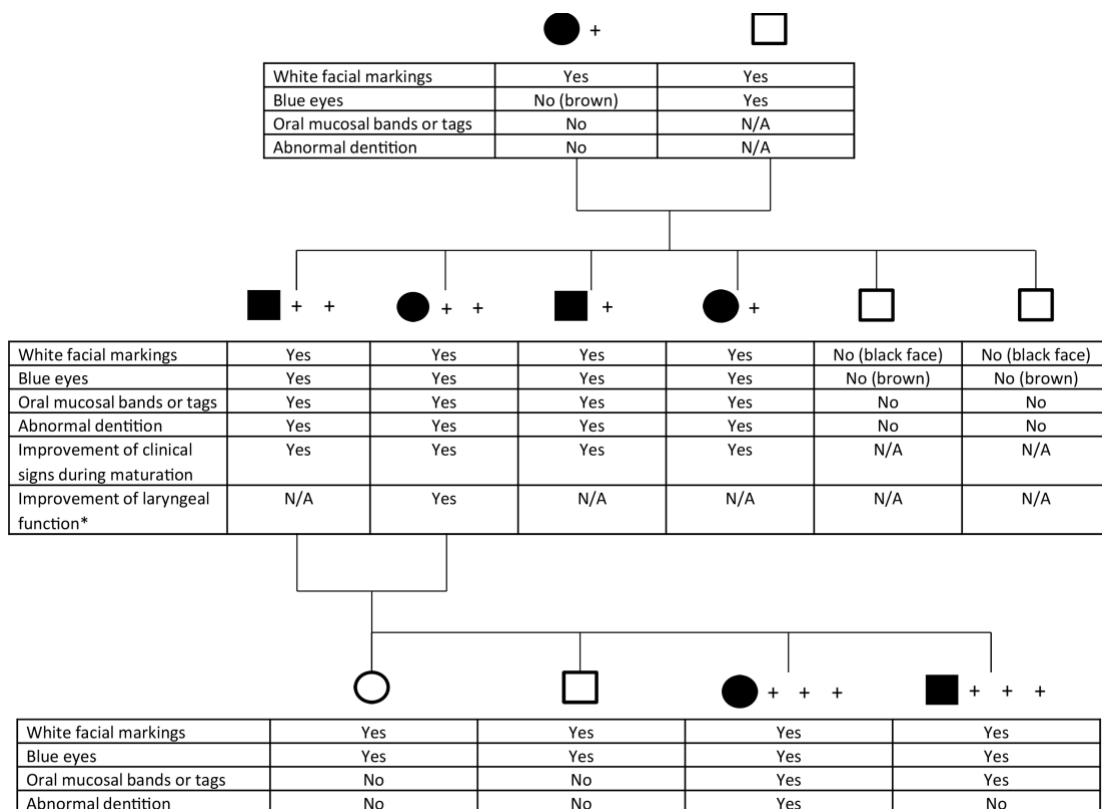


Figure 1—Annotated genogram showing the phenotype and selected additional features of 3 litters of Alaskan Huskies with CLP. Circles indicate females, and squares indicate males. Black symbols indicate affected dogs, and white symbols indicate clinically normal dogs that were suspected of being carriers of the disease. + = Mildly affected. ++ = Moderately affected. +++ = Severely affected and died or was euthanized shortly after birth. N/A = Not applicable. *Determined via laryngoscopy.

On observe de cet arbre généalogique que le déterminisme génétique de cette pathologie est relativement complexe puisque seulement 50% des individus de la 3^{ème} génération, issu de deux parents affectés pour une pathologie autosomale récessive, sont atteints. Normalement dans cette situation 100% des descendants devraient être atteints. Cet arbre nous permet cependant de déduire un mode de transmission dominant.

D'autre part on remarque que dans l'ensemble, 92% des chiens inclus avaient les yeux bleus, 76% avaient des marques faciales blanches et 52% avaient des étiquettes muqueuses buccales, des bandes de tissu muqueux buccal, ou les deux. Ces résultats suggèrent que la paralysie laryngée congénitale chez les Huskies d'Alaska pourrait être associée à ces caractéristiques phénotypiques. Cependant, les chiens ayant ces caractéristiques sont souvent de très bons chefs d'équipe (caractéristiques chien alpha) et ont l'aspect typique d'un chien de traîneau idéal ce qui est probablement la raison pour laquelle la pathologie n'a pas été éliminée de la race malgré les conséquences sur la carrière sportive des chiens atteints.

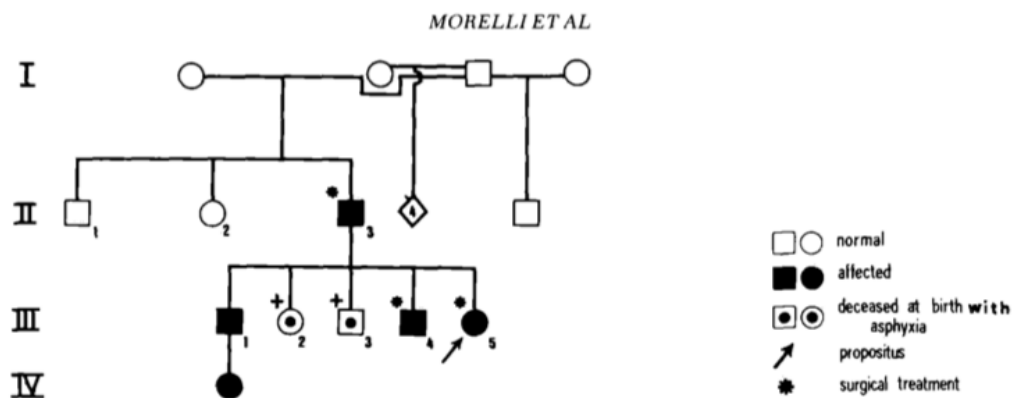
4.2. Analyse du caractère héréditaire de la paralysie laryngée chez l'Homme

Plott a décrit pour la première fois une paralysie familiale des cordes vocales chez quatre frères en 1964. Etant donné la répartition de la maladie uniquement chez les hommes de la fratrie, un mode de transmission lié aux chromosomes sexuels a été suggéré. (17)

En 1982, Grundfast et Milmoie ont constaté une paralysie bilatérale et des difficultés de déglutition chez un père, son fils et sa fille. Des trachéotomies ont été nécessaires pour les deux enfants, la décanulation a été réalisée avec succès avant l'âge de 14 mois. Un retard dans la maturation neurologique était suspecté comme étiologie. (5)

L'étude de Isaacson et Moya publiée en 1987 rapporte le cas d'une famille dont deux filles ont présenté à la naissance une paralysie laryngée. (8)

L'étude de Morelli, publiée en 1982, nous apprend que d'après les statistiques, dans un pourcentage élevé de cas, notamment chez les jeunes, le syndrome de Gerhardt ne peut être lié à aucun agent étiologique reconnu. Cette étude documente une forme familiale de l'affection et suggère la nature génétique possible du syndrome. Dans le cas de cette étude, une famille en particulier a été étudiée, avec cinq sujets affectés reconnus dans trois générations successives. Hormis les troubles respiratoires, ils présentent tous un aspect phénotypique normal et un développement psychique normal. Les sujets atteints présentaient la maladie à différents âges et la gravité des troubles respiratoires variait également selon les individus. Deux d'entre eux sont morts d'asphyxie (un à la naissance); trois ont été traités chirurgicalement à l'âge adulte (un par cordectomie, deux par aryténoïdopexie). Dans les deux autres cas, la maladie n'étant pas très symptomatique, elle n'a pas nécessité de traitement chirurgical. (13)



La présence de cinq individus différents affectés sur plusieurs générations conforte fortement l'hypothèse d'une transmission génétique de ce trait. De plus, on remarque que les individus sont de sexes différents ce qui suggère un mode de transmission autosomique et non sexuel. L'absence d'informations concernant la mère des enfants de la 3^{ème} génération rend l'analyse plus complexe mais le fait que tous les enfants de cette génération aient été atteints suggère un mode de transmission autosomique dominant. Ceci est conforté par le fait que le seul individu de la 4^{ème} génération représenté sur ce pedigree est lui aussi atteint.

L'ensemble de ces études de cas renforce fortement l'hypothèse d'un mode de transmission héréditaire de la paralysie laryngée chez l'humain tout comme elle l'est chez le chien. Cette transmission héréditaire suggère donc que la pathologie apparaisse suite à une ou

plusieurs mutation(s) génétique(s), transmise(s) de génération en génération. Par ailleurs, on remarque une grande diversité des modèles d'héritage proposés. Des schémas récessifs liés au sexe, autosomique dominant et autosomique dominant avec limitation masculine ont tous été rapportés dans différentes études de cas.

4.3. Etude du caractère héréditaire de la paralysie laryngée chez le chien

Dans le cadre de ce travail, la fréquence de ce caractère pathologique dans certaines races a été analysé en étudiant l'historique de cas répertoriés dans une clinique vétérinaire.

Nombre de cas de paralysie laryngée : 34

Nombre de cas où l'origine neurodégénérative est suspectée après exclusion des causes néoplasiques, traumatiques et autre par laryngoscopie et imagerie en coupe : 13

Tableau 2 : Analyse des cas de paralysie laryngée et de paralysie laryngée d'origine neurologique.

Races	Husky Sibériens	Bouvier des Flandres	Rottweiler	Labrador	Autre	Total
Paralysie laryngée (PL)	8	3	9	4	10	34
PL d'origine neurologique	6	3	2	1	1	13
Rapport PL sur PL d'origine neurologique	75%	100%	22,2%	25%	10%	

L'analyse du rapport entre le nombre de cas de paralysie laryngée total et de paralysie laryngée d'origine neurologique au sein de différentes races de chiens dans une clinique vétérinaire permet de mettre en évidence la forte prévalence de cette pathologie au sein des races Husky Sibériens et Bouvier des Flandres dans l'échantillon analysé.

Les Husky Sibériens représentent :

$6/13 = 0,46 = 46\%$ des paralysies laryngées où l'origine neurologique est suspectée

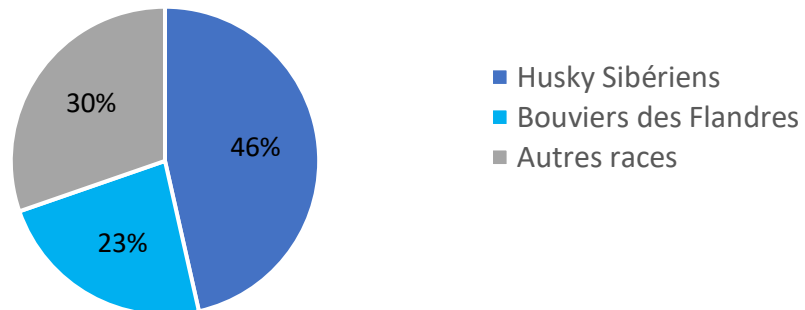
Les Bouvier des Flandres représentent :

$3/13 = 0,23 = 23\%$ des paralysies laryngées où l'origine neurologique est suspectée

Les autres races représentent :

$4/13 = 0,30 = 30\%$ des paralysies laryngées où l'origine neurologique est suspectée

Figure 1 : Répartition des cas de paralysies laryngées d'origine neurologiques entre les Husky Sibériens, les Bouviers des Flandres et l'ensemble des autres races répertorié au sein d'une clinique vétérinaire.



On remarque d'après les résultats du Tableau 2 et la Figure 1 que les Husky Sibériens et les Bouviers des Flandres sont deux races avec une fréquence de paralysie laryngée d'origine neurologique très élevée avec respectivement 46% et 23% de l'ensemble des paralysies laryngées d'origine neurologique rapportées dans cette clinique.

Considérant notre échantillon comme un échantillon aléatoire, nous avons effectué un test de permutations (14) pour vérifier si obtenir de telles différences était attendu. Pour effectuer ce test nous avons regroupé les races prédisposées (Huskies d'Alaska et Bouvier des Flandres) et les autres classes. Il résulte de notre test qu'une telle distribution est très inattendue (p -value = 0.004), ce qui supporte notre hypothèse selon laquelle certaines races sont plus prédisposées que d'autres aux paralysies laryngées d'origine neurologique.

Or le fait que la fréquence d'une pathologie soit beaucoup plus élevée dans une race en comparaison avec le reste de la population canine indique une forte probabilité d'origine héréditaire.

5. Protocole et intérêt de l'identification du gène et de la mutation à l'origine d'une pathologie

5.1. Protocole

Après sélection de la pathologie et de la race cible, l'étape suivante du protocole sera la recherche et l'identification en laboratoire du (des) gène(s) ou de la (des) région(s) chromosomique(s) impliquée(s) dans la maladie héréditaire canine. Cette étape est aujourd'hui possible notamment grâce au séquençage du génome canin en 2005 et l'identification de centaines de milliers de marqueurs génétiques. Elle a été facilitée par la création, plus récente encore, de puces à ADN. (7)

L'identification de régions génomiques causales nécessite le prélèvement d'ADN de chiens de la race sélectionnée et atteints de la pathologie cible, mais également de prélèvement d'ADN de chiens sains de cette même race, et si possible de prélèvements d'ADN de chiens contrôles de race différente. Une étude de ce type est une étude de type « cas-contrôles » et a pour objectif de cibler de manière fine des régions chromosomiques d'intérêt, sans nécessairement d'apriori sur le mode de transmission. On parle alors « d'études d'association ». Une alternative est de raisonner au sein de familles (on parlera alors « d'études de liaison »). Il faut dans ce cas également obtenir les relations généalogiques des individus atteints et sains afin de déterminer le mode de transmission de la pathologie (maladie autosome, lié au chromosome X ou Y, récessive ou dominante...).

Dans tous les cas, un examen médical complet de chaque individu atteint et sain est nécessaire pour obtenir le phénotype (typiquement, atteint ou sain) correct de l'individu.

Dans les deux types d'études présentés ci-dessus, il existe également deux types d'analyses génétiques :

- Les études pangénomiques (« genome-wide »), où l'on n'a aucun apriori sur le(s) gène(s) potentiellement mis en cause. Il faut donc génotyper des marqueurs couvrant l'entièreté du génome des animaux de l'étude pour essayer d'identifier les différences de fréquences alléliques entre les individus atteints et les individus sains.
- Les études « gène(s) candidat(s) » où, à l'inverse, un ou plusieurs gènes sont suspectés, l'étude ciblant alors uniquement ces gènes, réduisant *de facto* la charge de génotypage.

Dans notre cas, aucun gène n'est encore suspecté il s'agira donc d'une étude pangénomique.

Ainsi, après identification des différents chiens candidats pour l'expérience, un prélèvement d'ADN doit être réalisé. Plusieurs techniques existent pour cela. La plus simple est le frottis buccal. Le prélèvement sanguin est plus invasif mais permet d'obtenir une plus grande quantité d'ADN, ce qui est donc plutôt recommandé dans ce type d'étude pangénomique.

Ensuite, le laboratoire se charge de génotyper les échantillons envoyés pour une série de marqueurs correspondant aux régions étudiées (potentiellement, tout le génome dans une étude pangénomique). Cette étape est l'étape limitante de notre étude car elle représente un coût qui peut être considérable, ce qui explique l'importance d'une analyse approfondie de la pathologie avant d'entamer cette étape.

L'étape suivante est l'analyse des données de phénotypage (malade - sain, typiquement) et de génotypage. L'idée générale est que des segments chromosomiques porteurs de mutations délétères seront partagés par les individus malades avec une fréquence plus élevée que d'autres segments chromosomiques non impliqués dans la maladie. Ces différences peuvent être détectées par divers tests statistiques avec une puissance qui dépendra de l'impact de la région considérée sur la maladie (taille de l'effet) et de la taille de la cohorte étudiée. Le déterminisme de la pathologie intervient évidemment dans le calcul. Par exemple, si la pathologie est autosomique récessive, les mutations délétères doivent être présentes sur les deux allèles du gène incriminé, alors qu'elles ne seront présentes qu'au pire sur un seul allèle du gène d'un animal sain (qui serait dans ce cas un porteur sain).

L'identification d'une association statistique entre un (des) marqueur(s) et une pathologie est généralement suivie d'une étape de séquençage de la région détectée, si cette région n'est pas trop grande (limitée à un ou quelques gènes). Le but est alors d'essayer de mettre en évidence des différences entre les 2 cohortes soit au sein d'un ou plusieurs gènes situés dans la région (altération d'une partie codante, par exemple), soit au sein des régions régulatrices (par exemple, modification du taux d'expression).

La dernière étape est de vérifier la causalité en faisant une analyse fonctionnelle permettant de mettre en évidence le rôle éventuel du gène dans le mécanisme physiopathologique.

Une étude récente, menée en 2015 par l'université de Pennsylvanie et parue en 2016, est une étude « gène candidat » qui avait pour objectif d'identifier l'implication ou non du gène de la sous-unité dynactin I dans la paralysie laryngée (7). Ce gène étant suspecté car il s'agit d'une protéine indispensable à l'activation de la dynéine, une molécule responsable du transport rétrograde de substances dans les axones. Or le transport intracellulaire de nouvelles protéines

vers les axones et les dendrites et le transport rétrograde des facteurs trophiques et de molécules de signalisation sont essentiels pour la différenciation nerveuse et la survie des nerfs. Il semble donc probable qu'une altération de cette dynéine affecte l'intégrité et la fonction neuronale, et potentiellement le nerf laryngé récurrent. Cette hypothèse étant supportée par le cas d'une famille atteinte d'une pathologie des motoneurones causée par une mutation de la dynactin I, et dont un des premiers symptômes était une paralysie laryngée bilatérale.

Des paires d'amorces ont été conçues à l'aide d'un logiciel commercial pour l'amplification par PCR de l'exon 1 alternatif et des 32 exons codant pour les protéines et les signaux d'épissage associés. Les fragments d'ADN ont été amplifiés en utilisant des conditions de PCR standard (utilisation de Taq ADN polymérase).

Cette étude, menée sur 12 chiens atteints et 4 chiens sains, a démontré qu'il n'y avait pas d'implication du gène DCTN I dans la maladie car aucun des chiens affectés n'était homozygote pour aucune mutation affectant les régions codantes ou les séquences consensus d'épissage. Sur les 16 chiens testés pour le SNP faux-sens dans l'exon 32, tous étaient homozygotes pour l'allèle de référence, à l'exception de 2 affectés et 1 Labrador Retriever cliniquement normal et 1 Leonberger cliniquement normal, comme montré dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Variations de séquence chez 16 Labrador Retriever and Leonbergs qui étaient affectés de paralysie laryngée (AF) ou étaient cliniquement sains (CN).

Dog	Age (y)	Sex	Status	Upstream region SNPs				Exon 32	3' end
				7 SNP haplotype*	New SNP 48,714,780 G/C	rs875626 5 T/C	rs225561 91 A/C	rs22581520 missense G/A	in/del CT
LABR 1	6	FS	AF	Het	Ref	Het	Het	Het	Het
LABR 2	11	MC	AF	Ref	Ref	Ref	Alt	Ref	Het
LABR 3	8	FS	AF	Ref	Ref	Ref	Alt	Ref	Het
LABR 4	11	FS	AF	Ref	Ref	Het	Alt	Ref	Het
LABR 5	12	FS	AF	Het	Het	Alt	Het	Het	Het
LABR 6	7	FS	AF	Alt	Ref	Alt	Ref	Ref	Het
LABR 7	11	FS	AF	Alt	Ref	Alt	Ref	Ref	Ref
LABR 8	3	FS	CN	Het	Ref	Het	Het	Ref	Het
LABR 9	7	MC	CN	Het	Het	Alt	Het	Het	Alt
LEON 1	7	M	AF	Ref	Ref	Ref	Alt	Ref	Het
LEON 2	7	M	AF	Ref	Ref	Ref	Alt	Ref	Ref
LEON 4	10	MC	AF	Ref	Ref	Ref	Alt	Ref	Het
LEON 6	7	FS	AF	Het	Ref	Het	Het	Ref	Het
LEON 8	7	FS	AF	Het	Ref	Het	Het	Ref	Ref
LEON 3	4	M	CN	Het	Ref	Het	Het	Ref	Ref
LEON 5	8	FS	CN	Ref	Ref	Ref	Alt	Ref	Het
LEON 7	6	FS	CN	Alt	Ref	Alt	Ref	Het	Het

Alt = Alternative exon I. FS = Spayed female. Het = Heterogenous. M = Sexually intact male. MC = Castrated male. Ref = Reference allele.
See Figure 1 for remainder of key.

5.2. Intérêts pratiques de l'identification des gènes mutés

Intérêt pour l'éleveur :

L'identification des gènes mutés aurait un intérêt pour les éleveurs à travers le développement de tests de dépistage génétique afin de détecter les reproducteurs porteurs de maladie avant les premiers accouplements afin d'obtenir des portées indemnes de paralysie laryngée congénitale et ainsi diminuer l'incidence de cette pathologie au sein des races atteintes.

Une autre utilisation pertinente serait le dépistage de reproducteurs extérieurs avant de les introduire dans l'élevage afin de maintenir son élevage indemne de la maladie.

Si des reproducteurs porteurs sains sont identifiés mais présentent un grand intérêt génétique pour la race, ces tests génétiques pourraient être utilisés afin d'adapter les accouplements en sélectionnant des partenaires indemnes homozygotes afin d'obtenir des chiots sains hétérozygotes. Cette stratégie est cependant à éviter, pour limiter la propagation de la maladie.

Intérêt pour l'homme, l'animal et le vétérinaire :

L'identification des gènes mutés peut permettre le développement de test de dépistage précoce afin de démarrer un traitement le plus tôt possible et limiter le développement de pathologies secondaires. Les symptômes étant généralement sévères à la naissance, surtout chez l'homme, un dépistage des parents à risque avant la naissance peut être d'un grand intérêt pour prévoir au mieux les complications (matériel d'intubation et de trachéotomie à disposition, accouchement à l'hôpital et non à la maison, etc.) (1,4)

Identifier le gène peut ensuite permettre d'analyser la protéine codée par le gène. L'analyse moléculaire de la protéine codée puis l'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués peut ensuite être la voie d'entrée vers l'élaboration d'un traitement. (1, 4)

Conclusion

La paralysie laryngée est une pathologie décrite chez l'Homme, mais encore très mal connue, et ce notamment du fait du manque de cas rapportés comme c'est le cas pour de nombreuses maladies orphelines. L'identification d'une pathologie similaire dans l'espèce canine offre une nouvelle perspective dans l'avancée médicale de cette pathologie. En effet, au vue des nombreuses similitudes au niveau anatomique, symptomatologique, physiopathologie et héréditaire entre la paralysie laryngée chez l'homme et chez le chien, on peut raisonnablement poser l'hypothèse d'une origine commune. La présente étude a permis de démontrer le caractère héréditaire de cette pathologie au sein de la race Bouvier des Flandres et Huskies d'Alaska (plus particulièrement les phénotypes ...). On a également démontré de manière indirecte le caractère héréditaire de cette pathologie chez l'Homme à travers une revue de différentes études de cas de paralysie laryngée diagnostiquée chez des individus appartenant à une même famille. On peut donc supposer une origine génétique commune, et plus précisément la mutation d'un même gène chez les deux espèces. Une fois cette hypothèse démontrée, on peut raisonnablement proposer la mise en place des étapes suivantes du processus d'identification du gène causal. Ces étapes seront l'identification de chiens sains et atteints de paralysie laryngée congénitale issus de ces deux races, puis le prélèvement de leur ADN et son séquençage, et enfin l'analyse des données récoltées afin d'identifier la séquence d'ADN qui diffère entre la population saine et la population malade de manière significative. Si une telle différence significative est mise en évidence entre les deux populations, l'analyse moléculaire de la protéine codée ou régulée par le(s) gène(s) impliqué(s) est la voie d'entrée vers l'élaboration d'un traitement permettant le traitement des individus atteints, tant canin que humain.

Bibliographie

1. André C, Plassais J. Bull. Le chien dans la pathologie et la génétique comparée : exemple de maladies et de gènes partagés entre l'homme et le chien. Acad. Vét. France, 2012 - Tome 165 - N°3.
2. Cannarozzi G, Schneider A, Gonnet G (2007) A phylogenomic study of human, dog, and mouse. PLoS Comput Biol 3(1): e2. doi:10.1371/journal.pcbi.0030002
3. Gacek RR, Hereditary abductor vocal cord paralysis. Ann Otol 1976.
4. Grall A, Guaguère E, Planchais S. *PNPLA1* mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans Nature Genetics 2012.
5. Grundfast K.M. Milmo G. Congenital hereditary bilateral abductor vocal cord paralysis, Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 91 (1982) 564—566.
6. Hollinger L.D., Holinger P.C., Holinger P.H.. Etiology of bilateral abductor vocal cord paralysis, Ann. Otol. 85 (1976) 428— 436 .
7. Holt D.E., Brown D.C., Henthorn P.S. Evaluation of the dynactin 1 gene in Leonbergers and Labrador Retrievers with laryngeal paralysis. AJVR • Vol 77 • No. 10 • October 2016
8. Isaacson G., Moya F. Hereditary congenital laryngeal abductor paralysis. Ann *Gtol Rhinol Laryngol* 1987.
9. Kitshoff, A.M., Van Goethem, B., Stegen, L., Vandekerckhove, P. & De Rooster, H, 'Laryngeal paralysis in dogs: An update on recent knowledge', *Journal of the South African Veterinary Association* 84(1), Art. #909, 2013.
10. Lenffer J., Nicholas F.W., Castle K. OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals): an enhanced platform and integration into the Entrez search interface at NCBI Nucleic Acids Research, Vol. 34, 2006

11. Lequarré A-S., Andersson L., André C., Fredholm M., Hitte, C. Leeb T. Lohi H., Lindblad-Toh K., Georges M.. LUPA: A European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both human and dogs. *The Veterinary Journal* 189 (2011) 155–159
12. Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S.. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, Vol 438|8 December 2005.
13. Morelli G., Meselella C., Testa B., Ventruto V., Costa F., Santulli B.. Familial laryngeal abductor paralysis with presumed autosomal dominant inheritance. *Ann Gtol Rhinol Laryngol* 1982
14. Neuhausser M., Manly B.F.J. The Fisher-Pitman permutation test when testing for differences in mean and variance. *Psychological Reports*, 2004.
15. Parker H.G., Ostrander, E.A., 2005. Canine genomics and genetics: Running with the pack. *PLoS Genetics* 1, e58.
16. Parker H.G. Genomic analyses of modern dog breeds. *Mamm Genome* (2012). Springer Science+Business Media, 2012.
17. Plott, D. Congenital laryngeal-abductor vocal cord paralysis due to nucleus ambiguus dysgenesis in three brothers, *New Engl. J. Med.* 271 (1964).
18. Rubin A.D., Sataloff R.T. Vocal Fold Paresis and Paralysis. *Otolaryngol Clin N Am* 40 (2007).
19. Von Pfeil D.J.F., Zellner E., Fritz M.C., Langohr I., Griffitts C., Stanley B.J.. Congenital laryngeal paralysis in Alaskan Huskies: 25 cases (2009–2014)
20. Watters G.V., Fitch N. Familial laryngeal abductor paralysis and psychomotor retardation, *Clin. Genet.* 4 (1973) 429.

21. Fédération cynologique internationale : <http://www.fci.be/fr/>. Consulté le 10 décembre 2019.
22. OMIA – Online Mendelian Inheritance in Animals. Université de Sydney, 2020.
<https://omia.org/home/> Consulté le 23 novembre 2019.